



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE AGRONOMIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CANNABIS
(*Cannabis sp.*) OBTENIDAS POR GERMINACIÓN INVITRO EN DOS
MEDIOS DE CULTIVO Y TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO
GIBERÉLICO”.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingenieras Agrónomas

Autores:

Paredes Vaca Lisbeth Paola
Vélez Bravo Alison Lilibeth

Tutor:

Chasi Vizuete Wilman Paolo

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Lisbeth Paola Paredes Vaca Lisbeth Paola, con cédula de ciudadanía No. 0504614199 y Alison Lilibeth Vélez Bravo, con cédula de ciudadanía No. 1315853883, declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”, siendo el Ingeniero Mg. Chasi Vizquete Wilman Paolo, Tutor del presente trabajo; y, exigimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Lisbeth Paola Paredes Vaca
Estudiante
CC: 0504614199

Alison Lilibeth Vélez Bravo
Estudiante
CC: 1315853883

Ing. Wilman Paolo Chasi Vizquete, Mg.
Docente Tutor
CC: 0502409725

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **PAREDES VACA LISBETH PAOLA**, identificado con cédula de ciudadanía **050461419-9** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, Doctor Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo 2019 – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Octubre 2022 – Marzo 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 30 de noviembre del 2022

Tutor: Ingeniero. Wilman Paolo Chasi Vizquete, Mg

Tema: “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que. **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 16 días del mes de febrero del 2023.

Lisbeth Paola Paredes Vaca

LA CEDENTE

Dr. Cristian Tinajero Jiménez

LA CESIONARIA

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **VELEZ BRAVO ALISON LILIBETH**, identificada con cédula de ciudadanía **131585388-3** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Doctor Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo 2019 – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Octubre 2022 – Marzo 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 30 de noviembre del 2022

Tutor: Ingeniero Mg. Wilman Paolo Chasi Vizuete

Tema: “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- f) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- g) La publicación del trabajo de grado.
- h) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- i) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- j) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 16 días del mes de febrero del 2023.

Alison Lilibeth Vélez Bravo

LA CEDENTE

Dr. Cristian Tinajero Jiménez

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CANNABIS (*Cannabis sp.*) OBTENIDAS POR GERMINACIÓN INVITRO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO GIBERÉLICO”, de Paredes Vaca Lisbeth Paola y Vélez Bravo Alison Lilibeth, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 050240972-5

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Paredes Vaca Lisbeth Paola y Vélez Bravo Alison Lilibeth con el título del Proyecto de Investigación: “EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CANNABIS (*Cannabis sp.*) OBTENIDAS POR GERMINACIÓN INVITRO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO GIBERÉLICO”, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometidos al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Lector 1 (Presidente)

Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D.
CC: 050232923-8

Lector 2

Ing. Alexandra Isabel Tapia Borja Mg.
CC: 050266175-4

Lector 3

Ing. Cristian Santiago Jiménez Jácome, Mg.
CC: 050194626-3

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme culminar una etapa muy importante de mi vida, gracias a mi Padre Jordán y mi Madre María por ser los promotores de mis sueños, agradecerle a mi hermano y hermanas, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional.

Agradecerle también a mi Tutor el Ing. Paolo Chasi, quien fue una parte muy importante en el desarrollo de esta investigación como mentor, también a la Ing.

Lisbeth Paola Paredes Vaca

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme culminar una etapa muy importante de mi vida, gracias a mi padre Cesar y mi madre Nuris por ser los promotores de mis sueños, agradecerle a mi compañero de vida Oscar por su apoyo incondicional, a mi hermano Johan y hermanas, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional y finalmente a mi hijo Eithan.

Agradecerle también a mi Tutor el Ing. Paolo Chasi, quien fue una parte muy importante en el desarrollo de esta investigación como mentor.

Alison Lilibeth Velez Bravo

DEDICATORIA

Con mucho cariño y sacrificio dedico este logro a mis padres por el apoyo, dedicación y el amor que siempre me han brindado a lo largo de mi etapa estudiantil Universitaria, ya que gracias a su sacrificio y esfuerzo el día de hoy se ve reflejado en la culminación de mis estudios.

Lisbeth Paola Paredes Vaca

DEDICATORIA

A mis padres y a mi compañero de vida por el apoyo, dedicación y el amor que siempre me han brindado a lo largo de mi etapa estudiantil Universitaria, ya que gracias a su sacrificio y esfuerzo el día de hoy se ve reflejado en la culminación de mis estudios.

Alison Lilibeth Vélez Bravo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CANNABIS (*Cannabis sp.*) OBTENIDAS POR GERMINACIÓN INVITRO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO GIBERÉLICO”.

AUTORES: Paredes Vaca Lisbeth Paola

Vélez Bravo Alison Lilibeth

RESUMEN

La presente investigación se ejecutó en el laboratorio de protección vegetal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, la cual tuvo como objetivo comparar el efecto de dos medios de cultivo (Murashigue skoog y Carbón activado) y tres concentraciones de ácido giberélico (0 mg/L^{-1} , $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$, 1 mg/L^{-1}) en plantas de cannabis obtenido por germinación in vitro, para lo cual se generó un protocolo de obtención de vitroplantas mediante revisión bibliográfica de investigaciones realizadas, las variables a evaluar fueron Altura de planta, Numero de hojas cada 3 días, empleando un Diseño Completo al Azar con tres tratamientos y 8 repeticiones, y para el análisis funcional se utilizó la prueba de significancia de Tukey al 5%.

El diseño experimental que se utilizo fue un DBCA, diseño completamente al azar, con 3 tratamientos y 8 repeticiones utilizando la prueba de rangos múltiples de tukey al 5%.

Con los datos obtenidos se determinó que el tratamiento que presento mejor resultado para altura de planta fue el T3 (MS+ Carbón Activado + 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico) con un promedio de 13,92cm, seguido del T2 (MS+ Carbón Activado + $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$ de ácido giberélico) con una promedio de 12,52cm, para el número de hojas los tratamientos que presentaron los mejores resultados fueron el T3(MS+ Carbón Activado + 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico) y T2 (MS+ Carbón Activado + $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$ de ácido giberélico) con un promedio de 4cm, dando como resultado de 6 hojas, todos los tratamientos en las variables evaluadas fueron superiores al testigo el cual no se adiciono ácido giberélico.

Concluyendo que el medio Murashigue skoog con carbón activado y la adición de ácido giberélico promueve crecimiento de Cannabis en sistemas in vitro.

Palabras clave: Vitroplantas, Cannabis, ácido giberélico, Murashige y Skoog.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TITLE : "EVALUATION OF THE GROWTH OF CANNABIS PLANTS (*Cannabis* sp.) OBTAINED BY INVITRO GERMINATION IN TWO CULTIVATION MEDIUMS AND THREE CONCENTRATIONS OF GIBBERELIC ACID".

AUTHORS: Paredes Vaca Lisbeth Paola

Vélez Bravo Alison Lilibeth

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the plant protection laboratory of the Technical University of Cotopaxi, with the objective of comparing the effect of two culture media (Murashigue skoog and activated carbon) and three concentrations of gibberellic acid (0 mg/L-1 , 0.5 mg/L-1 , 1 mg/L-1) in cannabis plants obtained by in vitro germination, The variables to be evaluated were plant height, number of leaves every 3 days, using a Complete Randomized Design with three treatments and 8 replicates, and for the functional analysis the Tukey significance test was used at 5%. The experimental design used was a DBCA, completely randomized design, with 3 treatments and 8 replications using the Tukey's multiple range test at 5%. With the data obtained, it was determined that the treatment that presented the best result for plant height was T3 (DM+ activated carbon + 1 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 13.92 cm, followed by T2 (DM+ activated carbon + 0.5 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 12.52 cm, For the number of leaves, the treatments that presented the best results were T3 (MS+ activated carbon + 1 mg/L-1 gibberellic acid) and T2 (MS+ activated carbon + 0.5 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 4 cm, resulting in 6 leaves, all treatments in the variables evaluated were superior to the control, which did not add gibberellic acid. It is concluded that the Murashigue skoog medium with activated charcoal and the addition of gibberellic acid promotes Cannabis growth in in vitro systems.

KEYWORDS: Vitroplants, Cannabis, Gibberellic acid, Murashige and Skoog.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	v
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vii
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	viii
AGRADECIMIENTO	ix
AGRADECIMIENTO	x
DEDICATORIA.....	xi
DEDICATORIA.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	xx
INDICE DE FIGURAS	xxi
INDICE DE ANEXOS	xxii
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. PROBLEMÁTICA.....	3
4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	4
5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	5
6. OBJETIVOS	5
6.1. Objetivo general.....	5
6.2. Objetivos específicos	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	6
8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	8

8.1.	Origen Cannabis	8
8.2.	Taxonomía	8
8.3.	Características Botánicas	8
8.4.	Aspectos morfológicos del cannabis sativa L.....	9
8.4.1.	Raíz.....	9
8.4.2.	Tallo.....	10
8.4.3.	Hojas.....	11
8.4.4.	Flores	11
8.4.5.	Semilla.....	12
8.5.	Fenología	13
8.5.1.	Germinación y emergencia.....	13
8.5.2.	Estado vegetativo (código de estadio principal 1).....	14
8.5.3.	Floración y formación de semilla (código de estadio principal 2)	14
8.5.4.	Senescencia (código de estadio principal 3).....	15
8.6.	Biotecnología vegetal: aplicaciones en mejoras de cultivos.....	15
8.7.	Requerimiento para el cultivo in vitro	15
8.8.	Ambiente físico.....	15
8.8.1.	Temperatura.....	15
8.8.2.	Luz y fotoperiodo	16
8.8.3.	Luz en la micropropagación	16
8.8.4.	Humedad.....	16
8.8.5.	Temperatura y humedad en el cuarto de conservación.....	16
8.9.	Propagación por semillas.	16
8.10.	Germinación	17
8.11.	Cultivo in vitro	18
8.12.	Materiales para el cultivo in vitro.	18
8.12.1.	Equipos	18

8.12.2.	Cámara de flujo laminar	18
8.12.3.	Cuarto de Crecimiento	19
8.13.	Medios de cultivo	19
8.14.	Medio de cultivo Murashige y Skoog	20
8.14.1.	Descripción.	20
8.14.2.	Propiedades	20
8.15.	Carbón activado.....	21
8.16.	Giberelinas.	22
8.16.1.	Efectos fisiológicos.....	22
8.17.	Reguladores de crecimiento.	23
8.18.	Efectos en los cultivos in vitro.	23
8.19.	Agentes contaminantes.....	24
9.	HIPOTESIS.....	24
9.1.	Hipótesis Nula.....	24
9.2.	Hipótesis Alternativa	24
10.	METODOLOGÍA	24
10.1.	Ubicación y duración de la investigación	24
10.2.	Condiciones de laboratorio.....	25
10.3.	Tipo de investigación	25
10.3.1.	Experimental.....	25
10.3.2.	Bibliográfica	25
10.4.	Materiales y Equipos.....	25
10.5.	Factores en estudio.....	26
10.6.	Manejo metodológico del ensayo.....	26
10.7.	Fase de establecimiento.....	26
10.7.1.	Preparación del material vegetativo según la metodología de (Gisel Villezcas)	

10.7.2.	Preparación del medio de cultivo e incorporación de la fitohormona siguiendo el protocolo establecido por (McKendrick, 2000). (Ver anexo 1).....	27
10.8.	Siembra de vitroplantas en el medio de cultivo siguiendo la metodología de (Alchimiaweb, 2021).....	28
10.9.	Esquema experimental	30
10.10.	Variables evaluadas.....	31
10.10.1.	Altura de planta.....	31
10.10.2.	Número de hojas	31
10.11.	Elaboración del protocolo	31
11.	DISEÑO EXPERIMENTAL	31
11.1.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	32
12.	CONCLUSIONES	39
13.	RECOMENDACIONES	39
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
15.	ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados	6
Tabla 2. Clasificación botánica del Cannabis sp.	8
Tabla 3. Condiciones del laboratorio	25
Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la investigación.	25
Tabla 5. Factores en estudio	26
Tabla 6. Esquema del experimento.....	30
Tabla 7. Fuente de variación y grados de libertad	31
Tabla 8. Cuadro de análisis de varianza para la altura de la planta a los 20 días	32
Tabla 9. Cuadro de análisis de varianza para el número de hojas	37

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Aspectos Morfológicos del cannabis (<i>Cannabis</i> sp).....	9
Imagen 2. Raíz.....	10
Imagen 3. Estructura de la sección transversal del tallo de una planta de cáñamo	10
Imagen 4. Detalle de hoja de cannabis sativa	11
Imagen 5. Detalle de una flor masculina examinada abierta	11
Imagen 6. Estructuras de una flor de Cannabis	12
Imagen 7. Detalle de semilla cannabis sp.....	12
Imagen 8. Germinación y emergencia en la etapa fenológica de cannabis sp.....	13
Imagen 9. Tercer par de hojas en el estado vegetativo de las etapas fenológicas del cannabis st.	14
Imagen 10. Cambio de filotaxis en la etapa de floración y formación de semilla del cannabis sp.....	14
Imagen 11. Germinación de semillas.....	17
Imagen 12. Presentación del medio Murashige y Skoog.....	21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo	27
Figura 2. Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo	28
Figura 3. Proceso para la siembra de las vitroplantas con sus respectivos tratamientos.....	29
Figura 4. Traslado de los tratamientos al cuarto de crecimiento	30
Figura 5. Prueba de Tukey 5% para las variedades.....	33
Figura 6. Prueba de Tukey 5% para los medios	33
Figura 7. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones.	34
Figura 8. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad y Medios	35
Figura 9. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad y Concentración.....	35
Figura 10. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad, Medios y Concentraciones	36
Figura 11. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad, Medios y Concentraciones en el crecimiento de hojas	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo.....	52
Anexo 2. Aval de Traducción.....	61
Anexo 3. Hoja de Vida del Estudiante	62
Anexo 4. Hoja de Vida del Estudiante	63
Anexo 5. Hoja del Tutor.....	64

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: “Evaluación del crecimiento de plantas de cannabis (*cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres concentraciones de ácido giberélico”.

Fecha de inicio: Octubre 2022

Fecha de finalización: Marzo 2023

Lugar de ejecución: Laboratorios de la Facultad CAREN-UTC

Carrera que auspicia: Agronomía

Proyecto de investigación vinculado: “Evaluación del crecimiento de plantas de Cannabis (*Cannabis sp.*) obtenidas por germinación Invitro en dos medios de cultivo y tres niveles de ácido giberélico”.

Equipo de Trabajo Autores:

Paredes

Tutor: Ing. Wilman Paolo Chasi Vizúete

Área de Conocimiento:

Agricultura – Silvicultura – Pesca - Agricultura

Línea de investigación: Análisis conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local

Sub líneas de investigación de la Carrera: Producción Agrícola sostenible

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto se realizó en el cantón Latacunga Provincia de Cotopaxi, en el laboratorio de protección vegetal de la facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se basa en la aplicación de concentraciones de fitohormonas en vitroplantas de *Cannabis st.*, para lo cual se preparó el medio de cultivo Murashige y Skoog con y sin carbón activado.

Tuvieron tres concentraciones de fitohormona (Ácido giberélico) de 0 mg/L^{-1} , 0.5 mg/L^{-1} y 1 mg/L^{-1} con un testigo, demostrando así cuál de las dosis arrojó mejores resultados en el desarrollo de las vitroplantas, las variables dependientes fueron: altura de planta, número de hojas. Teniendo como mejores resultados los tratamientos T3 (MS+ Carbón Activado 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico) para las variables altura de planta y el número de hojas el mejor tratamiento fue T3 (MS+ Carbón Activado 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico).

3. PROBLEMÁTICA

El principal problema que se obtuvo en esta investigación es la obtención de semillas de cannabis ya que es sumamente costosa y no se encuentra fácilmente, también la poca información que existe en sitios web, no cuenta con servicios de laboratorio especializados en control de calidad y cuantificación de cannabinoides. Lo cual hacen que surja el problema de la existencia de la gran necesidad previa a la restricción legal.

La contaminación del medio es uno de los problemas en un cultivo in vitro. Todo este proceso debe realizarse dentro de un ambiente estéril. Además, hay que asegurarse de desinfectar y esterilizar todo el material (orgánico y no orgánico) que se utilice. Sin embargo, en materia cannábica este asunto todavía es algo muy reciente. La respuesta in vitro de las plantas es distinta en cada especie, e incluso entre variedades, y los estudios referentes al cultivo in vitro de cannabis son escasos y de difícil acceso (Yerbasi, 2017). Sin embargo, puesto que ahora representan una oportunidad para la investigación en el cultivo, la generación de conocimiento en estas ramas, y de esta manera aportar en la creación de valor para la industria de cannabis medicinal (Arispe, 2021).

Uno de los problemas que han encontrado quienes quieren cultivar Cáñamo en el Ecuador es la falta de financiamiento para medianos o grandes proyectos de cultivos de cannabis, explico Endara miembro del grupo Hemp Ecuador dedicado al análisis e investigación de Cannabis en nuestro país Ecuador. Según Endara solo quien tenga dinero podrá hacer inversiones por su cuenta, el problema que presenta el Ecuador es la falta de dinero para invertir, para empezar con una hectárea a cielo abierto se requieren de 50 a 60.000 dólares, si es en invernadero se necesitarán de unos 180.000 dólares, inversión que se puede recuperar en 6 meses” recalco, indicando que están en diálogo con algunos bancos en el exterior para buscar el financiamiento oportuno para este cultivo en el país (El productor, 2022).

4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En el Ecuador, después de una ardua lucha por la legalización del Cannabis de uso medicinal, ya contamos con normativa secundaria que permite obtener permisos para: importar, sembrar, cosechar, procesar, comercializar y exportar el cannabis para uso industrial. Según expertos en la materia, Ecuador presenta excelentes condiciones para el desarrollo de este afortunado negocio. Por un lado, las condiciones de ubicación geográfica y meteorológica permiten un mayor rendimiento en la siembra y producción. Adicional a esto, la regulación y costos relativos al pago de tasas presentan una gran ventaja comparativa aún con países vecinos como Colombia, donde se apunta a un gran crecimiento de la industria. Finalmente, el Ecuador al ser un país dolarizado garantiza la estabilidad de la inversión (Sempértegui, 2022)

En Ecuador, el uso del cannabis es punible salvo para consumo propio y siempre que sea inferior a la cantidad establecida por la normativa correspondiente. A finales de 2019, al cannabis no psicoactivo o cáñamo se le excluyó de las sustancias catalogadas como sujetas a fiscalización, despenalizado para uso con fines médicos y terapéuticos, no así aquel para uso recreacional (Gallegos, 2020)

En el Ecuador se legalizó la producción de cannabis desde el año 2019, tiempo en el cual se ha emitido 46 licencias para la producción hasta la fecha, donde se tiene información que de 21 empresas ubicadas en las provincias de Pichincha Guayas, Tungurahua, Chimborazo y Cotopaxi. Los costos de implementación de una hectárea de cannabis para la provincia de Cotopaxi, oscilan entre USD 155.541 y, USD 177.955 depende de la utilidad, del material vegetal como semilla o plántula respectivamente (Changoluisa & Peñafiel, 2021).

5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los principales beneficiarios para ejecutar este proyecto fueron los estudiantes de Agronomía, con la implementación del protocolo para la obtención de vitroplantas de cannabis.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de dos medios de cultivo (Murashigue skoog y Carbón activado) y dos concentraciones ($0,0,5 \text{ mg/L}^{-1}$, 1 mg/L^{-1}) de ácido giberélico en el crecimiento de vitroplantas de cannabis.

6.2. Objetivos específicos

- Establecer el protocolo para la obtención de vitroplantas.
- Determinar el medio de cultivo adecuado para la obtención de vitroplantas.
- Comparar el mejor nivel de ácido giberélico para el desarrollo de vitroplantas.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIO DE VERIFICACIÓN
<p>1. Establecer el protocolo para la obtención de vitroplantas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuación del laboratorio para la obtención de vitroplantas bajo protocolo. - Zona de micro propagación - Instalación de luces LED - Instalación de luz eléctrica -Preparación de cámara de flujo laminar. -Calefacción -Desinfección del aérea -Desinfección del equipo -Desinfección de semillas -Preparación de medios de cultivo -Siembra 	<ul style="list-style-type: none"> ● Instalaciones adecuadas para la producción de vitroplantas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Equipos instalados ● Fotografías
<p>2. Determinar el medio de cultivo adecuado para la obtención de</p>	<p>1. Preparación de los dos medios de cultivo (Murashigue skoog y Carbón activado) bajo el protocolo</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Medios de cultivos preparados 	<ul style="list-style-type: none"> ● Fotos ● Frascos ● Tubos de ensayo

vitroplantas.	<p>establecido.</p> <p>2. Formulación del primer medio de cultivo con carbón activado</p> <p>3. Formulación del medio de cultivo Murashige y Skoog sin carbón activado más ácido giberelico</p> <p>4. Formulación del medio de cultivo Murashige y Skoog con Agar Agar.</p>		con medios de cultivo.
3. Determinar la mejor concentración de ácido giberélico para vitroplantas.	<p>- Concentración de la Fitohormona ácido giberélico</p> <p>-Pesar el ácido giberélico 0.5 mg/L⁻¹</p> <p>- Pesar el ácido giberélico 1 en mg/L⁻¹</p> <p>-Tablas de comparación</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Hormonas preparadas para la aplicación 	<ul style="list-style-type: none"> ● Fotografías ● Fórmula ● Frascos de los medios de cultivo con las fitohormonas

Elaborado por: (Paredes & Velez, 2023)

8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

8.1. Origen Cannabis

Cannabis se sitúa en Asia central o en la India, pero serían China y la India las primeras que la domesticaron. Posiblemente Asia central no sea el origen, pero allí es donde hay información escrita más antigua y su uso para producir fibras y confeccionar diversos productos textiles, data del 4000 a.C, mientras que su registro de uso en la medicina tradicional data de 2700 a.C (Guadalupe. A, 2014).

8.2. Taxonomía

“El cannabis sativa es una planta herbácea tropical, con hojas opuestas, palmadas compuestas, imparipinnadas, con folíolos en número variable, generalmente más de cinco en las plantas adultas, aunque su número y tamaño va disminuyendo a medida que la planta empieza a desarrollar sus flores” (Esteban. J, 2021).

Tabla 2. Clasificación botánica del Cannabis sp.

Clasificación	Nombre
Reino	Plantea
Subreino	Traqueobionta
Supervisión	Espermatofita
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelididae
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Genero	Cannabis
Especie	Sativa
Nombre binomial	Cannabis sativa

Fuente: (Sativa, Descripción de La Planta Cannabis, s.f., s.f.)

8.3. Características Botánicas

“Cannabis sativa es una planta herbácea anual de hasta 4 m de alto, dioica, de tallo erecto y hojas palmadas estipuladas, las inferiores opuestas y las superiores alternas. Las hojas se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de entre 3 a 9

foliolos angostos, de ápice agudo, con márgenes serrados y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés de un color más claro”. (Ángeles, 2014).

Los tricomas glandulares producen una resina como una forma de proteger a la planta contra las agresiones externas. Tiene inflorescencias en las axilas de las hojas superiores o al terminar las ramas, con brácteas herbáceas y glandulosas. Las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores; mientras que, las femeninas son densas, pero con pocas flores (de 5 a 8). Las flores masculinas son pediceladas, con perianto de 5 tépalos; y las femeninas son sésiles, con perianto entero, membranáceo y pegado al ovario, persistente en el fruto, ovario con un sólo óvulo y 2 estigmas. El fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimida, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto (Ángeles, 2014).

8.4. Aspectos morfológicos del cannabis sativa L.

Imagen 1. Aspectos Morfológicos del cannabis (Cannabis sp)



Fuente: (Para et al., 2010)

8.4.1. Raíz

La raíz principal es pivotante y esta puede llegar a medir entre 30-40 cm de profundidad y a partir de ella provienen muchas raíces secundarias, principalmente en los primeros 15-20 cm. La raíz completa supone alrededor de 10% total de la planta (Lopez, 2003).

Imagen 2.Raíz

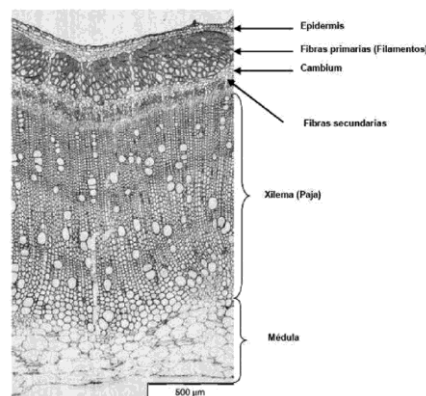
Fuente: (Sinha, 2020)

8.4.2. Tallo

El tallo es de forma recta, hueco, cónica, circular, aunque en determinadas partes presenta unas acanaladuras, el diámetro es mayor en el área de la base, disminuye en función de la altura, los entrenudos son largos y se acortan conforme se aproximan al ápice. (Lopez, 2003)

La corteza, está compuesta por 65-70% de celulosa, 10-15 % de hemicelulosa y 3-5% de lignina. Los haces fibrosos del tallo se disponen de fibras primarias y secundarias. Las primarias tienen una sección transversal e irregular y una pared espesa que no cierra el lumen interno, la longitud varía de 5 a 40 mm y 20-50mm de diámetro. La fibra secundaria es menos irregular y más delgada, las paredes espesas llenan completamente el lumen interno y están fuertemente lignificadas, su longitud varía de 2-4 mm y el espesor es de 15-17mm (Lopez, 2003).

Imagen 3. Estructura de la sección transversal del tallo de una planta de cáñamo

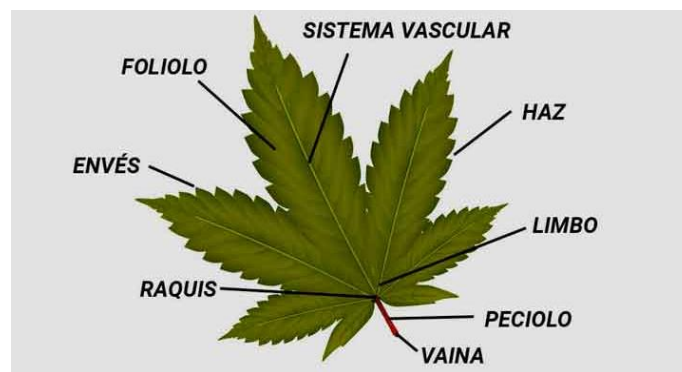


Fuente: (Lopez, 2003)

8.4.3. Hojas

Las hojas cambian su forma y tamaño en función de la posición que ocupan en el tallo y el sexo de la planta. Son palmeadas, las primeras hojas producen solamente un foliolo, pero a medida que va creciendo la planta aumenta el número de foliolos. En la planta madura estos pueden mostrarse desde 5 y 11 generalmente 7, lanceolados. El haz muestra un color verde más intenso que el envés, la longitud es de 15-20cm y el ancho de 1-3cm (Lopez, 2003).

Imagen 4. Detalle de hoja de cannabis sativa



Fuente: (Jobs, 2019)

8.4.4. Flores

En las flores masculinas se presenta con forma ramificadas, también presentan un mayor número de brácteas largas, forman panículas axilares, presentan 5 sépalos y estos pueden ser de color amarillo o púrpura. Al madurar estas se abren para dejar al aire 5 estambres (Lopez, 2003).

Imagen 5. Detalle de una flor masculina examinada abierta



Fuente: (Meyers, 1897)

Las flores femeninas son frondosas y cortas. Al estar muy agrupadas parece que forman una espiga, pero son flores simples. Tienen un cáliz verde, delgado con una fisura en el costado que encierra en el ovario y permite que salgan uno o dos estigmas. (Lopez, 2003)

Imagen 6. Estructuras de una flor de Cannabis



Fuente: (Meyers, 1897)

8.4.5. Semilla

La semilla se origina en el interior de un aquenio que tiene de 3-6mm de largo y 2,5-4mm de ancho, tiene su forma ovalada y de un color pardo grisáceo o moteado, el pericarpio es duro y está compuesto de dos valvas soldadas y el peso varía entre 3 y 60mg, generalmente estas oscilan entre 15-20mg (Lopez, 2003).

Imagen 7. Detalle de semilla cannabis sp



Fuente: (GELÓS, 2022)

8.5. Fenología

Las semillas maduran en un periodo de tres a cinco semanas. La madurez de la semilla se alcanza cuando el 50% de las semillas están duras (código 2204), el fin de la madurez se alcanza cuando el 95% de las semillas están duras (Mediavilla, 1998).

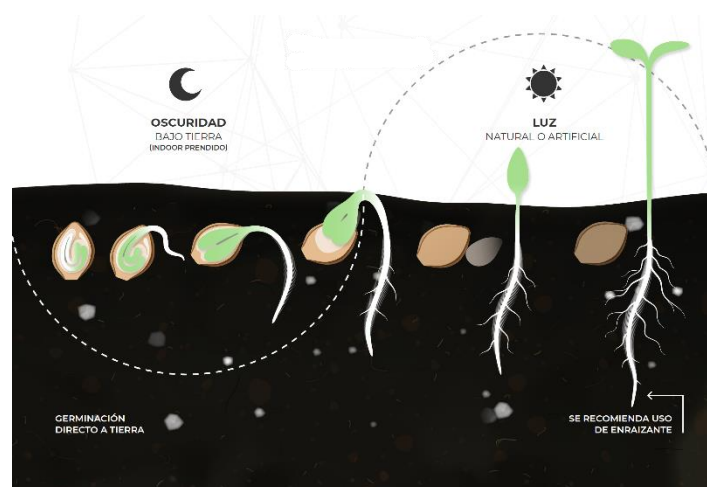
8.5.1. Germinación y emergencia

Luego de que la semilla se embebe en agua, la radícula se hace visible, emerge el hipocótilo y los cotiledones se despliegan por encima de la superficie.

La germinación es un proceso que comienza con la imbibición, es decir, con la toma de agua por parte de la semilla y finaliza cuando una parte del embrión atraviesa las estructuras que conforman la semilla, proceso denominado Emergencia, con lo cual comienza el crecimiento de la plántula. (Piranha, 2020)

La temperatura es fundamental cuando se realiza la germinación de una semilla, ya que este proceso en una primera instancia es químico y si la temperatura es baja las reacciones químicas serán más lentas o no se producirán, mientras que si la temperatura se encuentra dentro de rangos óptimos (entre 25° a 30°C), estas reacciones se realizarán de forma mas rápida, por lo que es necesario mantener una temperatura elevada durante toda la germinación de la semilla (Piranha, 2020).

Imagen 8. Germinación y emergencia en la etapa fenológica de cannabis sp.



Fuente: (Piranha, 2020)

8.5.2. Estado vegetativo (código de estadio principal 1)

El estado vegetativo se caracteriza por el crecimiento del tallo y las hojas, siendo tardía al principio, cuando se forman hasta cinco pares de hojas verdaderas y sus espacios entre nudos son cortos (Merfield, 1999)

Imagen 9. Tercer par de hojas en el estado vegetativo de las etapas fenológicas del cannabis
st.



Fuente: (Merfield, 1999)

8.5.3. Floración y formación de semilla (código de estadio principal 2)

El cambio de filotaxis (posición de las hojas) de opuesta a alternada (Merfield, 1999), es un indicador al comienzo de este estadio fenológico principal, y necesita básicamente del cultivar y del largo del día.

Imagen 10. Cambio de filotaxis en la etapa de floración y formación de semilla del cannabis
sp.



Fuente: (Merfield, 1999)

8.5.4. Senescencia (código de estadio principal 3)

Luego de la floración de las plantas dioicas macho, de igual forma que luego de la madurez de semilla en plantas monoicas o dioicas hembras, las hojas y los tallos comienzan a secarse, y después de un tiempo la planta muere (en algunos lugares debido a las heladas) y la descomposición del tejido del tallo libera las fibras del floema (et, 1998)

8.6. Biotecnología vegetal: aplicaciones en mejoras de cultivos

La Biotecnología Vegetal (BV) es el conjunto de técnicas utilizadas para mejorar las variedades de plantas en función de características de interés agrícola y de ornamentación. Esta línea de investigación comprende conocimientos de diversas áreas de la ciencia como bioquímica, agronomía, biología celular y genética. Con su aplicación se pueden obtener nuevos productos y modificar las características de otros, el aumento en su productividad, volumen y resistencia a condiciones adversas como las generadas por bacterias, virus, hongos, sequía, salinidad, frío y calor (Gutierrez, 2002).

8.7.Requerimiento para el cultivo in vitro

El cultivo in vitro de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman lo dicho y que deberán ser controlados. (Castillo, 2014)

Los factores a tomarse en cuenta para el desarrollo de cultivo in vitro son:

Ambiente físico

- temperatura
- luz y fotoperiodo
- humedad

8.8.Ambiente físico

8.8.1. Temperatura

Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz (Raphael, 2019).

8.8.2. Luz y fotoperiodo

Un cultivo in vitro se utiliza la luz para el proceso de foto morfogénesis, muy diferente a las plantas en el campo que lo utilizan para fotosíntesis, actualmente la mayoría de laboratorios de cultivo in vitro usan luz artificial y poseen un ambiente controlado (Vittorio, 2020)

8.8.3. Luz en la micropropagación

Los factores de espectro de luz que influyen en la planta tenemos: la elongación del tallo, ramificación, extensión de pigmentos de hojas.

La multiplicación asexual en cultivo in vitro es muy importante para la propagación de las plantas. Las plántulas obtenidas de esta manera deben aclimatarse y transferirse a condiciones ex vitro para un mayor crecimiento. Se ha estudiado la influencia de la iluminación LED en la organogénesis in vitro, así como en la embriogénesis somática, en una variedad de especies de plantas.

La emisión de banda de ondas estrecha y el control dinámico de la intensidad de la luz en los sistemas de iluminación basados en LED permiten la personalización de la calidad espectral para adaptarse a los requisitos de las plantas (Vittorio, 2020).

8.8.4. Humedad

La humedad y requerimientos se determinan en lo siguiente:

- Temperatura: 24-28 °C
- Iluminación: $18.5 \mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s.}^{-1}$
- Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 horas oscuridad
- Calidad de luz: Lámparas LED, tipo luz día
- Humedad relativa: 50-70%

8.8.5. Temperatura y humedad en el cuarto de conservación

Se necesita un higrómetro, que permitirá monitorear día y noche la temperatura y humedad relativa según lo establecido al protocolo manejado. La temperatura debe ser de 24-28 °C y una humedad relativa de 50-70% (Vittorio, 2020).

8.9. Propagación por semillas.

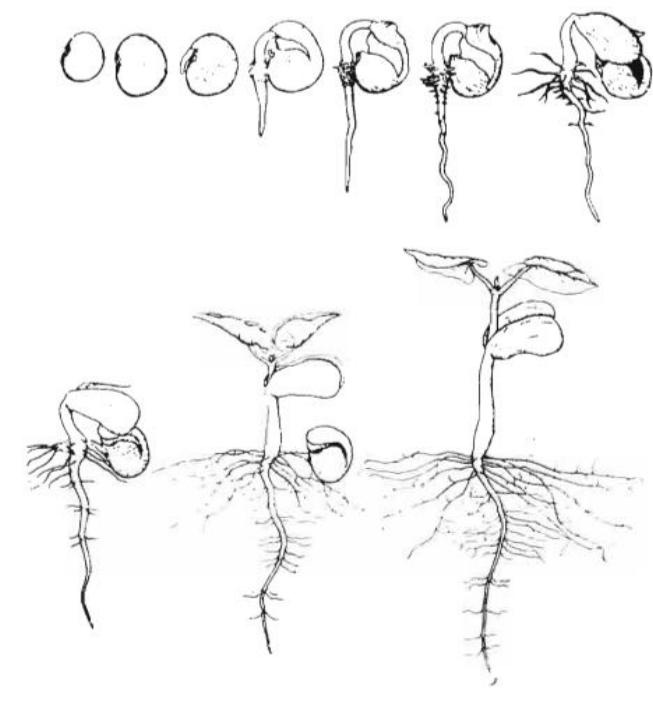
El posterior tratamiento hace que todas las bacterias y hongos: Antes de colocar las semillas en el sustrato de germinación, se necesita lavar las semillas con agua destilada esterilizada,

más 5 gotas de jabón líquido y antioxidantes como ácido cítrico y ascórbico (50 mg/litro). Inmediatamente se hacen cuatro (4) enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, se ejecuta una inmersión en etanol al 70% durante un minuto, según (Marquínez, 1998)

8.10. Germinación

La germinación es un proceso fisiológico que finaliza con la emergencia del embrión que está contenido en la semilla. Este proceso es influenciado por factores externos e internos. Para que una semilla germine debe ocurrir un proceso de absorción de agua que es conocido como imbibición. Este proceso activa procesos metabólicos que promueven la expansión del embrión, y desarrollo y emergencia de la radícula. La absorción de agua por la semilla es la etapa inicial de la germinación. Hay semillas que quedan en estado de dormancia por mayor tiempo por las concentraciones de compuesto inhibidores dentro de estas como lo es la hormona ácido abscísico. Algunas semillas requieren pasar por exposición a luz o a temperaturas que rompan el estado de dormancia. Hay procesos artificiales de romper la dormancia en las semillas conocido como escarificación en donde se utiliza procesos mecánicos, químicos, sumergir en agua a altas temperaturas para poder romper la cubierta externa de la semilla (Mayaquez, 2013)

Imagen 11. Germinación de semillas.



Fuente: (Ruiz, 2018)

8.11. Cultivo in vitro

El cultivo in vitro es una técnica que sirve para mejorar la técnica del cultivo tradicional inoculando diversidad de material vegetal (Castillo, 2014).

8.12. Materiales para el cultivo in vitro.

El laboratorio de micro propagación de tejidos vegetales debe contar con las instalaciones, el equipo y los reactivos necesarios para realizar investigaciones en diferentes tipos de plantas, permitiendo generar nuevos protocolos de micro propagación de plantas in vitro, que logren una propagación masiva, libre de enfermedades (Ramos, 2012).

Las instalaciones del laboratorio deben contar con: Área de oficinas, área de observación y examen, área de preparación de medios de cultivos (material de vidrio e instrumentos como la balanza de precisión, autoclave, guantes, máscara, reactivos como sales minerales, agar, sacarosa, antioxidantes, fitohormonas, desinfectantes como ácido hipocloroso, alcohol etílico, soluciones jabonosas, agitador magnético, criba vibradora, cámara de flujo laminar, vidriería como), área de lavado y esterilización, almacén, área de incubación o de crecimiento in vivo, área de flujos laminares o de transferencia, invernadero (Ramos, 2012).

8.12.1. Equipos

El Autoclave, utilizando estas propiedades, logra realizar la esterilización – de aquí se desprende que en algunos lugares se les llame coloquialmente “esterilizador” – o descontaminación por calor húmedo. Este método es el más usado en los laboratorios, debido a que produce mayor volumen de material estéril, destruye en un menor tiempo la materia infecciosa presente y no daña el material a esterilizar (siempre que este último sea apto para ser autoclavado) (Garrido, 2015).

El tiempo de esterilización oscilan por 15 minutos, sin embargo, en algunas oportunidades, dadas las características del material, es necesario variar el tiempo.

8.12.2. Cámara de flujo laminar

Las cámaras de flujo laminar proporcionan un área delimitada por superficies fáciles de limpiar y desinfectar con un flujo de aire filtrado a través de pre filtros, que retienen las partículas más grandes que están presentes en el aire, y por filtros HEPA (High Efficiency

Particulate Air), que son filtros de alta eficiencia capaces de retener partículas $\geq 0,3 \mu\text{m}$ con una eficiencia mínima del 99,97% (Rossi, 2001).

8.12.3. Cuarto de Crecimiento

Las condiciones de incubación o crecimiento de material in vitro de yuca son (Roca y Mrogiskin, 1993)

- Temperatura: 27°-280° C
- Iluminación :18.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 de oscuridad
- Calidad de luz: Luces LED
- Humedad relativa: 50-70%

8.13. Medios de cultivo

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas. Durante las últimas décadas, la técnica del cultivo “in vitro” ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas. (Rivas, 2016).

Las plantas requieren medios sencillos para desarrollarse debido a su metabolismo que pueden usar compuestos simples y producir más complejos, por ello para plantas in vitro se puede usar cualquier formulación que se adapte con el tejido a trabajar, no contando con una formulación específica, además se puede ir variando las condiciones (pH, salinidad, nutrientes) según se requiera para tener en cuenta su mayor producción o se adapte fácilmente al entorno real al que se las va a trasplantar (Rivas, 2016).

Para las formulaciones se requiere de macro y micronutrientes que cada uno cumple una función distinta pero esencial en la planta, la falta de uno de ellos puede ocasionar estrés y por ende menor crecimiento, mientras la presencia de algunos de ellos sirve como potenciadores. La característica principal es que se mantienen estériles y con las condiciones estables durante el crecimiento de la planta, permitiendo que agentes externos no puedan interferir en su desarrollo. Los medios son de composición conocida estando constituidos básicamente por

una fuente de carbón activado, nutrientes minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, agente gelificante y, en algunos casos, otros compuestos asociados (Seabroo, 1980)

8.14. Medio de cultivo Murashige y Skoog

8.14.1. Descripción.

El medio de cultivo más utilizado es Murashige & Skoog. El cual se compone de diverso macro y micronutrientes, medio para preparación de cultivos in vitro de plantas según (NOVACHEM DEL ECUADOR, s.f.)

8.14.2. Propiedades

Solubilidad: agua

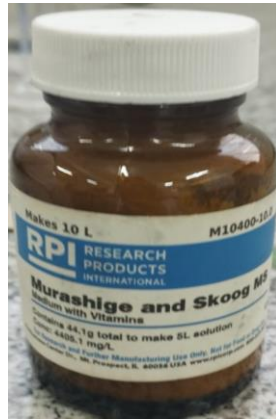
Temperatura de almacenamiento: temperatura ambiente

Mezcla de sal basal que contiene micro y macro elementos con vitaminas como describen Murashige y Skoog (1962).

Apariencia: Polvo blanco

- Nitrato de amonio: 1650,00 mg / l
- Cloruro de calcio anhidro: 332,02 mg / l
- Sulfato de magnesio anhidro: 180,54 mg / l
- Microelementos MS: 69,53 mg / l
- Mezcla de vitaminas MS: 103,10 mg / l
- Dihidrógeno fosfato de potasio: 170,00 mg / l
- Nitrato de potasio: 1900,00 mg / l

Imagen 12. Presentación del medio Murashige y Skoog.



Fuente: (Paredes & Velez, 2022)

8.15. Carbón activado

“El carbón activado tiene poros que pueden atrapar sustancias químicas que puede fabricarse a partir de diversas materias primas carbonosas. Los principales productos comerciales se fabrican a partir de cáscara de coco, carbón mineral, turba y madera. El proceso de activación implica el tratamiento de la materia prima por medio de vapor o compuestos químicos, de forma que se consigue una estructura porosa” (Smith, 2000)

Generalmente las células iniciales de un cultivo no son activas fotosintéticamente y requieren de una o más fuentes de carbono. Sacarosa y glucosa en concentraciones son los carbohidratos más usados en el cultivo *in vitro* de organismos vegetales (Smith, 2000). Se pueden ser usados otros compuestos (Elshahed, 2012)

“El carbón activado en el cultivo de tejidos, ya que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento. La capacidad de adsorción se debe a su fina red de poros y su amplia área interna, esto conlleva a favorecer a diferentes procesos de morfogénesis; además, se plantea la posibilidad que el carbón activado pueda ir liberando lentamente alguno de los reactivos adsorbidos, favoreciendo su respuesta en el cultivo de tejidos”.

El carbón activado pueda ir liberando lentamente alguno de los reactivos adsorbidos⁴, favoreciendo su respuesta en el cultivo de tejidos. El carbón activado puede adherir en su superficie una gran diversidad de moléculas (capacidad de adsorción) ya que posee una

estructura porosa, elevada área superficial y alta concentración de sitios activos. (Ivonne Vaca, 2018)

8.16. Giberelinas.

Según (Montenegro, 2017) Las giberelinas son hormonas que estimulan el crecimiento principalmente vía división y alargamiento celular, siendo protagónicas en este último; regulan al proceso de germinación y en cucurbitáceas favorecen el desarrollo de las flores masculinas. También intervienen en procesos de inhibición de senescencia e inhibición floral y radical.

En términos prácticos promueven el alargamiento de entrenudos, aumentan el tamaño de frutos, inducen partenocarpia en algunas especies frutales y retrasan maduración, entre otras cosas. Existen más de 130 giberelinas en las plantas, pero muy pocas tienen actividad biológica, las más destacadas son la GA₁, GA₃ y GA₄, todas presentan un movimiento acropétalo (hacia arriba) y basipétalo (hacia abajo). Los nutrimentos como el N, Zn, B y Ca tienen amplia relación con su síntesis y acción, de manera que deben estar en niveles adecuados.

Según (ANASAC, 2010) El Ácido giberélico GA₃ fue descubierto por un grupo de científicos japoneses mientras desarrollaban un estudio de un extracto del hongo (*Gibberellum fugikunoi*) responsable una enfermedad en los cultivos de arroz. Hoy se conocen más de 150 hormonas diferentes de este grupo. Se encuentra en grandes cantidades en los órganos jóvenes de las plantas, especialmente en los puntos de crecimiento (zonas apicales) y en las hojas jóvenes en proceso de formación.

8.16.1. Efectos fisiológicos

- Controlan el crecimiento y elongación de los tallos.
- Estimula la elongación del escapo floral.
- Inducen la floración en plantas de día largo cultivadas en época no apropiada
- Estimulan el crecimiento y desarrollo de frutos
- Rompen la dormición de las semillas.
- Inducen formación de flores masculinas en plantas de especies diclinas.

- Reemplazan la necesidad de horas frío.
- Aumentan la fructificación.
- Suprimen el estrés producido por algunos virus.

Se localizan grandes niveles de giberelinas en las partes reproductivas en comparación con las vegetativas y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. (ANASAC, 2010)

8.17. Reguladores de crecimiento.

Según (Cortes, 2019) Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales, son frecuentemente utilizados en cultivos *in vitro*, pues asumen labores de vital importancia en procesos de elongación, tropismos y dominancia apical. (Cortés, 2019)

A continuación, se detallan las principales fitohormonas:

8.18. Efectos en los cultivos in vitro.

Según (Ruben, 2021) el ácido giberélico (GA3) la más popular giberelina entre los cultivadores de cannabis, siendo además la más efectiva y accesible. Descubierta por investigadores japoneses en la década del 1920 en el hongo llamado *Giberella fujikuroi*, pronto demostró producir un crecimiento anormalmente elongado en los cultivos.

Los cultivadores de cannabis también han sabido aprovechar las ventajas de estas hormonas, especialmente para germinar semillas viejas o mal conservadas, e incluso para producir semillas feminizadas. En efecto, al aplicarse en la concentración correcta el ácido giberélico induce la formación de flores macho en ejemplares hembra. (Ruben, 2021)

En general el crecimiento y la diferenciación ocurren sin giberelinas, en el caso de cultivos de células en bajas densidades son sin embargo esenciales.

- Efecto sobre la morfogénesis.
- Inhibe la formación de embriones somáticos.
- Tiene poco o ningún efecto en la diferenciación de células.
- Estimula el crecimiento y el desarrollo en órganos preformados (meristemo)

generalmente impide la formación de raíces, en el cultivo de ápices estimula el crecimiento y su presencia es generalmente crítica para permitir la elongación de los tallos formados.

8.19. Agentes contaminantes.

Según (González) Los contaminantes más frecuentes en condiciones in vitro son los hongos, las bacterias y levaduras, denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips). También ocurre durante el proceso de introducción, principalmente es generada por transferencia de esporas o a través del aire o contacto con objetos esterilizados de forma incorrecta.

9. HIPOTESIS

9.1. Hipótesis Nula

La aplicación de dos medios de cultivo (Murashige Stook y Carbón Activado) en Cannabis (*Cannabis sp*) y tres concentraciones de ácido giberélico no afectan al crecimiento de las plantas obtenidas por germinación In-Vitro.

9.2. Hipótesis Alternativa

La aplicación de dos medios de cultivo (Murashige Stook y Carbón Activado) en Cannabis (*Cannabis sp*) y tres concentraciones de ácido giberélico afectan al crecimiento de plantas obtenidas por germinación In-Vitro.

10. METODOLOGÍA

10.1. Ubicación y duración de la investigación

El proyecto se ejecutó en la Ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi en la Universidad Técnica de Cotopaxi, Campus Salache en el laboratorio protección vegetal, Facultad CAREN. El tiempo de duración es de 55 días de trabajo en el laboratorio y 20 días del establecimiento del ensayo, periodo en el cual se evaluó los resultados de las siguientes aplicaciones de fitohormonas (ácido giberélico) en distintas concentraciones (0 mg/L-1, 0.5 mg/L-1 y 1 mg/L-1), para el desarrollo de vitroplantas en dos formulaciones de Murashige Skoog y Carbón Activado.

10.2. Condiciones de laboratorio

Las condiciones son manejadas como se puedes observar en la siguiente tabla.

Tabla 3. Condiciones del laboratorio

Parámetros	Promedios
Iluminación	Facultativa
Temperatura	24-28°C
Humedad	30-70%

Elaborado por: (Paredes y Vélez, 2023)

10.3. Tipo de investigación

10.3.1. Experimental

Es de tipo experimental ya que permitió realizar el procedimiento bajo condiciones del laboratorio en el cual se comparó dos especies de cannabis, dos medios de cultivo (Murashige Skoog y Carbón Activado) y tres concentraciones hormonales en el desarrollo de vitroplantas.

10.3.2. Bibliográfica

El apoyo fue tomado de las diferentes investigaciones llevado a cabo anteriormente, para la creación tanto del protocolo como de la investigación.

10.4. Materiales y Equipos

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la investigación.

Sustancias	Equipos	Materiales
Cloro al 3%	Autoclave	Tubos de ensayo
Alcohol al 75%	Destilador de agua	Papel aluminio
Agar – Agar	Plancha de calentamiento	Pinzas de desinfección
Sacarosa	PH – metro	Bisturí
Agua destilada, esterilizada	Microondas	Frascos de vidrio
Alcohol industrial	Cámara de flujo laminar	
Hipoclorito de sodio	Balanza Analítica	
Alcohol anticonceptivo	Refrigerador	
	Agitador magnético	
	Taimer	
	Mechero	

Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.5. Factores en estudio

Los factores de estudio en la presente investigación fueron:

Tabla 5. Factores en estudio

Factor A= Medios de Cultivo	Factor B= Concentraciones Hormonales	
A1= Murashige y Skoog sin Carbón Activado	Ácido giberélico	0
A2= Murashige y Skoog con Carbón Activado	Ácido giberélico	0,5 mg/L ⁻¹
	Ácido giberélico	1 mg/L ⁻¹

Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.6. Manejo metodológico del ensayo

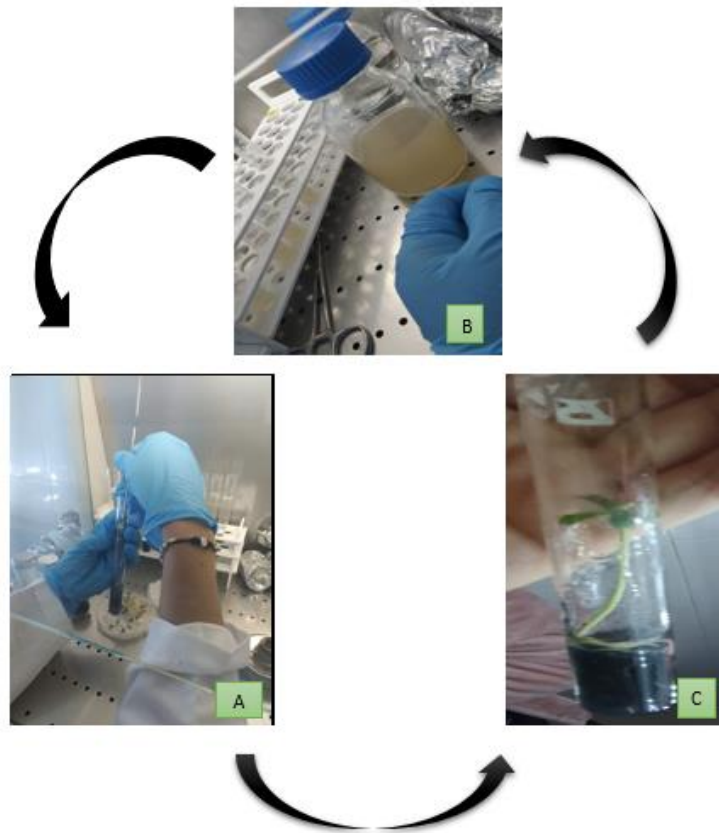
10.7. Fase de establecimiento

10.7.1. Preparación del material vegetativo según la metodología de (Gisel Villezcas)

Las semillas fueron almacenadas a -20° -25°C durante 2 meses, las mismas fueron desinfectadas (A) siguiendo la metodología de (Villegas, 2020); este proceso se lo realizó en la cámara de flujo laminar.

“Para la producción de vitroplantas, se germinaron las semillas en tubos de ensayo y cajas Petri con Agar-Agar (B), durante dos semanas dentro del cuarto de crecimiento en condiciones controladas (C)”.

Figura 1. Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo



Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.7.2. Preparación del medio de cultivo e incorporación de la fitohormona siguiendo el protocolo establecido por (McKendrick, 2000). (Ver anexo 1)

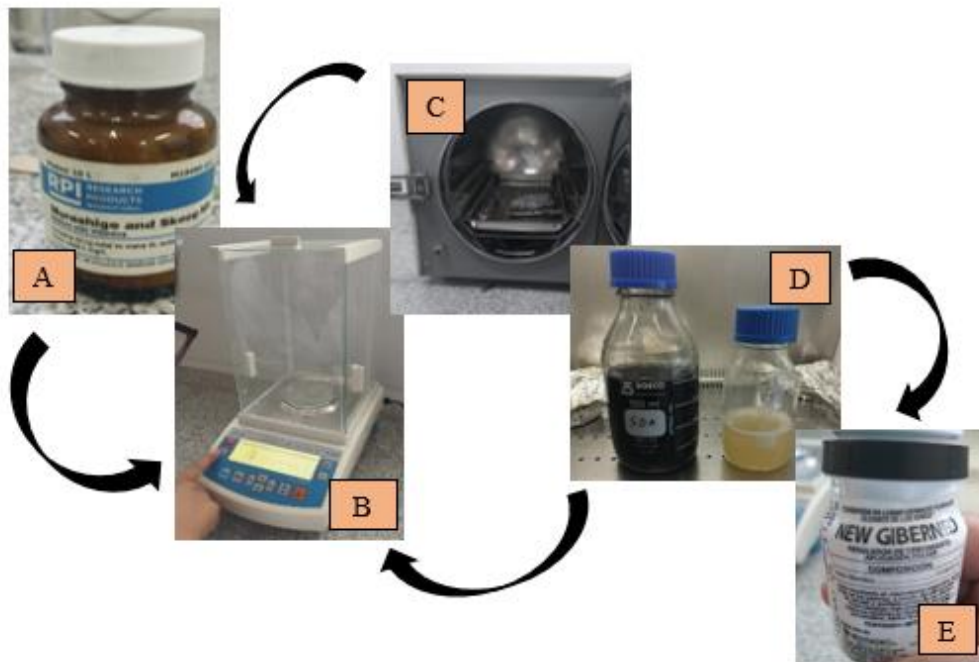
10.7.2.1. Murashige y Skoog con carbón.

Según (Suman Chandra, Ikhlas Khan & Mahmoud A. ElSohly , 2008) (A), Cuando los brotes elongados se transfirieron a un medio MS medio enriquecido con 500 mg l⁻¹ de carbón activado y 2,5 μ M de ácido indol-3-butírico, el enraizamiento fue del 95%. Auto clavado a 121 °C durante 20 minutos se utilizó el medio Murashige y Skoog más la adición de giberelina (C) en diferentes concentraciones (mg/l⁻¹) (E)”.

10.7.2.2. Murashige y Skoog sin carbón.

El medio de cultivo fue Murashige y Skoog, 1962 (A), con sacarosa 3.0% (p/v) (B), pH ajustado a 5.8 y previamente autoclavado a 121 °C durante 20 minutos se utilizó el medio Murashige y Skoog más la adición de ácido giberélico(C) en diferentes concentraciones (mg/l⁻¹) (D). (Skoog, 1962).

Figura 2. Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo

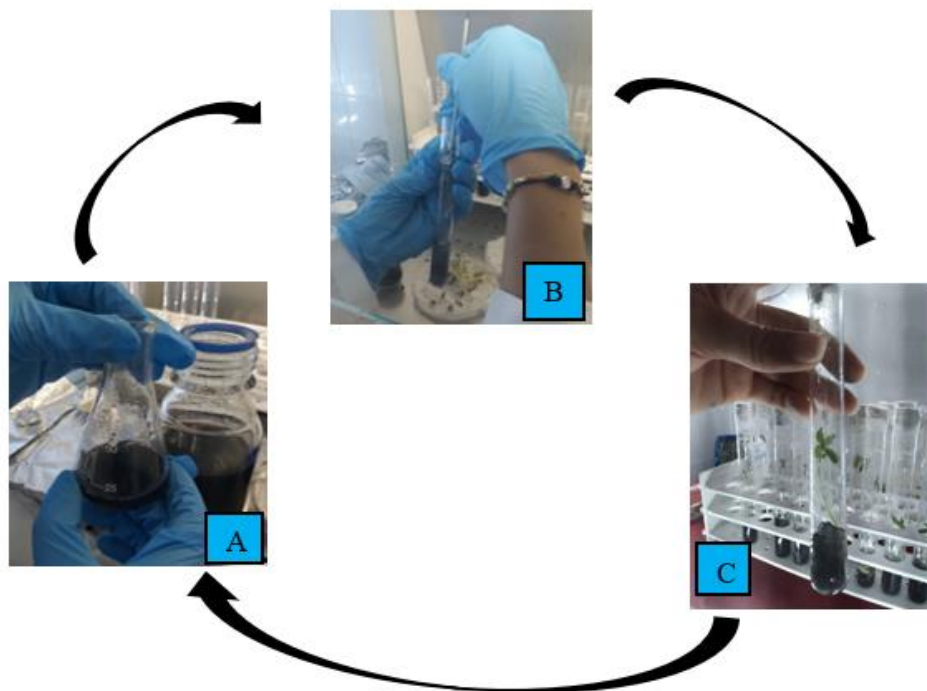


Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.8. Siembra de vitroplantas en el medio de cultivo siguiendo la metodología de (Alchimiaweb, 2021)

Según (Alchimiaweb, 2021) Se realiza dentro de una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación indeseada. Una vez el material vegetal ha sido desinfectado, se introduce en un medio de cultivo estéril y se espera a que empiece a brotar, lo que puede tardar una o dos semanas. Se colocaron 30 ml de medio por cada tubo de ensayo (A) tomando todas las medidas de bioseguridad para evitar la contaminación de los medios de cultivo y el material vegetativo, por lo que fue necesario la desinfección de los materiales, equipos y manos. Finalmente, colocadas las vitroplantas en los tubos de ensayo (B) se sellaron con papel aluminio y parafilm (C).

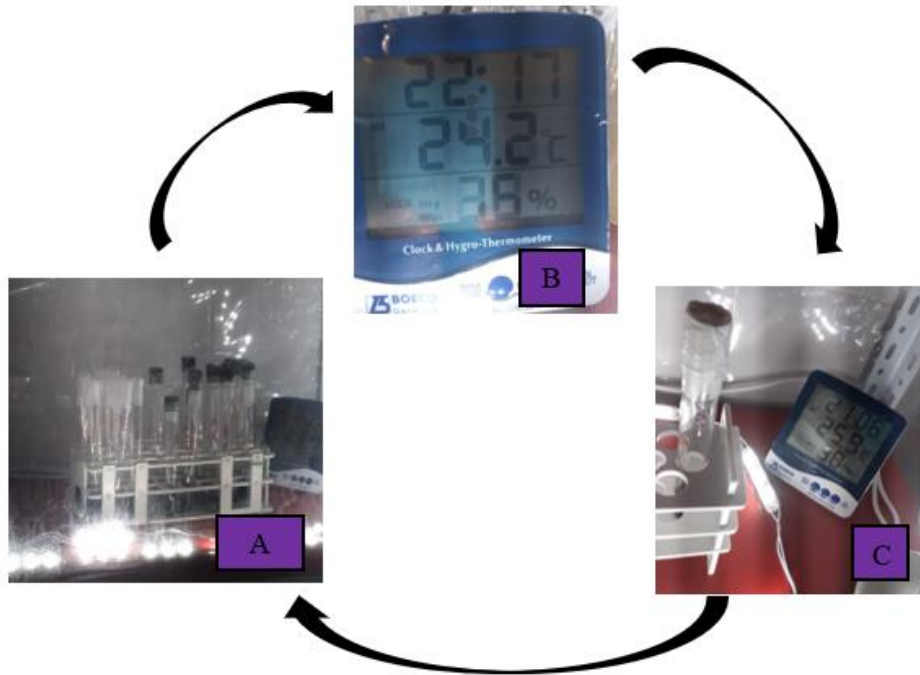
Figura 3. Proceso para la siembra de las vitroplantas con sus respectivos tratamientos.



Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.8.1.1. Traslado al cuarto de crecimiento basado

“La siembra de las vitroplantas de Cannabis (*cannabis* sp) se finaliza al cubrirlas con papel aluminio y parafilm, en el cual se tomó en cuenta la fecha del trasplante, lo cual se trasladó hacia el cuarto de crecimiento (A) en el que se tomaran datos durante 20 días en condiciones favorables como es la temperatura de 20-25°C (C), una iluminación de 16 horas luz y 8 horas de obscuridad (A), también una humedad relativa de 30 al 75%. En esta fase las vitroplantas permanecieron en el cuarto de incubación de ambiente controlado, con luz blanca de lámparas led, 16 horas luz:8 horas oscuridad, y temperatura media de 25 a 27°C (C)”.

Figura 4. Traslado de los tratamientos al cuarto de crecimiento

Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.9. Esquema experimental

Tabla 6. Esquema del experimento

Tratamientos	Descripción	Unidades	Repeticiones	Total
T1	Murashige y Skoog + Ácido giberélico 0	1	2	2
T2	Murashige y Skoog + Ácido giberélico 0,5 mg/L ⁻¹ .	1	2	2
T3	Murashige y Skoog + Ácido giberélico 1 mg/L ⁻¹ .	1	2	2
T4	Murashige y Skoog + Carbón activado + Ácido giberélico 0	1	2	2
T5	Murashige y Skoog + Carbón activado + Ácido giberélico 0,5 mg/L ⁻¹ .	1	2	2
T6	Murashige y Skoog+ Carbón activado + Ácido giberélico 1 mg/L ⁻¹ .	1	2	2
	Total			12

Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

10.10. Variables evaluadas

Durante la fase de introducción in vitro se tomaron en cuenta las siguientes variables (Altura de planta, Número de hojas)

10.10.1. Altura de planta

Para evaluar esta variable se tomaron datos con una regla en el periodo de 15 días con una secuencia de cada tres días.

10.10.2. Número de hojas

Esta variable se evaluó, tomando en cuenta el numero de hojas desde el inicio del experimento hasta el final del experimento durante 20 días.

10.11. Elaboración del protocolo

Se realizó un análisis bibliográfico para la obtención del protocolo.

11. DISEÑO EXPERIMENTAL

“El diseño experimental que se utilizó fue un DBCA, diseño completamente al azar, con 8 tratamientos y 2 repeticiones utilizando la prueba de rangos múltiples de tukey al 5%”.

Tabla 7. Fuente de variación y grados de libertad

FUENTE DE VARIABLE	GRADOS DE LIBERTAD
VARIEDAD	1
MEDIOS	1
CONC	2
REPETICIONES	7
VARIEDADES*MEDIOS	1
VARIEDAD*CONC	1
MEDIOS*CONC	1
VARIEDAD*MEDIOS*CONC	1
ERROR	2
TOTAL	17

Elaborado por: (Paredes & Vélez, 2023)

11.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

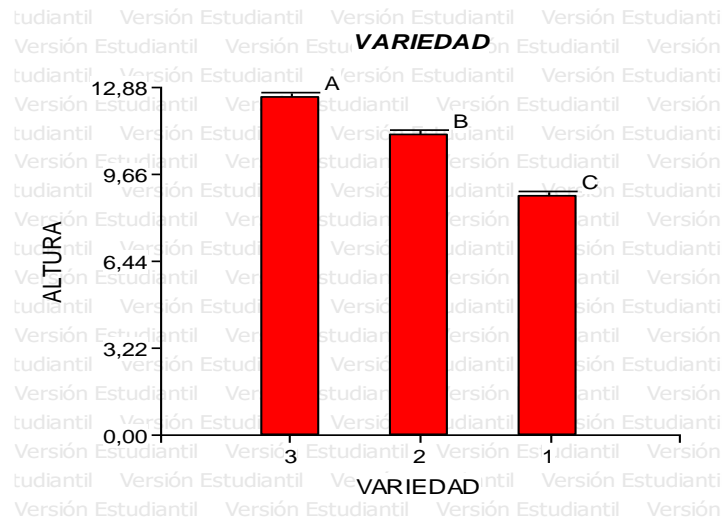
Tabla 8. Cuadro de análisis de varianza para la altura de la planta a los 20 días

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	179,17	18	9,95	20,17	<0,0001**
VARIEDAD	98,47	2	49,23	99,76	<0,0001**
MEDIOS	10,8	1	10,8	21,88	0,0001**
CONC	26,47	2	13,23	26,81	<0,0001*
REPETICIONES	4,69	1	4,69	9,5	0,0045
VARIEDAD*MEDIOS	0,6	2	0,3	0,61	0,5513
VARIEDAD*CONC	1,36	4	0,34	0,69	0,604ns
MEDIOS*CONC	1,8	2	0,9	1,82	0,1795
VARIEDAD*MEDIOS*CONC	5,41	4	1,35	2,74	0,0477*
Error	14,31	29	0,49		
Total	193,48	47			
	CV		6,55		

Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

Se observa en la (tabla 8) del análisis de varianza para altura de planta a los 20 días se determina que existe diferencias significativas en el factor A, medios de cultivo y el factor B, concentraciones ácido giberélico, muestra significancia en la interacción A*B*C, con un coeficiente de variación 6.55%.

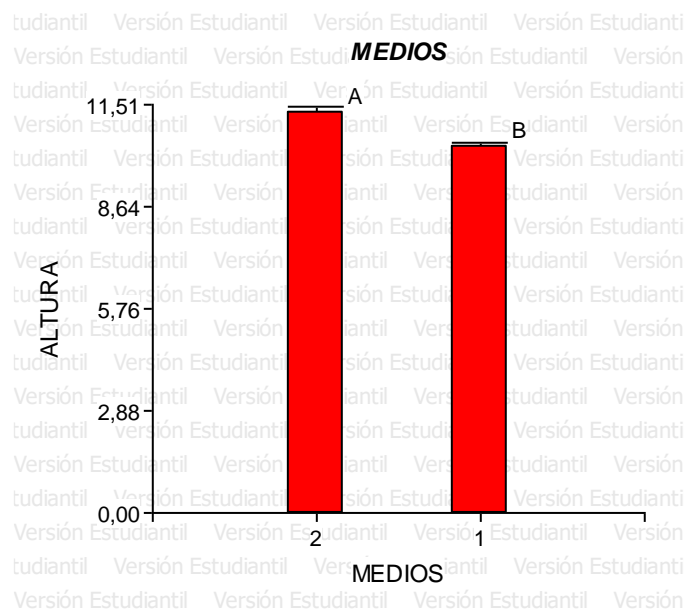
Figura 5. Prueba de Tukey 5% para las variedades



Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

En el (grafico 1) del análisis de Tukey al 5% para la variable altura de planta a los 20 días se muestra que mejor se presentó Cannabis, con un promedio de 12,88 cm; seguido de la variedad Lemon bernie, con un promedio de 9,66 cm , esto puede ser efecto de que presenta una estructura muy equitativa, con el crecimiento y glotonería tan típico de las sativas según lo expuesto por (McKendrick, 2000) y donde (Alchimia, 2009), expone que las sativas pueden superar fácilmente los cuatro metros de altura.

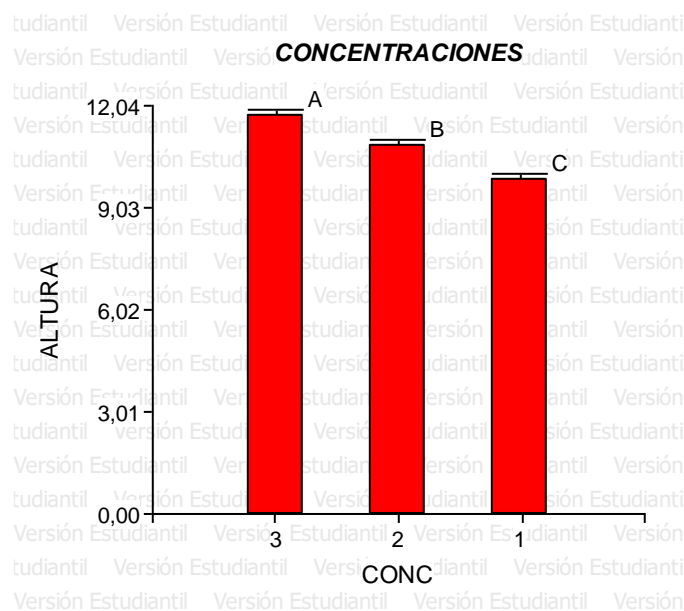
Figura 6. Prueba de Tukey 5% para los medios



Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

Se puede observar en el (grafico 2) del análisis de Tukey al 5% para los medios altura de planta a los 20 días se muestra que el medio que mejor altura presento fue la (Murashigue y skoog + carbón activado + ácido giberélico), con un promedio de 11,51 cm; el medio (Murashigue y skoog + ácido giberélico) , con un promedio de 8,64 cm , esto se debe al efecto que hace al carbón activado, según (Ivonne Vaca, 2018), la adición de carbón activado en el cultivo de tejidos, ya que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, lo cual tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento³ .

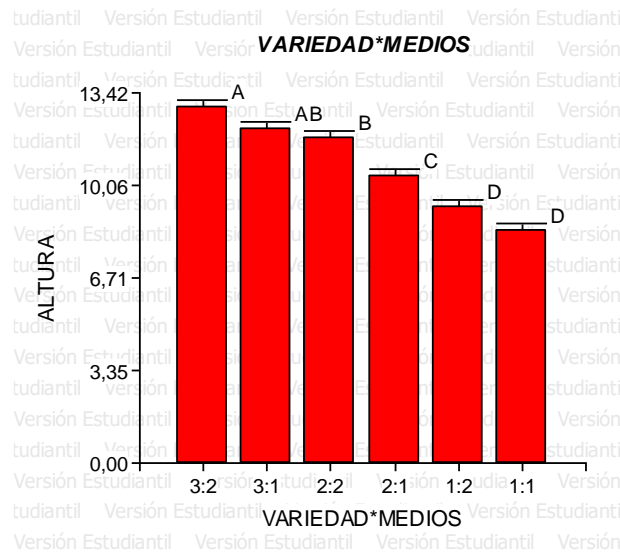
Figura 7. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones.



Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

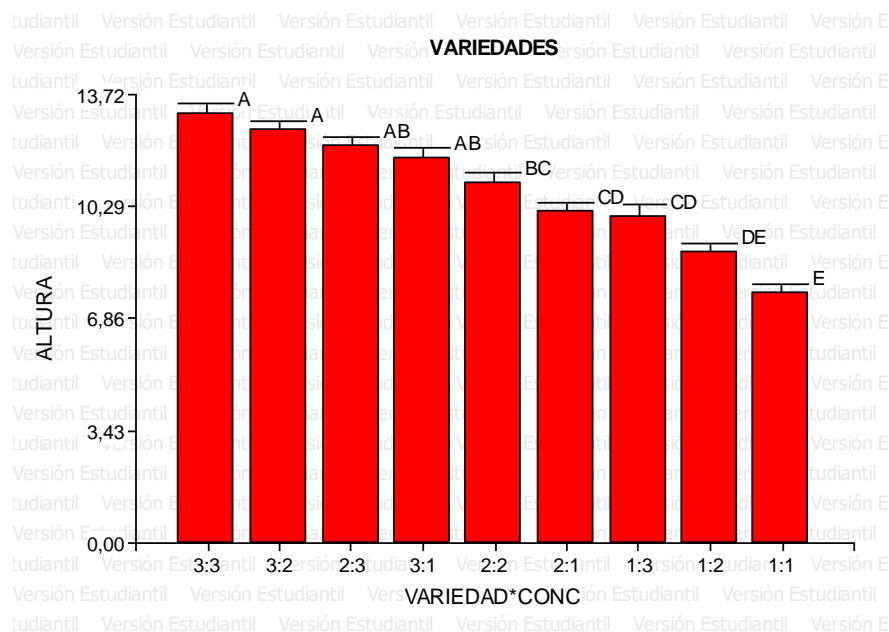
Se observa que la Concentración que dio más resultado con (ácido giberélico 1 mg/ L⁻¹) con un promedio de 12,04cm esto se debe a que la giberelina es una hormona que ayuda al crecimiento y desarrollo de las plantas invitro, la concentración 2 con (ácido giberélico 0,5 mg/ L⁻¹) que contiene un promedio de 11cm y la concentración 1 con (ácido giberélico 0 mg/ L⁻¹) con el promedio de 9,03cm.

Según (Estelle, 1998), las giberelinas aportan una familia de compuestos químicos tetra cíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración.

Figura 8. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad y Medios

Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

En la (gráfica 4) la variedad de Cannabis (*cannabis sp*) y el medio que más resultado fue (Murashigue y skoog + carbón activado ácido), con un promedio de 12,42cm. Según (Ivonne Vaca, 2018), el carbón activado acelero el proceso de germinación en las semillas puede actuar como catalizador de reacciones químicas favoreciendo los procesos de respiración de las semillas para su germinación.

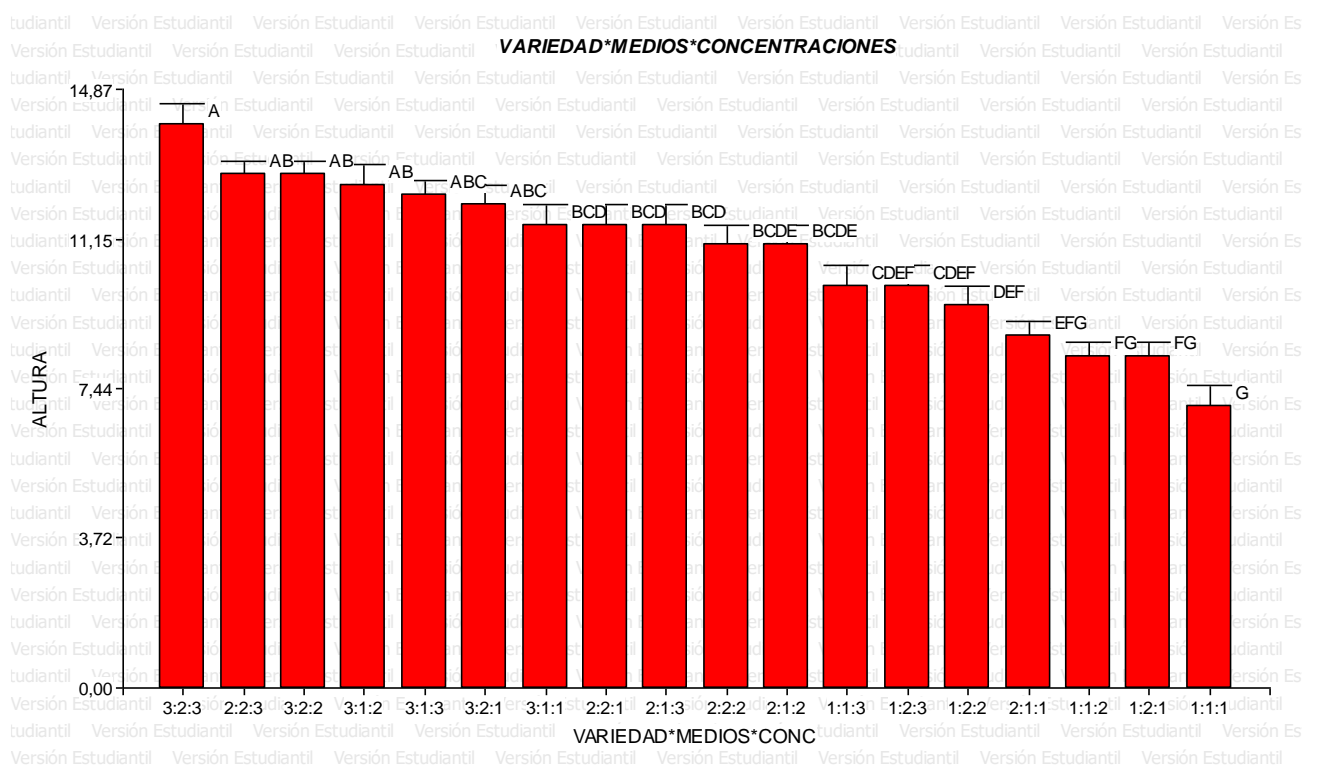
Figura 9. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad y Concentración

Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

En la gráfica 5 se observa la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) la cual es el número 3 y la concentración (ácido giberélico 1 mg/L-1) dio un promedios de 12,72 cm, la cual la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) y concentración de (ácido giberélico 0,5 mg/L-1) el cual tiene un promedio de 12,40 cm, también la variedad la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) mero 2 y la concentración de (ácido giberélico 1 mg/L-1) el cuál dio un promedio de 11,52 cm, la Cannabis (*Cannabis sp*) 3 y la concentración al (ácido giberélico 0 mg/L-1) el cual tiene un promedio de 11,20 cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2 y la concentración (ácido giberélico 0,5 mg/L-1) el cual tiene un promedio de 10,50 cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2 y la concentración de (ácido giberélico 0 mg/L-1) el cual tiene un promedio de 10,29 cm.

Según (Alchimiaweb, S, 2019), las giberelinas actúan como estimuladores del crecimiento y desarrollo de las plantas vasculares desde los brotes más jóvenes hasta las raíces pasando por el tallo y las flores.

Figura 10. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad, Medios y Concentraciones



Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

En el grafico 6 se observa que la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, Medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos dio un

rendimiento de 13,92cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos dio un promedio de 12,25cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 0,5mg/ L⁻¹), con un promedio de 12,20cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 0,5mg/ L⁻¹), con un promedio de 12,15cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), con un promedio de 12,13cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y la concentración (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), con un promedio de 12,11cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio de cultivo (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), con un promedio de 12,09cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y su concentración es de (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), con un porcentaje de 12,09cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog) y la concentración de (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos da un porcentaje de 12,09cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y su concentración (ácido giberélico 0,5 mg/ L⁻¹) con un porcentaje de 11,15cm, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog) y su concentración (ácido giberélico 0,5 mg/ L⁻¹) con un porcentaje de 11,15cm.

NUMERO DE HOJAS

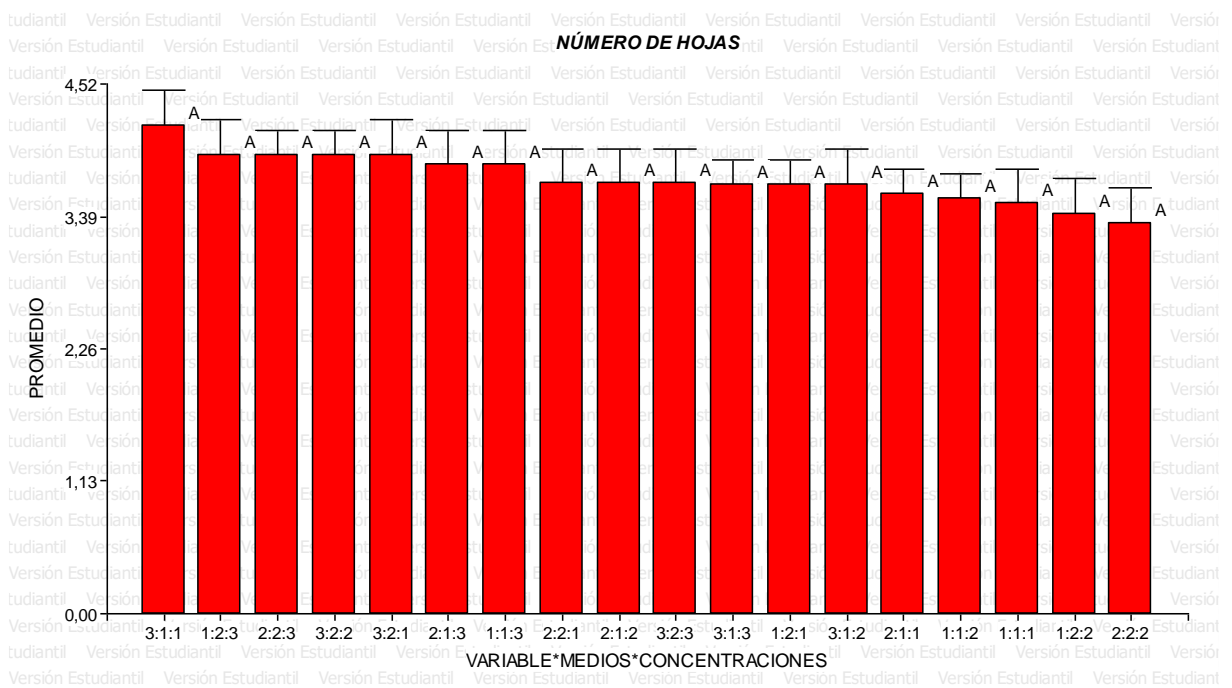
Tabla 9. Cuadro de análisis de varianza para el numero de hojas

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,76	17	0,1	0,59	0,8754ns
A	0,31	2	0,15	0,87	0,4299**
B	1,40E-04	1	1,40E-04	8,00E-04	0,9776ns
C	0,36	2	0,18	1,03	0,3679**
A*B	0,02	2	0,01	0,05	0,9529ns
A*C	0,75	4	0,19	1,07	0,3897**
B*C	0,03	2	0,01	0,08	0,9213ns
A*B*C	0,31	4	0,08	0,45	0,7745ns
Error	5,29	30	0,18		
Total	7,05	47			
CV			11,29		

Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

Como se puede observar en la tabla 9 del análisis de varianza para el número de hojas se determina que existe diferencias significativas en el factor A, medios de cultivo y el factor B, concentraciones ácido giberélico, muestra significancia en la interacción A*B*C, con un coeficiente de variación 11,29%.

Figura 11. Prueba de Tukey al 5% de la Variedad, Medios y Concentraciones en el crecimiento de hojas



Elaborado: (Paredes & Vélez, 2023)

En el gráfico 7 se observa que la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, Medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos dio un rendimiento de 4 en número de hojas, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos dio un promedio de 3,58, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 0,5mg/ L⁻¹), nos dio un promedio de 3,58, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 0,5mg/ L⁻¹), nos dio un promedio de 3,59, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos da un promedio de 3,60, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y la concentración (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), nos da un promedio de 3,59, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 3, medio de cultivo (Murashigue y skoog) y la concentración (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), nos da

un promedio de 3,54, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2 , con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y su concentración es de (ácido giberélico 0mg/ L⁻¹), nos da un porcentaje de 3,56, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, medio (Murashigue y skoog) y la concentración de (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), nos da un porcentaje de 3,49, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog + carbón activado) y su concentración (ácido giberélico 0,5 mg/ L⁻¹) nos da un porcentaje de 3,48, la variedad de Cannabis (*Cannabis sp*) 2, con el medio de cultivo (Murashigue y skoog) y su concentración (ácido giberélico 0,5 mg/ L⁻¹) nos da un porcentaje de 3,39.

12. CONCLUSIONES

- Se elaboró un protocolo para la producción de vitroplantas basado a las condiciones de laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi para las vitroplantas de cannabis (*Cannabis sp*).
- Se desprende que el uso del medio de cultivo Murashigue y skoog con carbón activado y la incorporación de ácido giberélico promueve el crecimiento de Cannabis en sistemas In Vitro el cual indica que la incorporación de carbón activado incide en el tejido meristemático, intensificando así la altura de planta.
- En conclusión, al incorporar las concentraciones de ácido giberélico para vitroplantas se determinó que la variedad Cannabis (*cannabis sp*), con el medio (Murashigue y skoog + carbón activado ácido) y la concentración (ácido giberélico 1mg/ L⁻¹), fue el que obtuvo mayor resultado en cuanto a la altura de vitroplantas, se determinó que las concentraciones realizadas ejercen significancia estadística en la altura y no influye en el número de hojas.

13. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un manejo adecuado de la bioseguridad de los laboratorios al realizar cualquier proceso, se debe realizar continuidad de la investigación debido a que hay material vegetativo y nuevos métodos que permiten mejorar la micropropagación.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcantara, J., Acero, G., Alcantara, J., & Sánchez, M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Álvarez, M. (2018). Propagación in vitro de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de segmentos nodales Proyecto. 1–59.
- Álvarez, M. (2018). Propagación in vitro de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de segmentos nodales Proyecto. 1–59.
- Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4), 1–6. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Arispe, D. (2021). [arispe-chambergo-daniel.pdf](http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4972/arispe-chambergo-daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Obtenido de [arispe-chambergo-daniel.pdf](http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4972/arispe-chambergo-daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y): <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4972/arispe-chambergo-daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castillo Alicia. (2014). Propagación de plantas por cultivo. 8. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Fassio, A., Rodríguez, M. J., & Ceretta, S. (2013). Cáñamo (*Cannabis sativa* L.) [Internet]. Uruguay: INIA. http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/canamo_inia_uruguay.pdf
- García, M. B., & Sosa, Y. T. (2008). Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación in vitro de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 8(2), 87–90. <file:///C:/Users/DELL/Downloads/340-1279-1-PB.pdf>
- Hernández, C. A. (2017). Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de Castilla <i>(Rubus glaucus</i> Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales in vitro.
- Hernández, C. A. (2017). Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de Castilla <i>(Rubus glaucus</i> Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales in vitro.
- Hernández, U. M. (2016). “ Ensayo De Variedades De Cáñamo En La Vega Baja Del Segura .” 1–52. <http://dspace.umh.es/handle/11000/2971>
- Imane, W., & Francisco, L. (2007). TENDENTES A LA MEJORA DEL CÁÑAMO (*Cannabis sativa* L.): OBTENCIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS , TRANSFORMACIÓN. 278.

- <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1622/16822201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Li, Y. Y. (2011). Transforming growth factor $\beta 1$ +869T/C gene polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis Involving 2708 participants in the Chinese population. *Internal Medicine*, 50(10), 1089–1092.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.50.4967>
- López, A., & Gómez, S. (Diciembre de 2020). *la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf*. Obtenido de *la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf*:
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf
- M., M., Pedraza-Santos, M. E., Gutiérrez-Rangel, N., Rodríguez-Mendoza, M. de las N., Lobit, P., Martínez-Palacios, A., Murillo-Talavera, M. M., Pedraza-Santos, M. E., Gutiérrez-Rangel, N., Rodríguez-Mendoza, M. de las N., Lobit, P., & Martínez-Palacios, A. (2016). CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO in vitro DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE). *Agrociencia*, 50(8), 1065–1080. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801065&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mediavilla, V., Jonquera, M., Schmid-Slembrouck, I., & Soldati, A. (1998). Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.). *J. Int. Hemp Ass. SOURCE: JOURNAL OF THE INTERNATIONAL HEMP ASSOCIATION*, 5(52), 68–74.
<http://www.internationalhempassociation.org/jiha/jiha5201.html>
- Merfield, C. N. (1999). Industrial Hemp and its Potential for New Zealand. *Leadership*, November, 33. file:///C:/Users/personal/Desktop/TESIS22-22/APENDICES/BIBLIOGRAFIAS/Industrial_hemp_and_its_potential_for_New_Zealand.pdf
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. In Universidad Nacional de Colombia (Vol. 9, Issue 19).
http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. In Universidad Nacional de Colombia (Vol. 9, Issue 19).
http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Pita, J., & Perez, F. (2008). Germinación de semillas. *Hojas Divulgadoras*, 1, 1–20.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf

- Quisbert, J., & Murillo, R. (2019). Efecto de tres concentraciones de carbón activo y diferentes fuentes de carbono , en multiplicación de vitroplantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L . Apathapi, 5(2), 1616–1631.
<https://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/23462>
- Quisbert, J., & Murillo, R. (2019). Efecto de tres concentraciones de carbón activo y diferentes fuentes de carbono , en multiplicación de vitroplantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L . Apathapi, 5(2), 1616–1631.
<https://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/23462>
- Ramos, J. (2012). Avances de la Micropropagación In Vitro de plantas leñosas. DED Goya SCJ - Micropropagación Vegetal, 71.
<http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2515/1/17127974.pdf>
- Sabio, F. R. R. y M. M. (2019). El CARBÓN ACTIVADO EN PROCESOS DE DESCONTAMINACIÓN. 4. <http://www.elaguapotable.com/El-carbon-activo-en-procesos-de-descontaminacion.pdf>
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332687&lang=es&site=ehost-live>
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332687&lang=es&site=ehost-live>
- Stefano Vittorio, R. Z. (2020). Efecto de diferentes tipos de luz en el crecimiento de plantas in vitro: Revisión de Literatura. *Agrícola Panamericana*, 25.
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6812/1/CPA-2020-T094.pdf%0AStefano-Victorio-Rizzo-Zaldumbide%0AStefano-Victorio-Rizzo-Zaldumbide>
- Thomas, M. (2012). Cannabis Cultivation - A Complete Grower's Guide. In *Journal of Alcohol & Drug Education* (Vol. 56, Issue 1). <https://www.pdfdrive.com/cannabis-cultivation-a-complete-growers-guide-d165059623.html>

- Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, J., Núñez, A., Acurio, R., & Chiluisa, V. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de Citrus limon (L.) y su dinámica de crecimiento. *Bionatura*, 3(3), 657–664.
<https://www.revistabionatura.com/files/2018.03.03.5.pdf>
- Werf, H. van der, Geel, W. Van, & Wijlhuizen, M. (1995). Agronomic research on hemp in The Netherlands, 1987-1993. *Journal of the International Hemp Association*, 2(1), 1987–1993. <https://www.researchgate.net/publication/285884774>
- (s.d.). Récupéré sur <https://www.botanical-online.com/alcaloides/cannabis-toxicidad-toxicidad>
- McKendrick, D. (2000, Marzo). *manual-SP.PDF*. Récupéré sur [manual-SP.PDF: https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf](https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf)
- Acosta, B. (2020). *Perlita para plantas: qué es, para qué sirve y cómo se usa*.
- AEFA. (1997). *aefa-agronutrientes.org*. Récupéré sur <https://aefa-agronutrientes.org/glosario-de-terminos-utiles-en-agronutricion/humus>
- Agro Beta. (2012). *AGROBETA*. Récupéré sur <https://www.agrobeta.com/agrobetablog/2012/10/factores-en-el-cultivo-de-la-marihuana-conductividad-electrica/#.Y5d1rXbMLre>
- al, V. e. (2018).
- Alchimia, G. S. (2009, 10 01). *Características de las variedades de marihuana sativa [Artículo del blog]*. Consulté le 02 08, 2023, sur <https://www.alchimiaweb.com/blog/marihuana-sativa/>
- Alchimiaweb, S.L. (2019, 11 17). *Uso de hormonas vegetales en el cultivo de Cannabis*. Récupéré sur <https://www.alchimiaweb.com/blog/hormonas-vegetales-cultivo-cannabis/>
- Alchimiaweb, S.L. (2021, 07 12). *Micropropagación de cannabis*. Récupéré sur <https://www.alchimiaweb.com/blog/micropropagacion-cannabis/>
- Aldama.A. (2023, 01 03). *Revista THC*. Récupéré sur <https://revistathc.com/2023/01/03/todo-sobre-los-distintos-tipos-de-poda-en-marihuana/>
- ANASAC. (2010). Giberelinas en extensivo, ventajas y secretos. <https://gleba.com.ar/4245-2/>.
- Ángeles, L. G. (2014). *Scielo*. Récupéré sur https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004

- Arantxa, B. (2022, Agosto 17). *sembrar100.com*. Récupéré sur <https://www.sembrar100.com/turba/rubia/>
- Arispe, D. (2021). *arispe-chambergo-daniel.pdf*. Récupéré sur <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4972/arispe-chambergo-daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhojwani & Razdan. (1996).
- Bovens, M. (2010). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis*. Récupéré sur https://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis_manual-Sp.pdf
- Buechel, T. (2022). *PRO-MIX*. Récupéré sur <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/fibra-de-coco-un-componente-de-los-medios-de-cultivo/>
- BURITICÁ, A. (2020, Noviembre 20). *AGRICULTURA*. Récupéré sur <https://blog.croper.com/la-arana-roja-en-tomate-principales-efectos-y-como-combatirla/>
- Cajal, F. (2020). *Lifeder*. Récupéré sur <https://www.lifeder.com/prueba-de-tukey/>.
- Cannabis. (2018). *Semillas marihuana*. Récupéré sur <https://www.semillas-de-marihuana.com/blog/concurso/guia-basica-cultivar-marihuana-experiencianatural.pdf>
- Carranza, R. R. (2012). *Los productos de Cannabis sativa*. Récupéré sur <https://www.medigraphic.com/pdfs/salmen/sam-2012/sam123i.pdf>
- Castillo. (2014). *Requerimiento para el cultivo in vitro*.
- Cirilo. (2021). *Evapotranspiración de referencia ETo*.
- Cortés, J. D. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109#:~:text=Los%20reguladores%20de%20crecimiento%20vegetal%20son%20compuestos%20sintetizados%20qu%C3%ADmicamente%20u,celular%20en%20los%20organismos%20vegetales.
- Cortes, J. S. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109#:~:text=Los%20reguladores%20de%20crecimiento%20vegetal%20son%20compuestos%20sintetizados%20qu%C3%ADmicamente%20u,celular%20en%20los%20organismos%20vegetales.
- El productor. (2022, Julio 22). *El productor, periodico del campo*. Récupéré sur [El productor, periodico del campo:](#)

- <https://elproductor.com/2022/07/201676/#:~:text=Uno%20de%20los%20principales%20problemas,de%20Cannabis%20en%20el%20pa%C3%ADs>.
- Elshahed, S. y. (2012).
- Encina, L. (1996). *A propósito de semillas*. Recuperé sur https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=5481103&pid=S1405-2768201400020000700013&lng=es
- Esteban, J. I.-M.-I. (2021). *Evolución histórica de la clasificación taxonómica del cáñamo* *Historical evolution of taxonomic classification of hemp*. Recuperé sur Boletín de La Real Sociedad Española de Historia Natural, 115(4), 5–12.: <https://doi.org/10.29077/bol.115.e04.alonso>
- Esteban, J. I. A.-M.-I. (2021). *Evolución histórica de la clasificación taxonómica del cáñamo* *Historical evolution of taxonomic classification of hemp*. Recuperé sur Boletín de La Real Sociedad Española de Historia Natural, 115(4), 5–12.: <https://doi.org/10.29077/bol.115.e04.alonso>
- Estelle, G. y. (1998). *CULTIVO INVITRO*. Recuperé sur [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y#:~:text=Las%20giberelinas%20\(GAs\)%20constituyen%20una,Gray%20%26%20Estelle%2C%201998\)](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4/_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y#:~:text=Las%20giberelinas%20(GAs)%20constituyen%20una,Gray%20%26%20Estelle%2C%201998)).
- et, M. (1998). *Decimal Code For Growth Stages Of Hemp (Cannabissativa L.)*. *Journal of the International Hemp Association*. N°5(2): 65, 68-74.
- EUROCARB. (s.d.). Recuperé sur <https://www.eurocarb.com/es/productos/que-es-el-carbon-activado/>
- f, Z. (s.d.).
- FACULTAD, A. D. (2022, 10 24). *El cultivo in vitro de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que permite la conservación, mejoramiento y multiplicación de diferentes especies de plantas herbáceas o leñosas. Debido a los múltiples usos terapéuticos e industriales de Cannabis sa*. Recuperé sur <https://fcagr.unr.edu.ar/?p=19745>
- FAO, P. M. (2022, julio). *Tanque Evaporimetro*. Recuperé sur https://www.researchgate.net/publication/335808675_Coeficiente_del_tanque_evaporimetro_Clase_A_para_estimar_la_evapotranspiracion_de_referencia_para_el_valle_de_Tumbaco

- Fay. (1992). "*Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods*". Récupéré sur https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=5481096&pid=S1405-2768201400020000700009&lng=es
- Gallegos, F. (2020, 05 19). *El futuro del cannabis en Ecuador inicia el próximo mes*. Récupéré sur <https://lexlatin.com/opinion/futuro-cannabis-ecuador-inicia-proximo-mes>
- Garcia. (2015). *EVAPOTRANSPIRACIÓN*.
- Garrido. (2015).
- GELÓS, N. (2022). Récupéré sur <https://es.rollingstone.com/cannabis-nacional-las-primeras-semillas-argentinas-oficiales-y-los-ultimos-avances-hacia-la-legalizacion/>
- González, Y. H. (s.d.).
- Guadalupe, A. . (2015). *DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS*. Consulté le November 24, 2022, sur DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v45n4/v45n4a4.pdf>
- Guadalupe, A, F. B. (2014). *Cannabis sativa L., una planta singular*. Récupéré sur https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004
- Gutierrez, A. (2002). *EL CIATEJ*. Récupéré sur <https://www.ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>
- Imane & Francisco. (2007).
- INIAP. (2021). *agricultura.gob.ec*. Récupéré sur [https://www.agricultura.gob.ec/iniap-fortalece-a-sus-tecnicos-para-atender-solicitudes-para-cultivo-de-canamo/#:~:text=Seg%C3%BAAn%20la%20normativa%20aprobada%20por,%25%20de%20tetrahydrocannabinol%20\(THC\).](https://www.agricultura.gob.ec/iniap-fortalece-a-sus-tecnicos-para-atender-solicitudes-para-cultivo-de-canamo/#:~:text=Seg%C3%BAAn%20la%20normativa%20aprobada%20por,%25%20de%20tetrahydrocannabinol%20(THC).)
- INTAGRI. (2020). *intagri.com*. Récupéré sur <https://www.intagri.com/articulos/hortalizas/plagas-y-enfermedades-del-cannabis>
- Ivonne Vaca, M. M. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de Citrus. <https://revistabionatura.com/files/2018.03.03.5.pdf>.
- Jiménez, M. (20007). Establecimiento del protocolo de para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* L. 32-40.
- Jobs, S. (2019). Récupéré sur <https://vegetalbioplant.com/blog/es/curiosidades/la-hoja-de-marihuana-imagen-universal-y-simbolo-cultural/>

- Juan .C. (2001). *Astro*. Récupéré sur <https://astrogrowshop.cl/blog/autocultivo-y-consumo/autocultivo/las-plagas-mas-comunes-de-la-marihuana/>
- Julio, B. (2000). *Monografía cannabis*. Récupéré sur [https://www.uv.es/=cholz/Cannabis \(PND\).pdf](https://www.uv.es/=cholz/Cannabis(PND).pdf)
- Kendrick Mc. (2000). *Manual para la germinación in vitro*. Récupéré sur [www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf).
- Konversations, L. M. (1897). *gettyimages.com.mx*. Récupéré sur https://www.gettyimages.com.mx/detail/ilustraci%C3%B3n/plant-cannabis-sativa-with-flower-and-ilustraciones-libres-de-derechos/1240968042?utm_medium=organic&utm_source=google&utm_campaign=iptcurl
- Leon, C. y. (2014). *inforiego.org*. Récupéré sur https://www.inforiego.org/opencms/opencms/info_tecnica/6_agronomia/index.html#:~:text=La%20dosis%20de%20riego%20m%C3%A1xima,potencial%20productivo%20se%20viera%20mermado.
- Li. (2011).
- López, A., & Gómez , S. (2020, Diciembre). *la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf*. Récupéré sur [la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf): https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/la_cadena_de_valor_del_cannabis_-_10.12.pdf
- Lopez, L. (2003). *Cultivos Industriales. España: Mundi Prensa*.
- M. et al. (2016).
- Manuel, M. (2019). *matillaplant.com*. Récupéré sur <https://matillaplant.com/blog-marihuana/tierra-de-diatomeas-para-cannabis-que-es-como-se-usa-y-beneficios/#:~:text=La%20tierra%20de%20diatomeas%20es,los%20efectos%20de%20la%20TD.>
- Maria.G. (2018). *growshoponline.net*. Récupéré sur <https://www.growshoponline.net/blog/tipos-riego/>
- Marquínez. (1998).
- Masaguer, M. &. (2005). *Sustratos de cultivo: nueva alternativa ecocompatible*.
- Mayaquez, U. (2013). *Biología Organismal Vegetal*. Récupéré sur <https://www.uprm.edu/labs3417/wp-content/uploads/sites/176/2018/08/germinacion-de-semillas-1.pdf>

- Mechoulam, R. (1986). *La farmacohistoria del Cannabis Sativa*. Récupéré sur <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429260667-1/pharmacohistory-cannabis-sativa-raphael-mechoulam>
- Mediavilla, V. (1998). Estados fenológicos de Cannabis sativa. Récupéré sur [https://www.tecnicoagricola.es/estados-fenologicos-de-cannabis-sativa/#:~:text=Las%20semillas%20maduran%20en%20un,est%C3%A1n%20duras%20\(c%C3%B3digo%202205\)](https://www.tecnicoagricola.es/estados-fenologicos-de-cannabis-sativa/#:~:text=Las%20semillas%20maduran%20en%20un,est%C3%A1n%20duras%20(c%C3%B3digo%202205)).
- Merfield. (1999).
- Meyers, K. (1897). Récupéré sur https://www.gettyimages.com.mx/detail/ilustraci%C3%B3n/plant-cannabis-sativa-with-flower-and-ilustraciones-libres-de-derechos/1240968042?utm_medium=organic&utm_source=google&utm_campaign=iptcurl
- Mondino. (2014). *alice.cnptia.embrapa.br*. Récupéré sur <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1012615/1/2014LV01.pdf>
- Montenegro, D. D. (2017). Las Hormonas Vegetales en las Plantas. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/las-hormonas-vegetales-en-las-plantas#:~:text=Las%20giberelinas%20y%20su%20papel,desarrollo%20de%20las%20flores%20masculinas>.
- Montoya, J. (2011). *Diseños experimentales ¿qué son y cómo se utilizan*. Récupéré sur <https://biblat.unam.mx/hevila/Cienciaymar/2011/no43/7.pdf>
- Moreno, P. (1997). *ESTUDIO DEL CULTIVO DE CANNABIS SATIVA EN EL RIF MARROQUI: SUS CONDICIONES SOCIOECONOMICAS PARA LA REGION*. Récupéré sur <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/4623/tesisUPV818.pdf>
- Muhammad, I, N. I. (2016, 12 28). *Scientific Research*. Récupéré sur Estudio In Vitro de Callogénesis y Potencial de Regeneración de Cultivares: [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1943677](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1943677)
- Murashige & Skoog . (1962). *Cultivos de Vegetales InVitro*. Récupéré sur http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__Zozfqc

- Murashige. (1973).
- Naturagro.S.A. (2022). *naturagro.net*. Récupéré sur <https://naturagro.net/evergreen/>
- NOVACHEM DEL ECUADOR, s. (s.d.).
- Ordoñez. (2021). Récupéré sur zamnesia.es: <https://www.zamnesia.es/blog--cuanta-agua-necesitan-las-plantas-de-cannabis-n255>
- Padilla, W. (2022, Julio 25). *GCA*. Récupéré sur <http://www.grupoclinicagricola.com/blog-produccion-limpia-del-cannabis-medicinal-Ecuador-p2.html>
- Palma.C. (2020). *repositorio.ucsp.edu.pe*. Récupéré sur https://repositorio.ucsp.edu.pe/bitstream/20.500.12590/16204/4/PALMA_UGARTE_CAR_CAN.pdf
- Paredes & Velez. (2022).
- Perea. (2009).
- Perreira. (2006). *FAO.ORG*. Récupéré sur <https://www.fao.org/3/x0490s/x0490s.pdf>
- Phytotech, s.f. (s.d.).
- Pinasco, G. (2020). *Grandes o pequeños productores: ¿a quién beneficiará la producción de cannabis en Ecuador?*
- Piranha. (2020, 07 04). *GERMINACIÓN*. Récupéré sur <https://piranha.cl/blog/ciencia/germinacion-cannabis-sativa#:~:text=La%20germinaci%C3%B3n%20es%20un%20proceso,el%20crecimiento%20de%20la%20pl%C3%A1ntula>.
- Pita & Perez. (2008).
- Pr, n.d. (s.d.).
- Raes, A. P. (2006). *Evapotranspiracion de referencia*.
- Ramirez, L. (2021). *DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CONTROL DE HUMEDAD DE SUSTRATO, TEMPERATURA Y FOTOPERIODO PARA EL CULTIVO DE Cannabis sativa L. var. wild thailand y Cannabis indica Lam. var. hindu kush EN LA EMPRESA GREEN CROSS INTERNATIONAL S.A.S.*
- Ramos. (2012).
- Ranalli. P. (2004). Estado actual y escenarios futuros de la cría de cáñamo. *Scielo*. Récupéré sur Current status and future scenarios of hemp breeding.
- Raphael, M. (2019). Cannabinoids as Therapeutic Agents. Dans M. Raphael, *Cannabinoids as Therapeutic Agents* (pp. 3-14). Jerusalem: CRS PESS.

- Renobles. (2001). *Cannabis sativa*. Récupéré sur <https://www.ehu.es/documents/1686888/3913390/17.+Cannabis+sativa.pdf>
- Rivas, C. (2016). Cultivo In Vitro de Células y Tejido Vegetal. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>.
- Roca y Mrogiskin. (1993).
- Rodríguez et al. (2004).
- Rodriguez. M. (2013). Cáñamo. Dans (*Cannabis sativa L.*).
- Rossi. (2001).
- Ruben, A. (2021). Uso de Hormonas Vegetales en Cultivo de Cannabis. <https://www.alchimiaweb.com/blog/hormonas-vegetales-cultivo-cannabis/>.
- Ruiz, A. (2018, Septiembre 7). *Qué es el proceso de germinación*. Récupéré sur <https://historiadela vida.editorialaces.com/que-es-el-proceso-de-germinacion/>
- Salazar et al. (2013).
- Salisbury y Ross. (1994).
- Sánchez, E. J. (2015, Febredo 27). *Diseño Completamente al Azar*. Récupéré sur <https://es.slideshare.net/lemalimentos/11-diseo-completamente-al-azar>
- Sathyanarayana. (2007).
- Sativa, Descripción de La Planta Cannabis, s.f. (s.d.). Récupéré sur Www.Tecnicoagricola.Es, n.d.
- Seabroo. (1980).
- Sempértegui, G. S. (2022). *Cannabis medicinal: una industria con alto potencial en Ecuador*. Récupéré sur <https://www.sempertegui.com/articulos/cannabis-medicinal-una-industria-con-alto-potencial-en-ecuador/>
- Sierra. (2020). *Sistemas de riego*. Récupéré sur <https://www.fundacionaquae.org/wiki/tipos-de-riego/>
- SIG. (2023). *Significados.com*. Récupéré sur Temperatura: <https://www.significados.com/temperatura/>
- Sinha, S. (2020). *SENSE SEEDS*. Récupéré sur <https://sensiseeds.com/es/blog/la-importancia-de-las-raices-del-cannabis-potencial-medicinal-historia-y-usos-actuales/>
- Smith. (2000).
- Solbio. SA. (2011). Bio Compost o Bio Humus: Residuos vegetales y animales son la fuente de nutrientes en el suelo. *engormix*.

- Sonny Eli Zaluchu. (2021).
- Suman Chandra, Ikhlal Khan & Mahmoud A. ElSohly . (2008, 11 17). *rganogénesis directa de brotes de alta frecuencia inducida por tidiazurón en Cannabis sativa L.*
- T.G.Shop. (2021, 08 16). *tanegrowshop.com*. Récupéré sur <https://tanegrowshop.com/news/temperatura-y-humedad-relativa>
- Thompson, L. M. (2002). Los suelos y su fertilidad. Dans L. Thompson, *Los suelos y su fertilidad* (p. 611). Barcelona: REVERTÉ.
- Toni, F. (2021). *ecoinventos.com*. Récupéré sur <https://ecoinventos.com/como-hacer-trampas-cromaticas-para-combatir-la-mosca-blanca/>
- Trujillo. (2019). *La ciencia descubrió el lugar exacto donde se originó la marihuana*. Récupéré sur <https://www.fayerwayer.com/2019/05/marihuana-ciencia-lugar/>
- Villegas, G. P. (2020). *Obtencion de celulas de Cannabis Sativa In vitro, por citocina no conbencional*. Chihuahua. Récupéré sur <http://repositorio.uach.mx/349/1/Tesis.pdf>
- Vittorio, S. (2020).
- Voser. (2020). *cannaconnection.com*. Récupéré sur <https://www.cannaconnection.com/es/blog/1895-como-usar-riego-goteo>
- Werf et. (1995).
- Wigham, G. a. (1973). *LA EVAPORACION*.
- Yerbasi, S. (2017, Mayo 30). *SANTYERBASI BLOG*. Récupéré sur <https://www.santyerbasi.com/blog/cultivo-in-vitro-de-cannabis/#:~:text=La%20contaminaci%C3%B3n%20del%20medio%20suele,casa%20con%20una%20c%C3%A1mara%20est%C3%A9ril.>
- Zita, F. A. (2022). *Que es la evaporacion*. Récupéré sur <https://www.significados.com/evaporacion/>
- Raphael Mechoulam, P. (2019). Cannabinoids as Therapeutic Agents. En P. Raphael Mechoulam, *Cannabinoids as Therapeutic Agents* (págs. 3-14). Jerusalem: CRS PESS.

15. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE VITROPLANTAS PARA EL CULTIVO DE CAÑAMO EN COTOPAXI-ECUADOR

1Paredes, L., Velez, A., 1Chasi, P.

1Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN), Carrera de Agronomía, laboratorios de conservación vegetal, Campus Salache Km 7.53 Vía Salache, Latacunga, Ecuador.

Introducción

El Cannabis (*Cannabis sativa*) existe desde hace unos 10000 años desde el descubrimiento de la agricultura en el Viejo Mundo a Cannabis sativa se conoce desde hace varios siglos por sus propiedades recreativas y medicinales, actualmente la marihuana, uno de sus productos, es la droga ilegal que más se consume en el mundo y su abuso es un grave problema de salud pública, especialmente entre la población joven. Su uso se favorece y extiende por la creencia generalizada de que es menos dañina que otras drogas ilegales y que no produce daños severos como los opioides y otros psicoestimulantes. (Carranza, 2012).

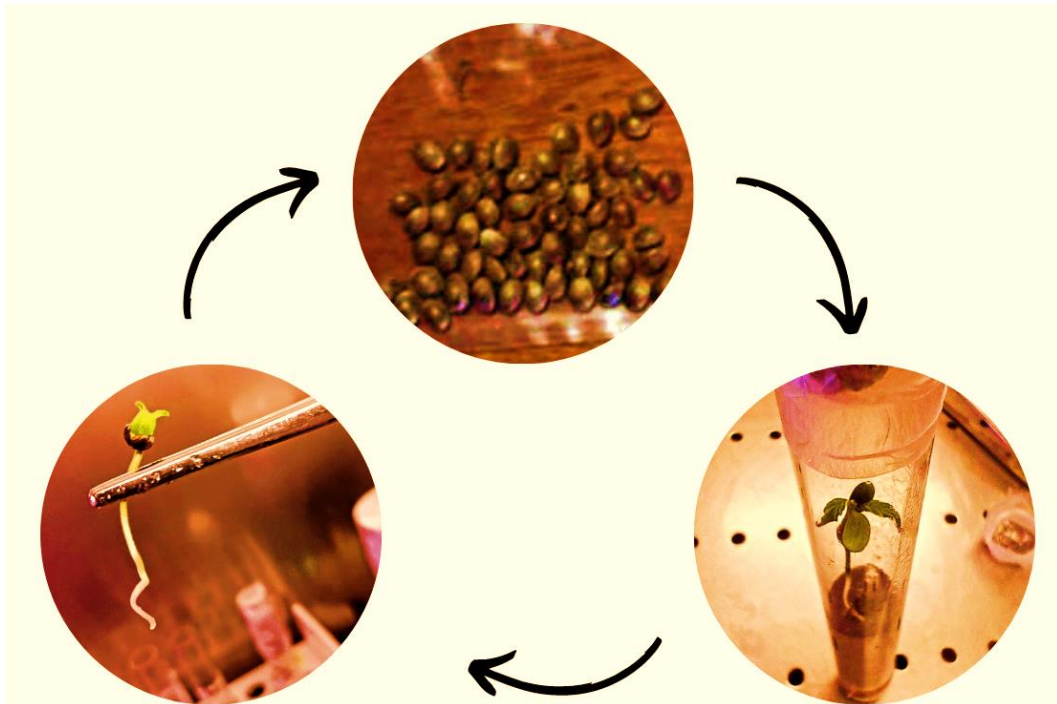
Cannabis sativa L. fue una de las primeras plantas en ser utilizada por el hombre como fibra, alimento, medicina y en rituales sociales y religiosos. Los escitas eran una tribu de guerreros violentos que gobernaron Crimea y, en diferentes momentos, partes del sur de Rusia, los Balcanes, Anatolia y el Medio Oriente alrededor del año 700 a. C. La Edad Media en Europa mantuvo su curso, en lo que respecta a la medicina y no. El cannabis formaba parte de la tradición religiosa de los arios, una tribu nómada que invadió la India desde el norte alrededor del año 2000 a. C. Los indios tenían un conocimiento mucho mejor del cannabis que los europeos. En varias partes de la India, el cannabis se usaba para un gran número de enfermedades y para mejorar el estado físico y mental del usuario. (Mechoulam, 1986)

Propósito de la siembra de semillas de cannabis (*Cannabis sativa*)

El establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación:

- Proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo el micro propagación.
- Es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural,
- Es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales (**Fay, 1992**).

La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, ya que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación (Encina, 1996)



Fundamentos para la germinación de semillas

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que permite la conservación, mejoramiento y multiplicación de diferentes especies de plantas herbáceas o leñosas. Debido a los múltiples usos terapéuticos e industriales de *Cannabis sativa L.* y sobre todo a su reciente legalización, se ha generado gran interés en evaluar protocolos y técnicas eficientes de germinación y multiplicación *in vitro* para la especie. (FACULTAD, 2022)

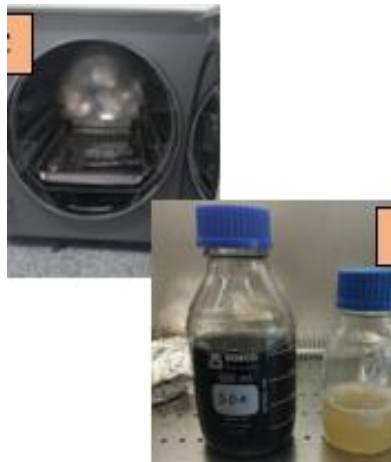
Fundamentos para mantener condiciones de esterilización

Es de gran importancia que el proceso de esterilización en los medios, los frascos, los aparatos y semilla que se mantenga desinfectadas desde el principio del proceso de germinación ya que logra la destrucción total de los microorganismos variables presentes en un determinado material.

Cualquier bacteria u hongo que se introduzca en los frascos crecerá más rápido que las semillas y pronto ocupará su espacio hasta matarlas. Uno de los principales problemas que se presentan al usar estas técnicas es la contaminación fúngica del medio de cultivo, por ello se debe implementar una etapa de desinfección de las semillas la cual básicamente consiste en someter las semillas a una solución con hipoclorito de sodio o calcio y lavado con agua destilada (Kendrick Mc, 2000).

Los instrumentos (Fracos de vidrio con sus respectivas tapas, pinzas, cucharas, etc.)

1. Deben ser esterilizados antes de uso.
2. Se utiliza una solución del 3% de cloro.
3. Debe ser llevada a una olla de vapor para realizar un autoclavado durante 15-20min.

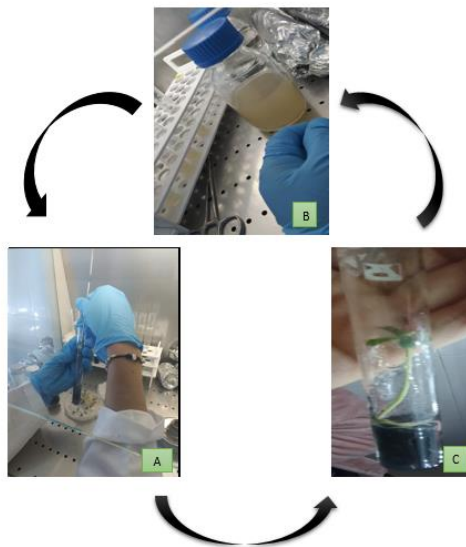


Uso de la cámara de flujo laminar

Se debe prestar atención a ciertas reglas básicas al usar la cámara de flujo laminar:

- Siempre se la debe desinfectar por completo usando alcohol de 70-90% de concentración (de preferencia etanol, tener mucho cuidado si se utiliza alcohol antiséptico que contiene también metanol).
- Todo lo instrumentos que ingresará en la cámara debe estar esterilizado, roseando alcohol y guardándolos en la cámara hasta que el alcohol se haya secado.

- Después de flamear los instrumentos éstos deben ser ubicados rápidamente sobre un frasco de vidrio esterilizado para continuar con el flameado. Déjelos enfriar antes de su uso.
- Mantener las condiciones de esterilización mediante la limpieza regular de la cámara con alcohol, desinfecte nuevamente los instrumentos luego de su uso y lávese de nuevo las manos después de haber tenido contacto con cualquier objeto fuera de la cámara.



Preparación del medio

El Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) se realiza con las siguientes sustancias (Muhammad. I, 2016):

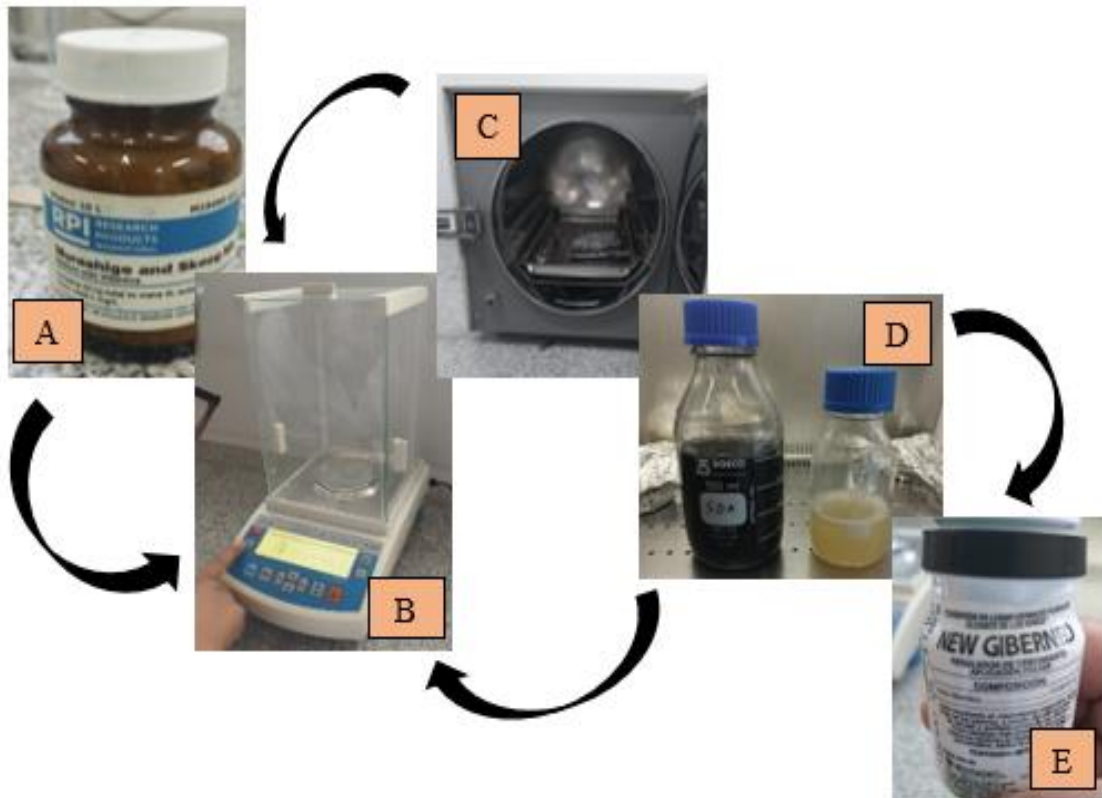
Materiales

- Sacarosa 3.0% (p/v) y
- Carbón activado 0.03% (p/v),
- pH ajustado a 5.8
- Previamente autoclavado a 121 °C durante 20 minutos

Método general para la preparación del medio

1. Se debe escatimar la cantidad correcta del medio en polvo utilizando una botella de 1 litro y evitando el contacto con el polvo del ambiente.
2. Para el medio Murashige y Skoog: añadir la cantidad correcta de sacarosa 3.0% (p/v).

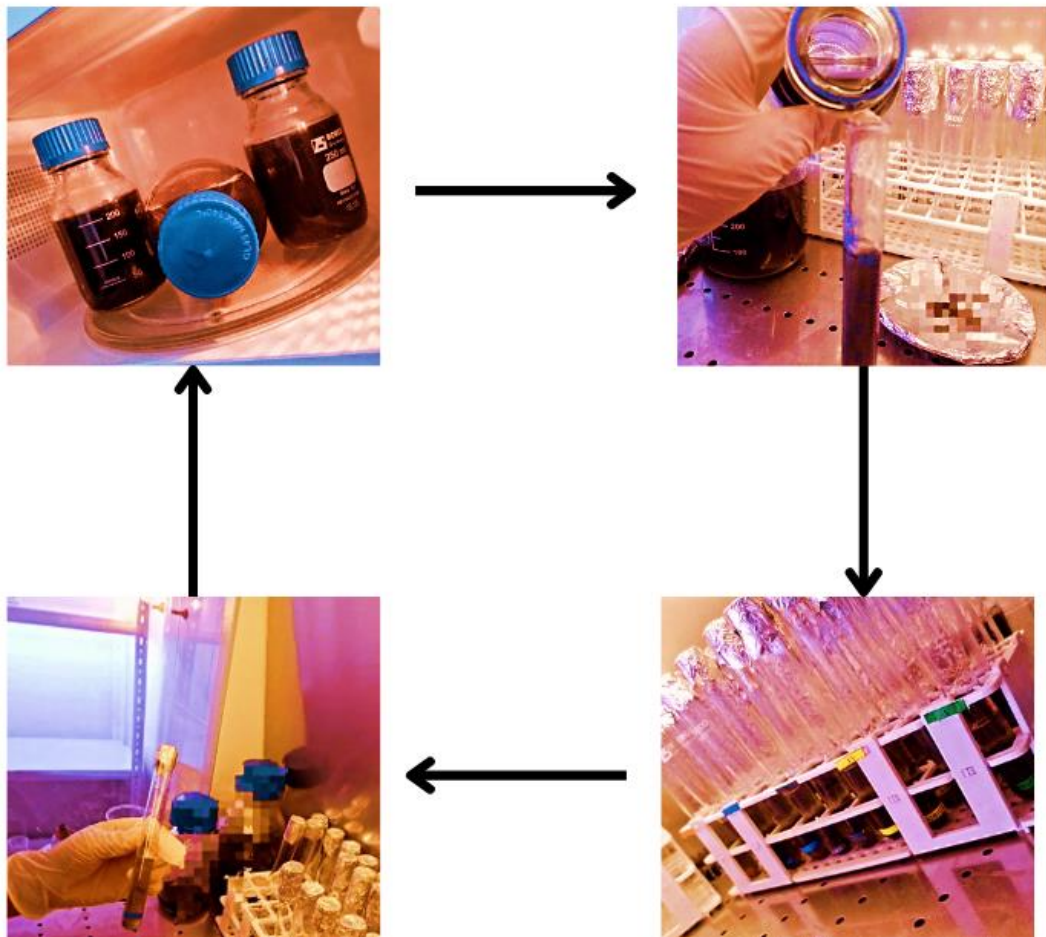
3. Añadir una barra magnética y una pequeña cantidad de agua destilada y mezclar hasta que se disuelva.
4. Se debe colocar en el envase con agua destilada hasta tener 1 litro y agite continuamente
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.8 usando HCl o NaOH, mezclandolo completamente con la barra magnética.
6. Verter la mitad del líquido en un frasco, añadir 4 gramos de agar a cada recipiente (8 gr/l de agar) y mezclar para que se disperse.
7. Cerrar la tapa de la botella sin asegurarla totalmente, cubrir los frascos con papel aluminio y llevarlos a la autoclave.



Trasaso del medio (verter en los frascos)

Para verter el medio en los tubos de ensayo esterilizados, se debe realizar el proceso dentro de la cámara de flujo laminar, si no se tiene tapas disponibles, se puede cubrir los frascos con un pedazo de papel de aluminio (Jiménez, 20007).

1. Espere que el medio se enfríe lo suficiente para cogerle con las manos. Cuando el agar esté menos líquido y la botella o frasco no esté tan caliente, se puede verter el medio. Si se vierte el agar muy caliente se puede ocasionar una alta condensación.
2. Ponga en las gradillas los tubos de ensayo comenzando desde el fondo de la cámara de flujo laminar, aflojando las tapas de los frascos.
3. Vierte el agar moviendo de izquierda a derecha para evitar que cualquier parte de la mano o del mandil de laboratorio roce con los tubos de ensayo.
4. Se puede tapar los frascos inmediatamente luego de que se ha vertido el medio, pero se puede provocar condensación.



Siembra de las semillas

Las semillas de (*Cannabis sp.*) fueron adquiridas mediante encargo por la empresa GENNBIO (Breeding_Genetics_Biotechnology) a través de REDES DE LIBERTAD; el material consiste de aquenios obtenidos por selección masal de variedades locales adaptadas

a la línea ecuatorial M. B. y CRNTIO, principalmente apto para cultivares *sativa*.

El tratamiento de desinfección inicial previo a la introducción de aqenios *in vitro* consiste en (Muhammad. I, 2016):

1. Esterilizar la superficial con alcohol etílico 75% (v/v) durante 2 minutos y 30 segundos.
2. Seguido de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 3% (v/v) POR 3 min.
3. Con el agente surfactante (Tween 20) durante 25 minutos.
4. Finalmente, lavados con agua destilada estéril.

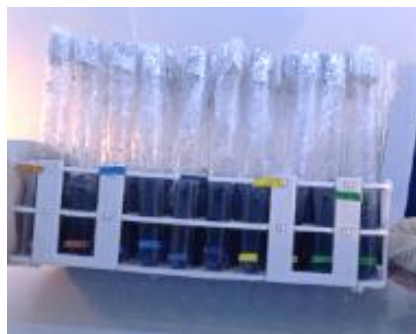
Inoculación: En un ambiente aséptico y con un perímetro de desinfección utilizando mecheros se procedió a inocular las semillas dentro del medio de cultivo.



Cuidado de las plántulas.

El cultivo permaneció en el cuarto de incubación de ambiente controlado, con luz blanca de lámparas led, 16 horas luz:8 horas oscuridad, y temperatura media de 24 ± 2 °C.

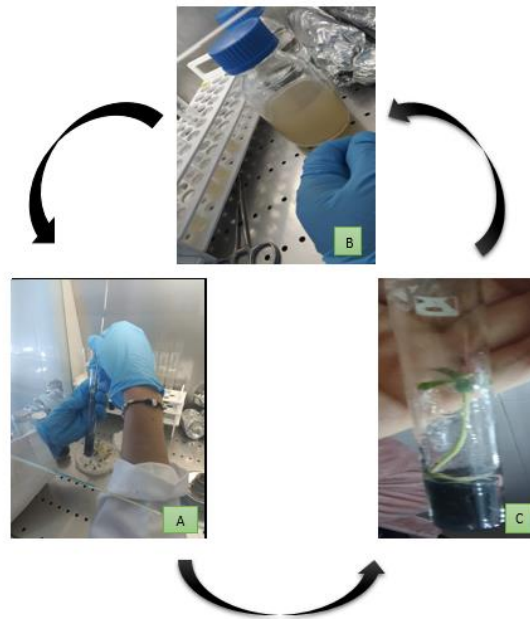
- Los frascos recientes deben ser revisados regularmente luego de la siembra por el riesgo de contaminación.



Trasplante

Se debe realizar algunos trasplantes antes de que las plantas estén listas para ser plantadas en una maceta.

1. Escoja el medio correcto para plantar las pequeñas plantas. (ver el Apéndice).
2. Cuidadosamente retire las plantas de los frascos, apártelas suavemente y enjuague los residuos de agar.



Bibliografía

McKendrick, D. (Marzo de 2000). *manual-SP.PDF*. Obtenido de *manual-SP.PDF*:

https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf

Thompson, L. M. (2002). Los suelos y su fertilidad. En L. Thompson, *Los suelos y su fertilidad* (pág. 611). Barcelona: REVERTÉ.

Cheng, C. y col. (2016) A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products* 83, 61-65.

Galán-Ávila, A. (2020) Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. *Frontiers in Plant Science* 11.645, 1-15.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15.3, 473-497.

Salgado, A. (2020) Proyecto Startup: Green *In Vitro*. Tesis de grado. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

Schultes, R. y col. (2000) *Plantas de los dioses. Las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas*. Fondo de Cultura Económica, México.

Thomas, M. (2012) *Cannabis cultivation. A complete grower's guide*. 3rd edition. Green Candy Press, San Francisco, CA.

Villezcás, G. (2020) Obtención de células de *Cannabis sativa* L. *in vitro*, por citocinina no convencional, metatopolina. Tesis de posgrado. Universidad Autónoma de Chihuahua, Méxi

Anexo 2. Aval de Traducción

Anexo 3. Hoja de Vida del Estudiante**CURRICULUM VITAE****INFORMACIÓN PERSONAL****APELLIDOS:** VELEZ BRAVO**NOMBRES:** ALISON LILIBETH**ESTADO CIVIL:** SOLTERA**CEDULA DE CIUDADANÍA:** 1315854883**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** ROCAFUERTE, 24 DE ABRIL DE 1998**DIRECCION DOMICILIARIA:** PARROQUIA ALOAG – PANA AMERICANA SUR**NÚMEROS TELÉFONICOS:** 0990272674**E-MAIL:** alison.velez4883@utc.edu.ec, alisonlilibeth1998@gmail.com**EDAD:** 24 AÑOS**Instrucción Académica****PRIMARIA:** Educación Básica Escuela Fiscal Vicente Miranda**SECUNDARIA:** Unidad Educativa Machachi**BACHILLER:** Ciencias**TERCER NIVEL:** Universidad Técnica de Cotopaxi**CARRERA:** Ingeniera Agrónoma

Anexo 4. Hoja de Vida del Estudiante**CURRICULUM VITAE****INFORMACIÓN PERSONAL****APELLIDOS:** PAREDES VACA**NOMBRES:** LISBETH PAOLA**ESTADO CIVIL:** SOLTERA**CEDULA DE CIUDADANÍA:** 050461419-9**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** TOACASO, 30 de Julio de 1999**DIRECCION DOMICILIARIA:** PARROQUIA TOACASO – CALLE PICHINCHA**NÚMEROS TELÉFONICOS:** 0992871771**E-MAIL:** lisbeth.paredes4199@utc.edu.ec , paola30paredes@gmail.com**EDAD:** 23 AÑOS**Instrucción Académica****PRIMARIA:** Unidad Educativa Toacaso**SECUNDARIA:** Unidad Educativa Toacaso**BACHILLER:** Ciencias**TERCER NIVEL:** Universidad Técnica de Cotopaxi**CARRERA:** Ingeniera Agrónoma

Anexo 5. Hoja del Tutor

WILMAN PAOLO CHASI VIZUETE**HOJA DE VIDA****1.- DATOS PERSONALES**

NOMBRES Y APELLIDOS: Wilman Paolo Chasi Vizuete

CEDULA DE CIUDADANÍA: 050240972-5

FECHA DE NACIMIENTO: 05 de Agosto de 1979

DOMICILIO: Parroquia Guaytacama (Barrio Centro, Calle Sucre)

NUMEROS TELÉFONICOS: Convencional 032690063 Celular: 0984203033

E-MAIL: paolochv@yahoo.com.mx / wilman.chasi@utc.edu.ec

LUGAR DE TRABAJO: Universidad Técnica de Cotopaxi (Campus Salache)

DIRECCION DE TRABAJO: Cantón Latacunga, Parroquia Eloy Alfaro, Sector Salache

TELEFONO DEL TRABAJO: 032266164

E-MAIL DEL TRABAJO: caren@utc.edu.ec

2.- ESTUDIOS REALIZADOS

INSTRUCCIÓN PRIMARIA: Escuela "Simón Bolívar"

INSTRUCCIÓN SECUNDARIA: Instituto Tecnológico "Vicente León".
Latacunga / Cotopaxi.

TÍTULO: **Bachiller en Ciencias Físico Matemáticas**

INSTRUCCIÓN SUPERIOR: Universidad Técnica Cotopaxi.
Latacunga / Cotopaxi.

TÍTULO TERCER NIVEL: **Ingeniero Agrónomo**

INSTRUCCIÓN SUPERIOR: Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE.
Sangolquí / Pichincha

TÍTULO CUARTO NIVEL: **Magister en Agricultura Sostenible**

WILMAN PAOLO CHASI VIZUETE

3.- EXPERIENCIA LABORAL**3.1. Experiencia Profesional**

- Asistente Técnico Nutrición y Fertilización SIERRAFLORES Cia. Ltda
- Jefe de Finca FLORICESA Florícolas del Centro S.A

3.2. Experiencia en Docencia universitaria

- Docente Ocasional Tiempo Completo. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

3.2.1 Experiencia profesional en el campo del conocimiento.

- Docente de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Carrera de Ingeniería Agronómica, Ingeniería Agroindustrial e Ingeniería Ambiental. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.
- Dirección de proyectos de vinculación. Dirección de Vinculación con la Sociedad. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

3.3. Experiencia en funciones de gestión académica

- Comisionado de Vinculación social de La Carrera de Ingeniería ambiental. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI. Periodo Octubre 2016 – hasta la actualidad

4.- PROYECTOS REALIZADOS

TIPO: Vinculación

TEMA: Estrategias de sensibilización y conservación ambiental en sectores priorizados de la Provincia de Cotopaxi.

ESTADO: En ejecución

TIPO: Vinculación

TEMA: Restauración forestal con especies nativas en las comunidades y parroquias de la provincia de Cotopaxi Estrategias de sensibilización y conservación ambiental en sectores priorizados de la provincia de Cotopaxi.

ESTADO: En ejecución

WILMAN PAOLO CHASI VIZUETE

5.-ARTICULOS PUBLICADOS (PRODUCCION CIENTIFICA)

- **CONTEMPORARY RESEARCHS ON AGRICULTURAL PESTICIDES: CHALLENGES FOR THE FUTURE** Publicado en Avid Science Book (Pesticides) Chapter 3. **ISBN 978-93-86337-19-1**

- **MORFOLOGÍA, FENOLOGÍA, NUTRIENTES Y RENDIMIENTO DE SEIS ACCESIONES DE *Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pav (MASHUA)** Publicado en Tropical and Subtropical Agroecosystems, 21 N° 1 (2018) **ISSN :1870-0462**

- **EVALUACION DE ENMIENDAS ORGANICAS EN TRES CULTIVOS DE SISTEMAS AGRICOLAS URBANOS** Aceptado en Tropical and Subtropical Agroecosystems, 22 N° 1 (2019) **ISSN :1870-0462**

- **COMPORTAMIENTO AGRONOMICO Y COMPOSICIÓN QUIMICA DEL PASTO TANZANIA Y BRACHIARIA BRIZANTHA EN EL CAMPO EXPERIEMENTAL LA PLAYITA UTC – LA MANA** Publicado en libro de resúmenes del Congreso Internacional de Sociedad en Armonía con la Naturaleza, marzo del 26 al 28 del 2014. **ISBN 978-9942-932-12-9**

11.- REFERENCIAS PERSONALES

- Doctor Franklin Tapia Defaz. RECTOR DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA.
 - Doctor Robin Tapia Tapia. COMISARIO PROVINCIAL DE SALUD DE COTOPAXI.
 - Licenciado Olmedo Iza SUBSECRETARIO DE LA DEMARCACION HIDROGRAFICA DE LA CUENCA DEL PASTAZA
 - Doctor Edison Samaniego VICERECTOR ADMINISTRATIVO DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZONICA
-