



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE AGRONOMÍA

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE  
*Cannabis Sativa L.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN  
LATACUNGA”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Ingeniera Agrónoma

**Autora:**  
Pacheco Oñate Erika Viviana

**Tutor:**  
Chasi Vizquete Wilman Paolo

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Febrero 2024**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Pacheco Oñate Erika Viviana, con cédula de ciudadanía N° 0502595663; declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACION DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACION IN VITRO DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA”**, siendo el Ingeniero Mg. Wilman Paolo Chasi Vizuite, Tutor del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 16 de febrero del 2024



Erika Viviana Pacheco Oñate  
CC: 0502595663  
**ESTUDIANTE**

## 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 **PACHECO OÑATE ERIKA VIVIANA**, identificada con cédula de ciudadanía **0502595663**, de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema, en calidad de Rectora 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 DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA**” la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

### **Historial académico:**

Fecha de inicio de la carrera: Octubre 2020 – Marzo 2021

Fecha de finalización: Octubre 2023 - Marzo 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de mayo del 2023

Tutor: Ingeniero Mg. Wilman Paolo Chasi Vizuete.

Tema: “**EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA**”

**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 SEPTIMA. - CLAUSULA 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 las cláusulas cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá en pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DECIMA.** - 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 UNDECIMA.** - 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 2024



Erika Viviana Pacheco Oñate  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

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

**“EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA”**, de Pacheco Oñate Erika Viviana 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 2024



Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuite, Mg.

CC: 0502409725

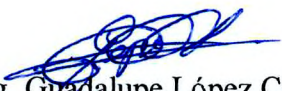
**DOCENTE TUTOR**

## **AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN**

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, la postulante: Pacheco Oñate Erika Viviana, con el título de Proyecto de Investigación **“EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.


Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 16 de febrero del 2024



Ing. Guadalupe López Castillo, Mg.  
C.C: 1801902907

**LECTOR 1 (PRESIDENTE)**



Ing. Alexandra Isabel Tapia Borja, Mg.  
C.C: 0502661754

**LECTOR 2 (MIEMBRO)**



Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D.  
C.C: 0502329238

**LECTOR 3 (MIEMBRO)**

## **AGRADECIMIENTO**

*Primeramente, quiero agradecer a Dios por brindarme vida, salud para poder culminar una etapa más de mi vida en el ámbito profesional. Agradezco a la Universidad Técnica de Cotopaxi por abrirme sus puertas y poder formar parte de ella. A mis padres: Sergio Pacheco y Jeaneth Oñate que fueron un pilar fundamental en el camino a pesar de las dificultades que se presentaron siguieron apoyándome incondicionalmente brindándome su fuerza y su apoyo.*

*También de manera especial a mi Tutor de tesis Mg. Wilman Paolo Chasi Vizuite por guiarme y ayudado para culminar la tesis.*

*Erika Viviana Pacheco Oñate*

## ***DEDICATORIA***

*A Dios quien supo darme la sabiduría, guiarme por el buen camino y darme la tenacidad para culminar mi vida estudiantil.*

*A mis padres Sergio y Jeaneth que me brindaron su apoyo incondicional durante los duros momentos que se presentaron en mi vida estudiantil. A mi familia por brindarme su amor y su cariño, gracias a cada uno de ellos por estar presentes en todo momento.*

*Erika Viviana Pacheco Oñate*



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *Cannabis sp.* EN CONDICIONES CONTROLADAS EN EL CANTÓN LATACUNGA”.**

**Autor:**  
Pacheco Oñate Erika Viviana

**RESUMEN**

En esta investigación se desarrolló un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Cannabis sp.* para el cultivo y obtención de nuevas variedades de uso industrial. En fase 1 se evaluó el porcentaje de germinación *in vitro* y en turba de distintas variedades locales (C.Sativa; C.indica; C.Ruderalis). En fase 2 se subcultivaron los aquenios germinados en turba más la adición de auxina, 6-bencil amino purina (6-BAP), macro y micronutrientes; y en fase 3 se optimizó el proceso de multiplicación de brotes *in vitro*. Se utilizó variedades CRNTIO, M.B., y V.P, y el medio de cultivo GENNBIO\_021TC. Se evaluó tratamientos usando porcentajes, y se analizó caracteres cuantitativos entre variedades mediante el análisis de varianza (ANVA). El porcentaje de germinación *in vitro* para M.B. = 32%, seguido de CNRTIO = 16%, y en turba P.V. = 8%, y M.B. = 93.75%. En fase 2 el número de hojas (media) fue estadísticamente diferente entre P.V. = 14 y M.B. = 10.67; la longitud de explanto (cm), y el número de nudos fueron similares entre P.V. y M.B. En fase 3 se obtuvo diferencias significativas para número de brotes u hojas (media  $\pm$  E.E.) entre P.V. =  $1.70 \pm 0.51$  y M.B. =  $0.00 \pm 0.51$ , también se obtuvo diferencias significativas para la longitud de explanto (mm) entre P.V. =  $2.00 \pm 0.57$  y M.B. =  $0.00 \pm 0.57$ ; y en CRNTIO2 se observó respuesta de callogénesis en presencia de kinetina en el medio de cultivo seleccionado. El impacto de este proyecto es el desarrollo de un protocolo eficiente de multiplicación de brotes, y regeneración de plántulas de cáñamo para ser transformadas genéticamente, y conservadas en bancos de germoplasma para usos industriales en Cotopaxi-Ecuador.

**Palabras clave:** variedad local, reguladores de crecimiento vegetal, aquenio, planta madre, micro propagación.

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**  
**FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES**

**TITLE: “EVALUATION OF AN IN VITRO MULTIPLICATION PROTOCOL OF *Cannabis sp.* IN CONTROLLED CONDITIONS IN THE LATACUNGA CANTON.”**

**Author:**  
Pacheco Oñate Erika Viviana

**ABSTRACT**

In this research, an in vitro multiplication protocol of *Cannabis sp.* for the cultivation and obtaining of new varieties for industrial use. In phase 1, the percentage of germination in vitro and in peat of different local varieties (*C.Sativa*; *C.indica*; *C.Ruderalis*) was evaluated. In phase 2, the germinated achenes were subcultured in peat plus the addition of auxin, 6-benzyl amino purine (6-BAP), macro- and micronutrients; and in phase 3 the in vitro shoot multiplication process was optimized. CRNTIO, M.B., and V.P varieties were used, and the GENNBIO\_021TC culture medium was used. Treatments were evaluated using percentages, and quantitative characters were analyzed between varieties using analysis of variance (ANVA). The in vitro germination percentage for M.B. = 32%, followed by CNRTIO = 16%, and in peat P.V. = 8%, and M.B. = 93.75%. In phase 2 the number of leaves (mean) was statistically different between P.V. = 14 and M.B. = 10.67; explant length (cm), and the number of nodes were similar between P.V. and M.B. In phase 3, significant differences were obtained for the number of shoots or leaves (mean  $\pm$  S.E.) between P.V. =  $1.70 \pm 0.51$  and M.B. =  $0.00 \pm 0.51$ , significant differences were also obtained for explant length (mm) between P.V. =  $2.00 \pm 0.57$  and M.B. =  $0.00 \pm 0.57$ ; and in CRNTIO2, a callogenesis response was observed in the presence of kinetin in the selected culture medium. The impact of this project is the development of an efficient protocol for the multiplication of shoots, and regeneration of hemp seedlings to be genetically transformed, and conserved in germplasm banks for industrial uses in Cotopaxi-Ecuador.

**Keywords:** local variety, plant growth regulators, achene, mother plant, micro propagation.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	3
3.1. Beneficiarios directos.....	3
3.2. Beneficiarios indirectos. ....	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. OBJETIVOS.....	5
5.1. Objetivo general.....	5
5.2. Objetivos específicos .....	5
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS .....	6
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
7.1. La planta de cannabis (cáñamo) .....	7
7.2. Taxonomía .....	7
7.3. Descripción botánica.....	7

7.4.	Descripción morfológica.....	8
7.4.1.	Descripción morfológica por especie .....	9
7.5.	Usos comerciales del cannabis.....	9
7.6.	Propagación <i>in vitro</i> .....	10
7.6.1.	Semilla.....	10
7.6.2.	Otros explantos.....	11
7.6.3.	Reguladores de crecimiento vegetal.....	11
8.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS .....	12
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	12
9.1.	Metodología.....	12
9.1.1.	Cuantitativa:.....	12
9.1.2.	Experimental:.....	12
9.2.	Método de investigación:.....	12
9.3.	Nivel exploratorio:.....	12
9.4.	Técnicas de investigación:.....	12
9.5.	Diseño experimental .....	13
9.6.	Introducción y germinación (Fase 1).....	13
9.7.	Aquenios germinados (Fase 2).....	13
9.8.	Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> (Fase 3).....	14
9.8.1.	Número de brotes u hojas .....	15
9.8.2.	Longitud de explanto (mm).....	15
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	16
10.1.	Introducción y germinación (Fase 1).....	16
10.1.1.	Porcentaje de Germinación.....	16
10.2.	Aquenios germinados (Fase 2).....	17
10.2.1.	Número de hojas.....	17
10.2.2.	Longitud de explanto (cm).....	17

10.2.3. Número de nudos.....	17
10.3. Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> (Fase 3).....	18
10.3.1. Número de brotes u hojas .....	18
10.3.2. Longitud de explanto (mm).....	19
11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS) .....	21
12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO.....	21
13. CONCLUSIONES.....	22
14. RECOMENDACIONES .....	22
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta de cannabis. ....	7
Tabla 2. Reguladores de crecimiento aplicados a segmentos nodales de aquenios germinados. .....	14
Tabla 3. Medidas resumen de datos tabulados por variedad en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.....	14
Tabla 4. ADEVA para número de brotes u hojas en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.....	15
Tabla 5. ADEVA para longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.....	15
Tabla 6. Número de brotes u hojas multiplicados in vitro en variedades de cannabis.....	18
Tabla 7. Longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación in vitro en variedades de cannabis. ....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Introducción y germinación in vitro de aquenios. Fuente: GENNBIO.....	16
Figura 2. Introducción y germinación en turba y fisiología in vitro de aquenios. Fuente: GENNBIO .....	17
Figura 3. Aquenios germinados y subcultivados en turba dentro de cápsula de crecimiento. Fuente: GENNBIO .....	17
Figura 4. Multiplicación de brotes en segmentos nodales de aquenios germinados. Fuente: GENNBIO;ERIKA PACHECO .....	18
Figura 5. Longitud de explanto (mm) en variedades de cannabis con diferentes reguladores de crecimiento. Letras distintas forman grupos con diferencias en sus promedios según la prueba de Tukey. ....	19
Figura 6. Longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación in vitro de la variedad P.V. en presencia de kinetina. Fuente: GENNBIO; ERIKA PACHECO .....	20

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

**Título del Proyecto:** “Evaluación de un protocolo de multiplicación in vitro de *cannabis sativa* L. en condiciones controladas en el cantón Latacunga”.

**Fecha de inicio:** Mayo del 2023

**Fecha de finalización:** Febrero del 2024

**Lugar de ejecución**

**Barrio:** Latacunga

**Parroquia:**

**Cantón:** Latacunga

**Provincia:** Cotopaxi

**Zona:** 3

**Institución:** Universidad Técnica de Cotopaxi

**Facultad que auspicia:** Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**Carrera que auspicia:** Carrera de Agronomía.

**Proyecto de investigación vinculado:** Multiplicación in vitro

### **Equipo de Trabajo**

- **Tutor de Titulación:** Ing. Mg. Vizuite Chasi Wilman Paolo
- **Investigador 1:** Pacheco Oñate Erika Viviana

**Área de Conocimiento:** Ingeniería, industria y construcción.

**Línea de investigación:** Desarrollo y seguridad alimentaria.

**Sub líneas de investigación de la Carrera:** Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano y social.



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En la industria de *Cannabis spp.* existen cientos de variedades psicoactivas y no psicoactivas, cuyos usos son destinados principalmente al campo medicinal, cultural y recreacional; la industria cannábica tiene alto potencial de crecimiento debido al incremento en el número de países enfocados en su uso medicinal. La producción mundial de *Cannabis* ha aumentado desde 2011 al 2017 llegando a 406.1 toneladas (t), y se espera que el mercado mundial formal pase de 7% en 2018 a 44% en 2025, moviendo 214 billones de dólares (166 formales y 48 informales) (Ramírez, Naranjo y Torres 2018). Entre las ventajas encontradas para hacer viable el cultivo de estas especies en países cercanos a la línea ecuatorial se menciona un marco legal adecuado, menores costos de producción (luminosidad, mano de obra, insumos), buena infraestructura productiva, disponibilidad, y un tejido productivo favorable (farmacia y floricultura). Es importante fomentar la industria del *Cannabis* por su potencial para la generación de empleo, y exportación (Ramírez, Naranjo y Torres 2018).

Es uno de los cultivos más antiguos del hombre, es fuente de fibra de cáñamo, aceite, aquenios (semillas alimenticias), propiedades narcóticas usadas en medicina y farmacología en el tratamiento de enfermedades, y aceptada en muchas religiones del mundo (Schultes *et al.* 2000). Botánicamente, es parte de la familia Cannabaceae, que contiene dos géneros, *Cannabis* y *Humulus*; y tres especies para el presente cultivo, *C. indica*, *C. sativa*, y *C. ruderalis*, distintas por su modo de crecimiento, aquenios, y principalmente por su fibra (Schultes *et al.* 2000; Thomas 2012). En años recientes, el principio activo cannabidiol (CBD), antagonista indirecto de tetrahidrocannabinol (THC), recibe más atención debido a su importancia farmacológica por sus efectos no adictivos.

Existe una normativa legal para fines medicinales o terapéuticos e industriales. El contenido debe ser menor al 1% de THC y entre 10-15% de CBD. Además, existen siete licencias: 1) Importación y comercialización de semillas; 2) Siembra y producción de semillas; 3) Cultivo de *Cannabis*; 4) Cultivo de cáñamo para uso industrial; 5) Procesamiento y producción de derivados; 6) Fitomejoramiento y/o bancos de germoplasma e investigación; 7) Adquisición de derivados y/o biomasa o flor de *Cannabis* (Ministerio de Agricultura y Ganadería 2020; Changoluisa y Peñafiel 2021).

### **3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

#### **3.1. Beneficiarios directos.**

Agricultores y productores de Cannabis.

#### **3.2. Beneficiarios indirectos.**

Beneficiarios indirectos los estudiantes de la carrera de Ingeniería de agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi, mediante el proyecto de Evaluación de un protocolo de multiplicación in vitro de Cannabis. En la actualidad existen emprendimientos innovadores utilizando derivados de esta planta, siendo sus proveedores los agricultores que utilizan muchos recursos en el cultivo; por lo tanto, se beneficia el sector agrícola, y el desarrollo agroindustrial del país. En Ecuador unas 700 empresas están asociadas al cáñamo y el uso de sus derivados en la elaboración de diversos productos.

### **4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La efectividad del protocolo de multiplicación in vitro de Cannabis sp. en condiciones controladas en el Cantón Latacunga, considerando variables como el tiempo de cultivo, la concentración de nutrientes, la calidad del medio de cultivo, la tasa de supervivencia y el crecimiento de las plántulas.

Este estudio se llevará a cabo durante un período de tiempo específico, que podría ser de varios meses o años, dependiendo de la duración del protocolo de multiplicación in vitro y la recolección de datos necesaria para evaluar su efectividad. Se podría comenzar con la fase experimental del protocolo tan pronto como se hayan establecido las condiciones adecuadas de laboratorio y se hayan obtenido los materiales necesarios.

La viabilidad de utilizar el protocolo de multiplicación in vitro como una técnica eficiente y confiable para la producción masiva de plantas de Cannabis sp. en el Cantón Latacunga esta sirve para comprender los factores ambientales, nutricionales y genéticos que pueden influir en el éxito del proceso de multiplicación in vitro y cómo optimizarlos para obtener los mejores resultados

La alternativa sostenible y rentable para la propagación de Cannabis sp., especialmente en áreas donde las condiciones climáticas o legales pueden dificultar su cultivo al aire libre. Además, contribuye al conocimiento científico y tecnológico relacionado con la biotecnología vegetal y la producción de cultivos, particularmente en el contexto específico de Cannabis en el Cantón Latacunga.

El problema de investigación establece el contexto, la importancia y los objetivos de evaluar un protocolo de multiplicación in vitro de Cannabis sp. en condiciones controladas en el Cantón Latacunga, proporcionando una base sólida para el diseño y la realización de la investigación.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

- Evaluar un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Cannabis sp.* en condiciones controladas.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Determinar el método estándar de germinación *in vitro* que presente el mejor porcentaje de germinación.
- Identificar las diferencias morfológicas entre variedades locales de cannabis (*Cannabis Sativa*).

## 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

<b>OBJETIVO 1</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>RESULTADOS</b>
- Determinar el método estándar de germinación <i>in vitro</i> que presente el mejor porcentaje de germinación.	Desinfección de explantos e introducción <i>in vitro</i> en condiciones asépticas.	Tratamiento de desinfección superficial de aquenios.	Porcentaje de germinación.
<b>OBJETIVO 2</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>RESULTADOS</b>
- Identificar las diferencias morfológicas entre variedades locales de cannabis ( <i>Cannabis Sativa</i> ).	Conteo y medición de variables morfológicas fisiológicamente <i>in vitro</i> .	Prueba de t para muestras independientes.	Número de hojas, longitud de explanto, y número de nudos.

## 7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

### 7.1. La planta de cannabis (cáñamo)

El nombre de cáñamo proviene de la antigua palabra inglesa *hænep* (fonéticamente *hemp*) y es el nombre común para todas las plantas de *Cannabis sativa*, aunque el término actualmente se refiere solo a cepas de *Cannabis* cultivadas por su fibra; distinto a los denominados cultivos de droga (Thomas 2012).

### 7.2. Taxonomía

La planta de cannabis es parte de la familia Cannabaceae (Terranova 1998) (Tabla 1), que contiene dos géneros, *Cannabis* y *Humulus*; y tres especies para el presente cultivo, *C. indica*, *C. sativa*, y *C. ruderalis*, distintas por su modo de crecimiento, aquenios, y principalmente por su fibra (Schultes et al. 2000; Thomas 2012).

**Tabla 1.**

*Clasificación taxonómica de la planta de cannabis.*

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Clase</b>	Angiospermae
<b>Subclase</b>	Dicotyledoneae
<b>Orden</b>	Urticae
<b>Familia</b>	Cannabaceae
<b>Género</b>	<i>Cannabis</i>
<b>Especie</b>	<i>indica, sativa, ruderalis</i>
<b>Nombres comunes</b>	<i>hemp, cáñamo, néctar de la delicia, marihuana</i>

### 7.3. Descripción botánica

La planta de cannabis es una planta resistente que crece en condiciones templadas y tropicales a lo largo del mundo y puede florecer en diversos y desafiantes ambientes (Thomas 2012); existen plantas monoicas con los dos sexos en la misma planta, y dioicas.

La raíz del cáñamo es principal o pivotante, pudiendo llegar a varios metros de profundidad (Ratikanta 1995). El tallo es delgado y erecto de 1-3 metros de longitud, y 4-20 milímetros de diámetro, sin ramificaciones si el cultivo es para fibra (Terranova 1998). El tallo óptimo para fibra es de 2 m de longitud y 5 mm de diámetro (Océano 1999). Las hojas miden hasta 15 cm de largo, son palmeadas, compuestas, lanceoladas con bordes dentados y ápice agudo; en

general presenta de 5-9 foliolos (Malpica 2004). Las flores masculinas se disponen en racimos en la parte terminal del tallo, de tamaño reducido y color amarillo-verdoso, con un pequeño pedúnculo junto al receptáculo con cinco sépalos, y cinco estambres con sus anteras que son biloculares, de dehiscencia longitudinal, y colgantes al madurar. Las inflorescencias se desarrollan hacia la parte superior de la planta con origen en las axilas de las hojas. Las flores femeninas se disponen en espigas en las axilas de las hojas, no tienen pétalos y presentan cáliz y estigmas claramente visibles. El cáliz es protuberante de color verde, entre 2-6 mm de longitud, en cuyo interior se encuentra el ovario donde se desarrolla la semilla. Los estigmas son pelillos de color blanco, amarillo, o rosa, que salen del cáliz. El fruto seco es un aquenio con una sola semilla rodeado por pericarpio (Ratikanta 1995; Océano 1999; Pilalumbo y Unaicho 2022).

#### **7.4. Descripción morfológica**

La raíz principal de *Cannabis* es pivotante, mide entre 30-40 cm de profundidad, a partir de ella se originan muchas raíces secundarias en los primeros 15-20 cm; la raíz alcanza 10% del total de la planta. (Hernández 2016).

El tallo es erguido, hueco, cónico y circular, y en determinadas zonas presenta acanaladuras; los entrenudos son largos y se acortan conforme se acercan al ápice; la corteza se compone de 65-70% de celulosa, 10-15% de hemicelulosa y 3-5% de lignina. Los haces fibrosos del tallo forman fibras primarias y secundarias; las fibras primarias presentan sección transversal e irregular y una pared espesa que no cierra el lumen interno, y una longitud de 5-40 mm y 20-50 mm de diámetro; las fibras secundarias son menos irregulares, y delgadas cuyas paredes espesas llenan completamente el lumen interno, son fuertemente lignificadas, con longitud de 2-4 mm y espesor de 15-17 mm (Hernández 2016).

Las hojas son diversas en forma y tamaño de acuerdo a la posición que ocupan en el tallo, y al sexo de la planta; las primeras hojas presentan un foliolo, y a medida que se desarrolla la planta aumenta el número de foliolos, son palmeadas; los foliolos de una planta madura van desde 5-11, generalmente 7, son lanceolados. El haz es de color verde intenso entorno al envés, con longitud de 15-20 cm y ancho de 1-3 cm (Hernández 2016).

Las flores femeninas son frondosas, cortas y agrupadas, son simples; el cáliz es de color verde, delgado con una fisura al costado, encierra al ovario y permite la salida de uno o dos estigmas. Mientras que, las flores masculinas son ramificadas, con mayor número de brácteas largas,

forman panículas axilares, tienen 5 sépalos de color amarillo o púrpura; las flores se abren al madurar y presentan 5 estambres (Hernández 2016).

La semilla se origina al interior de un aquenio de 3-6 mm de longitud y 2.5-4 mm de ancho, de forma ovalada y color pardo grisáceo o moteado; el pericarpio es duro y se compone de dos valvas soldadas; el peso varía entre 3-60 mg, generalmente oscilando entre 15-20mg (Hernández 2016; Pilalumbo y Unaicho 2022).

#### **7.4.1. Descripción morfológica por especie**

Las especies de *Cannabis* son clasificadas como una planta herbácea anual. Herbáceo simplemente significa que la planta es una hierba, y anual se refiere al ciclo de vida, es decir, la planta crece, se reproduce, y muere en una estación o temporada. Es una especie heliotrópica, prefiere la luz solar directa y los espacios abiertos, y por tanto crece escasamente en áreas sombreadas (Thomas 2012).

Las plantas de *C. sativa* son caracterizadas por sus hojas puntiagudas, y flores largas y delgadas. Se originan en las regiones ecuatoriales donde la estación de crecimiento es más caliente; generalmente no se utilizan para cultivo exterior en climas más fríos, aunque algunos híbridos pueden producir buenos rendimientos en tales condiciones. El efecto de *C. sativa* es más elevado que el de *C. indica* (Thomas 2012).

Las plantas de *C. indica* se originan en áreas *kush*-hinduistas de Asia Central, donde el clima es cambiante y las condiciones de crecimiento pueden ser severas; las plantas resistentes o tolerantes maduran temprano y son caracterizadas por sus hojas anchas y cortas, y flores pesadas y comprimidas. Las variedades de *C. indica* son ideales para cultivo interior y exterior en climas más frescos (Thomas 2012).

La especie *C. ruderalis* crece en forma silvestre en partes de Europa del Este y Rusia. Se caracteriza por su floración precoz, que en algunas plantas es independiente del fotoperiodo. *C. ruderalis* es ideal para el cultivo en climas más frescos y áreas donde las condiciones son severas. Existen variedades híbridas holandesas que combinan *C. ruderalis* y *C. indica* (Thomas 2012).

#### **7.5. Usos comerciales del cannabis**

Evidencia arqueológica muestra restos del cultivo de cáñamo desde el año 8000 A.C., con la producción textil de cáñamo iniciando al mismo tiempo que la producción de cerámica. El cáñamo juega un rol vital en el desarrollo humano, proporcionando vestimenta, fibra y alimento animal, contrario a las variedades de marihuana que tienen hasta 50 veces el contenido de THC



de algunas variedades de cáñamo. Buenas plantas de marihuana contienen alrededor de 15% de THC, y algunas variedades *skunk* contienen niveles mucho más altos. En contraste, las variedades de cáñamo típicamente contienen < 0.3% de THC (Thomas 2012).

A lo largo de la historia, el cáñamo nos ha proporcionado fibras naturales disponibles más resistentes. Hasta 1883 casi el 90% del papel del mundo fue hecho de fibra de cáñamo. La fibra de cáñamo dura mucho más que la celulosa, sin embargo, en la actualidad un 95% del papel sigue siendo hecho a partir de árboles como resultado directo de la prohibición del cultivo de cannabis. Cada tonelada de papel hecho de cannabis salva 12 árboles maduros, su procesamiento usa menos ácidos que el de celulosa de árbol, reduciendo la contaminación. La prohibición de cannabis genera la destrucción de miles de hectáreas de bosques cada año (Thomas 2012).

Las semillas de cáñamo fueron tradicionalmente usadas para hacer pasteles de alto contenido proteico para animales; los aquenios son más nutritivos que la soya y más digeribles, causando menos producción de gas en el intestino. Los aquenios de cannabis proveen una fuente completa de proteína vegetal con altos niveles de edestina y albúmina a los humanos; contiene alrededor de 30% de aceite que puede ser extraído y usado en medicina natural (Thomas 2012).

## **7.6. Propagación *in vitro***

La propagación *in vitro* de plantas es una técnica biotecnológica basada en el uso de las cualidades totipotentes de las células vegetales para el desarrollo de nuevas plantas a partir de un explanto obtenido de una planta madre. La integración de genotipo, ambiente, asepsia y medio de cultivo es primordial para el desarrollo exitoso de la técnica. Los medios de cultivo se diseñan para otorgar nutrientes a la planta, pH, humedad y demás factores para su desarrollo, depende del explanto y la especie; la composición y calidad del medio de cultivo mejora la respuesta (comportamiento, rendimiento, tolerancia, resistencia, otras) de características específicas al momento final del cultivo en tierra (Wahby 2007).

### **7.6.1. Semilla**

Se menciona que, para minimizar contaminación, se puede iniciar el cultivo de cannabis *in vitro* a partir de aquenios. Los aquenios se lavan con 5% de una solución blanqueadora y se enjaguan varias veces. Las plántulas crecen bien en medios como el M&S, y otros. Una caja magenta o envases más largos pueden ser usados para permitir una colección completa de tejido caulinar. Hongos y bacterias deben estar ausentes en la planta cultivada con aquenio (Zwenger 2014).

### **7.6.2. Otros explantos**

Investigadores en el cultivo de tejidos con *Cannabis* han encontrado éxito usando hojas, tallos, y otros explantos; tejidos jóvenes (pocas semanas) responden mejor a condiciones *in vitro* comparado con tejidos diferenciados, probablemente debido a la alta tasa de mitosis. Por esta razón, brotes y yemas axilares también son comúnmente usados como explantos (Zwenger 2014).

### **7.6.3. Reguladores de crecimiento vegetal**

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias naturales o sintéticas en respuesta a estímulos ambientales (luz, temperatura y humedad) que coordinan procesos esenciales para el normal desarrollo de las plantas (Doemer 2000; Wain 1980); y usadas *in vitro* en procesos de elongación, tropismos y dominancia apical. Los reguladores del crecimiento, fundamentalmente, auxinas, citocininas y giberelinas, sustentan el desarrollo de tejidos y órganos (Bhojwani y Razdan, 1996).

El AIA es la auxina más abundante en plantas superiores pese a encontrarse comúnmente en concentraciones nanomolares, y fisiológicamente la más relevante. El AIB es un compuesto endógeno más eficiente que el AIA en la formación de raíces laterales (Jordan y Casaretto 2006). AIA y AIB se utilizan para enraizamiento, y en interacción con una citocinina para proliferación de brotes (Bhojwani y Razdan 1996).

Las citocininas más utilizadas son 6-bencil aminopurina (6-BAP), 6-dimetil aminopurina (2iP), N-2-furanilmetil-1-H-purina-6-amina (KIN, kinetina), 6-4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenil aminopurina (ZEA, zeatina) y 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (TDZ, thidiazuron); ZEA y 2iP son naturales, siendo la zeatina más efectiva (Saad y Elshahed 2012; Morales y Chiluisa-Utreras 2022).

## **8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS**

- El porcentaje de germinación in vitro entre distintas variedades locales de cannabis y cómo se compara este porcentaje con el método estándar de germinación.
- Las diferencias morfológicas observadas entre distintas variedades locales de cannabis en términos de recuento de hojas, longitud del explanto y número de ramificaciones.
- La eficacia de la multiplicación in vitro de cannabis entre las distintas variedades o tratamientos fitohormonales, según los resultados del análisis de varianza (ADEVA)

## **9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **9.1. Metodología**

#### **9.1.1. Cuantitativa:**

Se llevó a cabo una evaluación de la multiplicación in vitro en el estudio de laboratorio, el cual se sustentó en la recopilación de datos a través de la tabulación de variables para determinar los resultados obtenidos.

#### **9.1.2. Experimental:**

En este tipo de investigación, se controló una variable independiente para observar los cambios y efectos que esta provocó. Se manipularon las variables experimentales de la multiplicación in vitro para identificar su eficacia en el control de contaminación en la turba.

### **9.2. Método de investigación:**

Se empleó el método científico a lo largo de la investigación, utilizando conceptos, definiciones e hipótesis para demostrar lo planteado en el estudio.

### **9.3. Nivel exploratorio:**

Este tema de investigación ha sido poco explorado por distintos autores. Los resultados se obtuvieron a través de los objetivos establecidos y de la revisión de literatura relacionada con el problema de estudio, lo que proporcionó una base para implementar su uso medicinal.

### **9.4. Técnicas de investigación:**

Se llevó a cabo una observación científica mediante un monitoreo en campo durante el período determinado para cada muestreo, utilizando un proceso destructivo de la planta. El registro de datos se realizó tres días después de la aplicación de los tratamientos, según las variables específicas.

### 9.5. Diseño experimental

Los aquenios de *Cannabis sp.*, variedades locales CRNTIO (CERENTIO), M.B. (Mango Beach) y P.V. ( Variedad Purple) , fueron adquiridos mediante encargo por la empresa GENNBIO (Breeding\_Genetics\_Biotechnology) a través de REDES DE LIBERTAD. El trabajo experimental abarcó las siguientes fases: introducción y germinación (Fase 1), aquenios germinados (Fase 2), y multiplicación de brotes *in vitro* (Fase 3). En la Fase 1 se utilizó el medio de cultivo GENNBIO\_021TC (Morales y Andrade 2023; Morales y Chiluisa-Utreras 2022), con sacarosa 2.5% (p/v) y carbón activado 0.05% (p/v), pH ajustado a 5.8 y previamente autoclavado a 121 °C durante 20 minutos; en la Fase 2 se utilizó turba más la adición de 6-bencil amino purina (6-BAP) (Galán-Ávila et al. 2020; Villezcas 2020), macro y micronutrientes; y en la Fase 3 se optimizó el proceso de multiplicación de brotes *in vitro* adicionando kinetina (KIN) a los tratamientos (Wang et al. 2009). En todas las fases los cultivos permanecieron en cámara de crecimiento a temperatura de  $24 \pm 2$  °C, y luz blanca con fotoperiodo de 16 horas luz, y 8 horas oscuridad.

### 9.6. Introducción y germinación (Fase 1)

Se aplicó un tratamiento de desinfección previo a la introducción *in vitro* mediante imbibición de los aquenios en agua corriente durante 20 minutos (Chaohua et al. 2016), y esterilizando superficialmente con alcohol etílico 75% (v/v) durante 2 minutos y 30 segundos, seguido de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 3% (v/v) con agente surfactante durante 25 minutos (Galán-Ávila et al. 2020), y varios lavados con agua destilada estéril después de cada agente desinfectante. El tratamiento de desinfección conjugó investigaciones con aquenios como explanto inicial. Las variables registradas fueron porcentaje de germinación, y contaminación.

### 9.7. Aquenios germinados (Fase 2)

Aquenios germinados CERENTIO(CRNTIO) (*in vitro*), MANGO BEACH(M.B.) (*in vitro*), y VARIEDAD PURPLE(P.V.) (turba), fueron subcultivados en turba previamente autoclavada, conteniendo 2.0 mg/l de 6-BAP (Galán-Ávila et al. 2020; Villezcas 2020), macro y micronutrientes en vasos plásticos sellados para evitar la deshidratación del explanto. Las variables registradas fueron número de hojas, longitud de explanto (cm), y número de nudos.

### 9.8. Multiplicación de brotes *in vitro* (Fase 3)

Segmentos nodales de aquenios germinados fueron nuevamente subcultivados en medio GENNBIO\_021TC con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (Tabla 2).

**Tabla 2.**

*Reguladores de crecimiento aplicados a segmentos nodales de aquenios germinados.*

<b>Explanto</b>	<b>Reguladores de crecimiento</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Explanto fase 2 (M.B. y P.V.)	0.25 mg·L <sup>-1</sup> AIA y 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP	(Galán-Ávila et al. 2020; Villezcas 2020)
Explanto fase 2 (M.B. y P.V.)	2.0 mg·L <sup>-1</sup> KIN	(Wang et al. 2009)
Planta madre (CRNTIO)	0.25 mg·L <sup>-1</sup> AIA y 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP; 2.0 mg·L <sup>-1</sup> KIN	(Galán-Ávila et al. 2020; Villezcas 2020; Wang et al. 2009)

Los datos se dispusieron en diseño factorial 2 x 2, dos variedades, dos tratamientos fitohormonales (regulador), y n repeticiones; y a través del análisis de la varianza (ADEVA) se compararon medias usando la prueba de Tukey; las variables registradas fueron número de brotes u hojas, y longitud de explanto (mm) (Tabla 3). Adicionalmente, se realizaron cultivos exploratorios con explantos de planta madre. Se usaron los paquetes estadísticos INFOSTAT versión 2008 y Minitab 16.

**Tabla 3.**

*Medidas resumen de datos tabulados por variedad en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.*

<b>Variedad</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>E.E.</b>
M.B.	Número de brotes u hojas	10	0.00	0.00
P.V.	Número de brotes u hojas	10	1.70	0.73
M.B.	Longitud de explanto	10	0.00	0.00
P.V.	Longitud de explanto	10	2.00	0.83

### 9.8.1. Número de brotes u hojas

En un diseño completamente al azar (DCA), la interacción variedad\*regulador no presentó diferencias significativas, dado que el valor-p = 0.2213; por lo tanto, se continuó el análisis con los efectos principales variedad y regulador, enviando el efecto variedad\*regulador al error; de este modo, el número de brotes u hojas fue estadísticamente diferente entre variedades, con valor-p = 0.0304 (Tabla 4)

**Tabla 4.**

*ADEVA para número de brotes u hojas en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18,50	2	9,25	3,57	0,0508
Variedad	14,45	1	14,45	5,58	0,0304
Regulador	4,05	1	4,05	1,56	0,2282
Error	44,05	17	2,59		
Total	62,55	19			

### 9.8.2. Longitud de explanto (mm)

En un diseño completamente al azar (DCA), la interacción variedad\*regulador no presentó diferencias significativas, dado que el valor-p = 0.1393; no obstante, aplicando la prueba de Tukey se pueden observar grupos diferentes.

Se continuó el análisis con los efectos principales variedad y regulador, enviando el efecto variedad\*regulador al error; de este modo, la longitud de explanto fue estadísticamente diferente entre variedades, con valor-p = 0.0234 (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*ADEVA para longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación in vitro de Cannabis sp.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27,20	2	13,60	4,22	0,0325
Variedad	20,00	1	20,00	6,20	0,0234
Regulador	7,20	1	7,20	2,23	0,1534
Error	54,80	17	3,22		
Total	82,00	19			

## 10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

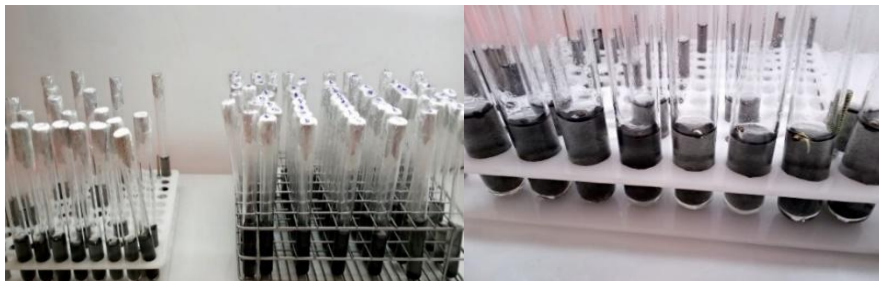
El material consistió de aquenios producto de un proceso de selección genético, adaptados a la línea ecuatorial. El método fue desarrollado para cultivares de *Cannabis sativa* L.; las variedades locales son poblaciones heterocigotas a causa de la polinización cruzada; y representan un acervo génico importante en programas de mejoramiento vegetal.

### 10.1. Introducción y germinación (Fase 1)

En esta investigación un aquenio se considera germinado (Figura 1), cuando la radícula supera 1 mm de longitud fuera de su cubierta (Prohens, Soler y Nuez 1999). Se recomienda el uso de antibióticos después de la desinfección con alcohol o cloro (Smith 200), para evitar contaminación una vez germinados los aquenios.

#### 10.1.1. Porcentaje de Germinación

El mayor porcentaje de germinación *in vitro* (n = 50) se obtuvo con la variedad M.B. = 32%, seguido de CNRTIO = 16%, y en turba con P.V. = 8%. Estudios previos con *Cannabis* mencionan un porcentaje germinación *in vitro* (5%) similar al obtenido con la variedad P.V., no obstante, la concentración de agar-agar y las variedades son clave para incrementar estos porcentajes y reducir el tiempo de germinación y aparición de cotiledones (< 7 días), puesto que por medio de métodos tradicionales la germinación y aparición de cotiledones ocurre a partir del cuarto día en variedades importadas de cáñamo (Simbaña 2005); previamente se obtuvo mayores porcentajes de germinación en turba (n = 16) con M.B. = 93.75% (Figura 2), Al utilizar estos métodos, *in vitro* y en turba, se generan microambientes nutritivos controlados (Ioannidis, Tomprou, y Mitsis 2022), se reduce el espacio, y se optimizan los tiempos.



**Figura 1.** Introducción y germinación *in vitro* de aquenios. Fuente: GENNBIO



**Figura 2.** *Introducción y germinación en turba y fisiología in vitro de aquenios. Fuente: GENNBIO*

## 10.2. Aquenios germinados (Fase 2)

A medida que los explantos fueron desarrollándose, se descartaron aquellos denominados *off type*.

### 10.2.1. Número de hojas

El número de hojas (media) fue mayor en P.V. = 14 (n = 2) comparado con M.B. = 10.67 (n = 3); asumiendo que las varianzas son las mismas, y aplicando la prueba T para muestras independientes, estadísticamente estos promedios son significativamente diferentes, con un valor-p = 0.0099.

### 10.2.2. Longitud de explanto (cm)

Mientras que, la longitud de explanto (media) no presentó diferencias significativas entre P.V. = 11.7 cm y M.B. = 9.0 cm, y valor-p = 0.3067.

### 10.2.3. Número de nudos

Por su parte, el número de nudos fue estadísticamente similar entre P.V. = 6.5 y M.B. = 5.0, y valor-p = 0.2048 (Figura 3).



**Figura 3.** *Aquenios germinados y subcultivados en turba dentro de cápsula de crecimiento. Fuente: GENNBIO*



### 10.3. Multiplicación de brotes *in vitro* (Fase 3)

La multiplicación de brotes *in vitro* en *Cannabis sp.* se ejecutó adicionando soluciones de antibióticos al protocolo, principalmente fungicidas y bactericidas en concentraciones estandarizadas durante el proceso.

#### 10.3.1. Número de brotes u hojas

En un diseño completamente al azar (DCA), la interacción variedad\*regulador no presentó diferencias significativas, dado que el valor-p = 0.2213; por lo tanto, se continuó el análisis con los efectos principales variedad y regulador, enviando el efecto variedad\*regulador al error; de este modo, el número de brotes u hojas (media  $\pm$  E.E.) fue estadísticamente diferente entre P.V. =  $1.70 \pm 0.51$  y M.B. =  $0.00 \pm 0.51$ , con valor-p = 0.0304 (Tabla 6; Figura 4). En estudios previos con la variedad de cannabis Changtu se menciona la obtención de 1.83, 2.00, y 1.74 brotes auxiliares utilizando KT en fase de proliferación a los 14 días del subcultivo respectivo (Wang 2009), similar al número de brotes u hojas obtenidos en la presente investigación con la variedad P.V. utilizando explantos jóvenes, pues responden mejor a condiciones *in vitro* comparado con tejidos diferenciados, a causa de la alta tasa de mitosis (Zwenger 2014).

**Tabla 6.**

*Número de brotes u hojas multiplicados in vitro en variedades de cannabis*

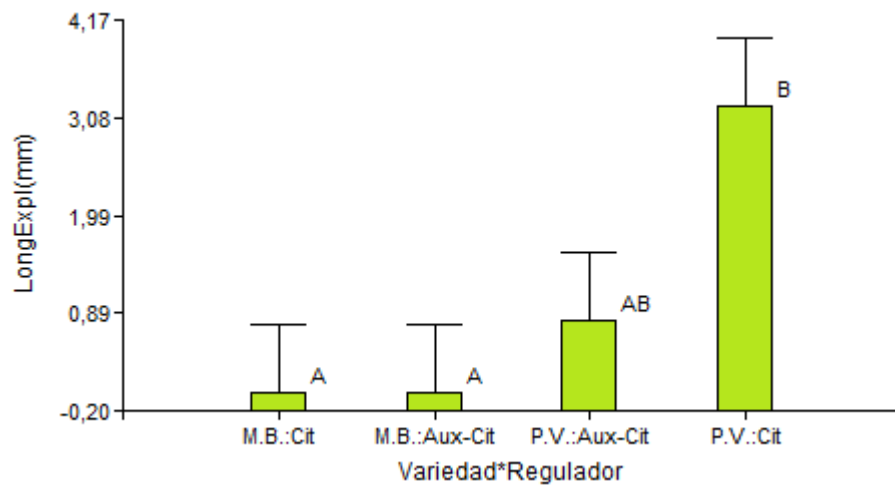
Variedad	Media $\pm$ E.E.	N	Grupo
P.V.	$1.70 \pm 0.51$	10	B
M.B.	$0.00 \pm 0.51$	10	A



**Figura 4.** Multiplicación de brotes en segmentos nodales de aquenios germinados. Fuente: GENNBIO; ERIKA PACHECO

### 10.3.2. Longitud de explanto (mm)

En un diseño completamente al azar (DCA), la interacción variedad\*regulador no presentó diferencias significativas, dado que el valor-p = 0.1393; no obstante aplicando la prueba de Tukey se pueden observar grupos diferentes, siendo el punto experimental P.V.:Cit = 3.20 mm  $\pm$  0.77 el que presentó mayor longitud de explanto (Figura 5), es decir se obtuvo el mejor resultado con la aplicación de KIN en la variedad P.V.



**Figura 5.** Longitud de explanto (mm) en variedades de cannabis con diferentes reguladores de crecimiento. Letras distintas forman grupos con diferencias en sus promedios según la prueba de Tukey.

Se continuó el análisis con los efectos principales variedad y regulador, enviando el efecto variedad\*regulador al error; de este modo, la longitud explanto (media  $\pm$  E.E.) fue estadísticamente diferente entre P.V. = 2.00  $\pm$  0.57 y M.B. = 0.00  $\pm$  0.57, con valor-p = 0.0234 (Tabla 7; Figura 6). La normalidad en los errores fue comprobada usando la prueba de Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk), con valor-p = 0.061.

**Tabla 7.**

Longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación *in vitro* en variedades de cannabis.

Variedad	Media $\pm$ E.E.	n	Grupo
P.V.	2.00 $\pm$ 0.57	10	B
M.B.	0.00 $\pm$ 0.57	10	A



**Figura 6.** Longitud de explanto (mm) en fase de multiplicación *in vitro* de la variedad P.V. en presencia de kinetina. Fuente: GENNBIO; ERIKA PACHECO

## 11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

Mediante la presente investigación se ha elaborado un protocolo eficiente para multiplicación *in vitro* de plántulas de cáñamo (*Cannabis sp.*) en Cotopaxi, Ecuador. El proceso innovador de tres pasos mejora la germinación y la tasa de multiplicación; definitivamente, un cambio en el juego para el desarrollo de nuevas variedades de esta planta. Además, evidencia el potencial de esta investigación cannábica mientras se allana el camino para la producción y preservación de plántulas de cáñamo de uso industrial, todo mientras se conserva la diversidad genética en bancos de germoplasma (Pacheco y Morales 2023).

## 12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

A continuación, se describe brevemente el presupuesto experimental del proyecto.

<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo (USD)</b>
Aquenios	3 packs (50 aquenios)	99.00
Fase 1	150 explantos	22.50
Fase 2 (modificado)	150 explantos	19.50
Fase 3 (modificado)	150 explantos	33.00
Modificación de protocolo	2 ejecuciones	100.00
Total	-	274.00 USD

### 13. CONCLUSIONES

En fase 1 la variedad de cannabis con el mayor porcentaje de germinación *in vitro* y usando turba fue M.B. = 32% y 93.75%, respectivamente; seguido de la germinación *in vitro* en CNRTIO = 16%, y P.V = 8%.

En fase 2 el número de hojas (media) fue estadísticamente diferente entre P.V. = 14 y M.B. = 10.67. La longitud de explanto (cm), y el número de nudos fueron similares entre P.V. y M.B.; no obstante, estos últimos son fundamentales para el proceso de multiplicación de brotes *in vitro* a escala industrial.

En fase 3 se demostró significativamente el mayor número de brotes u hojas (media  $\pm$  E.E.) en P.V. =  $1.70 \pm 0.51$ , también la mayor longitud de explanto (mm) en P.V. =  $2.00 \pm 0.57$  en presenmente, en CRNTIO2 se observó respuesta de callogénesis en presencia de kinetina en el medio de cultivo seleccionado.

### 14. RECOMENDACIONES

Se recomienda brindar capacitación a los involucrados en el proyecto, incluyendo a los agricultores y productores. Esto asegurará la correcta ejecución del protocolo y fomentará la comprensión y aceptación de las prácticas de multiplicación *in vitro* en la ciudad de Latacunga, fortaleciendo así el impacto del proyecto a nivel local.

Se recomienda realizar un estudio detallado y continuo de las condiciones ambientales, como temperatura, humedad y luz, durante el proceso de multiplicación *in vitro*. Al tomar en cuenta estas condiciones según las necesidades específicas de Cannabis sp. provocará un impacto significativo en la eficiencia y consistencia del protocolo.

Se sugiere establecer un sistema de monitoreo sistemático y registro de parámetros morfológicos clave, como el número de brotes, longitud del explanto y calidad de las plantas resultantes y llevar un registro detallado que permita una evaluación más precisa de la eficacia del protocolo y proporcionará datos valiosos para futuras mejoras y ajustes en el proceso de multiplicación *in vitro* de Cannabis sp en el cantón de Latacunga.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, P. y Benalcázar, W. (2021). El negocio del cannabis florece en Pedro Moncayo. El Comercio. Disponible en: [https://www.elcomercio.com/actualidad/negocio-cannabis-pedro-moncayo-cannandes.html?utm\\_source=facebook&utm\\_medium=social&utm\\_campaign=photopost&fbclid=IwAR30TtM4zHzDNwnDenn8eivroGTSqRXNisTKgBWWFooJDokHaeu1Cg5FhD0](https://www.elcomercio.com/actualidad/negocio-cannabis-pedro-moncayo-cannandes.html?utm_source=facebook&utm_medium=social&utm_campaign=photopost&fbclid=IwAR30TtM4zHzDNwnDenn8eivroGTSqRXNisTKgBWWFooJDokHaeu1Cg5FhD0)

Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. (1996) *Plant tissue culture: Theory and practice* (Ed. rev.). ELSEVIER, Delhi, India. 767 p.

Changoluisa, V. y Peñafiel, D. (2021). Análisis del potencial productivo del cannabis no psicoactivo (*Cannabis sativa*) con fines investigativos para la industrialización en la provincia de Cotopaxi (Tesis de grado). Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

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

Doemer, P. (2000) Cell division regulation. En B. Buchanan, W. Gruissem, y R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp: 528-567). American Society of Plant Physiologists, USA.

El Universo (2020) La legalización de la siembra, cultivo y cosecha de cannabis en Ecuador entró en vigor. Disponible en: <https://www.eluniverso.com/noticias/2020/06/26/nota/7886121/legalizacion-siembra-cultivo-cosecha-cannabis-ecuador-entro>

Galán-Ávila, A. y col. (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.

Hernández, U. M. (2016) Ensayo de variedades de cáñamo en La Vega Baja del Segura (Tesis de grado). Universidad Miguel Hernández, España. Disponible en: <http://dspace.umh.es/handle/11000/2971>

Ioannidis, K., Tomprou, I. y Mitsis, V. (2022) An alternative *in vitro* propagation protocol of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) presenting efficient rooting, for commercial production. *Plants* 11.1333, 1-17. <https://doi.org/10.3390/plants11101333>.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) (2016). Módulo ambiental de la encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. ESPAC 2016. Disponible en: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/Informacion\\_ambiental\\_en\\_la\\_agricultura/2016/informe\\_ejecutivo\\_ESPAC\\_2016.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/informe_ejecutivo_ESPAC_2016.pdf)

Malpica, K. (2004) Marihuana. Disponible en: [https://Marihuana - El cáñamo de las Indias \(mind-surf.net\)](https://Marihuana - El cáñamo de las Indias (mind-surf.net))

Ministerio de Agricultura y Ganadería (2020). Acuerdo Ministerial No. 109. 1, 48. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/10/109-2020-1.pdf>

Morales, J. y Andrade, P. (2023) Biotechnological plant breeding applied to purple blackberries. *Revis Bionatura* 8.1, 7. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.01.7>.

Morales, J. y Chiluisa-Utreras, V. (2022) *Mejoramiento biotecnológico de plantas y modificación genética*. Editorial Grupo Compás, Guayaquil, Ecuador. pp. 104-179.

Océano (Eds.) (1999) Enciclopedia práctica de la agricultura y ganadería. Barcelona, España. 462 p.

Pacheco, E. y Morales, J. (2023) *In vitro* multiplication of hemp (*Cannabis sp.*) in Cotopaxi-Ecuador. *London Journal of Research in Science: Natural and Formal* 23.7:1-9.

Pilalumbo, H. y Unaicho, M. (2022) Efecto de dos medios de cultivo y tres niveles de ácido giberélico en el crecimiento de cannabis (*Cannabis sativa*) obtenidas por germinación *in vitro* en el laboratorio de la facultad CAREN (Tesis de grado). Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

Prohens, J., Soler, S. y Nuez, F. (1999) The effects of thermotherapy and sodium hypochlorite treatments on pepino seed germination, a crucial step in breeding programmes. *Annals of Applied Biology*, 134.3, 299-305.

Ramírez, J., Naranjo, J. y Torres, A. (2018) La industria del cannabis medicinal en Colombia. Una ventana de oportunidad para la transformación productiva de Colombia. FEDEDESARROLLO, 18 sep.

Ratikanta, M. (1995) Fibras vegetales en el mundo: aspectos botánicos: calidad y utilidad. Trillas, México D. F., México. 300 p.

Saad, A. I. y Elshahed, A. M. (2012) Plant tissue culture media. En A. Leva, y L. Rinaldi (Eds.), *Recent advances in plant in vitro culture* (pp: 29-34). InTech.

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.

Simbaña, A. (2005) Evaluación de tres variedades de cáñamo (*Cannabis sativa var. sativa*) bajo tres densidades de siembra para la obtención de fibra (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica, Sede Ibarra, Ecuador.

Smith, R. H. (2000) *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. College Station, Texas, Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University, USA.



Terranova (Eds.) (1998) *Enciclopedia agropecuaria Terranova. Producción agrícola 2*. Tomo 3. Bogotá, Colombia. pp. 491-492.

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

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

Wahby, I. (2007) Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, España.

Wain, R. L. (1980) El control químico del crecimiento de las plantas. En N. R. Ondarza (Ed.), *Los reguladores de las plantas y los insectos* (pp: 13-27). CONACYT, México.

Wang, R. y col. (2009) A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot.* 41.2, 603-608.

Zwenger, S. (2014) *The biotechnology of Cannabis sativa*. 2<sup>nd</sup> Edition. Extreme Publications, Inc., New York, USA.