



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE AGRONOMIA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVO Y TRES NIVELES DE
ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL CRECIMIENTO DE CANNABIS
(*Cannabis sativa*) OBTENIDAS POR GERMINACIÓN INVITRO EN
EL LABORATORIO DE LA FACULTAD CAREN”.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingenieros Agrónomos

Autores:

Pilalumbo Cunuhay Hernán Bladimir
Unaicho Choloquina Mónica Isabel

Tutor:

Chasi Vizuete Wilman Paolo

LATACUNGA – ECUADOR
Agosto 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Hernán Bladimir Pilalumbo Cunuhay, con cédula de ciudadanía No. 0503313041 y Mónica Isabel Unaicho Choloquina, con cédula de ciudadanía No. 1751591064, declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: “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”, siendo el Ingeniero Mg. Chasi Vizuete Wilman Paolo, Tutor del presente trabajo; y, eximimos 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, 22 de agosto del 2022

Hernán Bladimir Pilalumbo Cunuhay
Estudiante
CC: 0503313041

Mónica Isabel Unaicho Choloquina
Estudiante
CC: 1751591064

Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, 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 **HERNÁN BLADIMIR PILALUMBO CUNUHAY**, identificado con cédula de ciudadanía **050331304-1** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. 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. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “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”, 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: Abril 2018 - Agosto 2018

Finalización de la carrera: Abril 2022 - Agosto 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 3 de junio del 2022

Tutor: Ingeniero Mg. Wilman Paolo Chasi Vizúete

Tema: “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”.

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, **EL 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 **EL 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 **EL 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 **EL 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 **EL 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 22 días del mes de agosto del 2022.

Hernán Bladimir Pilalumbo Cunuhay
EL CEDENTE

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, Ph.D.
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 **UNAUCHO CHOLOQUINGA MÓNICA ISABEL**, identificada con cédula de ciudadanía **1751591064** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. 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 “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”, 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: Abril 2018 - Agosto 2018

Finalización de la carrera: Abril 2022 - Agosto 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 3 de junio del 2022

Tutor: Ingeniero Mg. Wilman Paolo Chasi Vizúete

Tema: “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”.

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 22 días del mes de agosto del 2022.

Mónica Isabel Unaucho Choloquina
LA CEDENTE

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, Ph.D.
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“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”, de Pilalumbo Cunuhay Hernán Bladimir y Mónica Isabel Unaucho Choloquina, 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, 22 de agosto del 2022

Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 050249725-0

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: Pilalumbo Cunuhay Hernán Bladimir y Unaucho Choloquina Mónica Isabel, con el título del Proyecto de Investigación: **“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”**, 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, 22 de agosto del 2022

Lector 1 (Presidente)
Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D.
CC: 050232923-8

Lector 2
Ing. Francisco Hernán Chancusig, Mg.
CC: 0501883920

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

AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento a Dios por ser el principal motor de mi vida que me permitió alcanzar una meta más en mi vida, y en segundo lugar agradezco a la Universidad Técnica de Cotopaxi, por haberme formando académicamente, a mis padres por su apoyo incondicional y económica a lo largo de estos años, a mi hermana y de más familiares por ayudarme moralmente.

Hernán Bladimir Pilalumbo Cunuhay

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme culminar una etapa muy importante de mi vida, gracias a mi padre Guillermo y mi madre María por ser los promotores de mis sueños, agradecerle a mi hermano Vicente, hermanas, sobrino y cuñado Milton, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional. Mi amiga Sara Sosa por siempre darme su apoyo, siendo una parte fundamental en mi formación profesional, a la señora Susana Molina quien fue una persona muy especial en mi vida.

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. Tannya Llanos quien siempre me brindo su ayuda y apoyo durante este proceso.

Mis tíos paternos y maternos por el apoyo que siempre me brindaron. también aquellas personas que de una u otra forma me supieron brindar su apoyo.

Mónica Isabel Unaicho Choloquina

DEDICATORIA

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.

Hernán Bladimir Pilalumbo Cunuhay

DEDICATORIA

Con mucho amor y sacrificio dedico este logro a mi madre María a quien la llevo dentro de mi corazón y pensamientos en todo momento, siendo la inspiración en todo momento a no decaer, y a mi padre Guillermo quienes fueron mi inspiración a culminar con mi carrera profesional.

Mónica Isabel Unaicho Choloquina

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “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”.

AUTORES:

Pilalumbo Cunuhay Hernán Bladimir
Unaicho Choloquina Mónica Isabel

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 y tres niveles de ácido giberélico en el crecimiento de cannabis obtenido por germinación in vitro, para lo cual se generó un protocolo para la obtención de vitroplantas mediante revisión bibliográfica de investigaciones realizadas, las variables a evaluar fueron Altura de planta, Numero de hojas y Crecimiento de raíz cada 3 días, empleando un Diseño Completo al Azar con seis tratamientos y 2 repeticiones, y para el análisis funcional se utilizó la prueba de significancia de Tukey al 5%.

Con los datos obtenidos se determinó que el tratamiento que presento mejor resultado para altura de planta fue el T6 (MS2+ 1 mg/L⁻¹ de ácido giberélico) con una media de 8,85 , seguido del T5 (MS2+ 0,5 mg/L⁻¹ de ácido giberélico) con una media de 8 ; para el número de hojas los tratamientos que presentaron los mejores resultados fueron el T3(MS1+ 1 mg/L⁻¹ de ácido giberélico) y T5 (MS2+ 0,5 mg/L⁻¹ de ácido giberélico) con medias de 6,25 y 5,905 respectivamente, en el crecimiento de raíces el mejor tratamiento fue el T3(MS1+ 1 mg/L⁻¹ de ácido giberélico) con 2,48 de promedio , todos los tratamientos en las variables evaluadas fueron superiores al testigo el cual no se adiciono ácido giberélico.

Concluyendo que el medio Murashige 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 SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME : "EFFECT OF TWO CULTIVATION MEDIUMS AND THREE LEVELS OF GIBBERELIC ACID ON THE GROWTH OF CANNABIS (*Cannabis sativa*) OBTAINED BY IN VITRO GERMINATION IN THE CAREN LABORATORY FACULTY "

AUTHORS: Pilalumbo Cunuhay Hernán
Unuacho Choloquina Mónica Isabel

ABSTRACT

The present research was carried out in the plant protection laboratory of the Technical University of Cotopaxi, with the objective of comparing the effect of two cultivation media and three levels of gibberellic acid on the growth of cannabis obtained by in vitro germination, for which a protocol was determined for obtaining vitroplants through bibliographic review of research carried out. The variables to be evaluated were plant height, number of leaves and root growth every 3 days, using a Complete Randomized Design with six treatments and two replicates, and for the functional analysis the Tukey significance test at 5% was used.

With the data obtained, it was determined that the treatment that presented the best result for plant height was the T6 (MS1+ 1 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 8.85, followed by T5 (MS1+ 0.5 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 8; For the number of leaves, the treatments with the best results were T3 (MS2+ 1 mg/L-1 gibberellic acid) and T5 (MS2+ 0.5 mg/L-1 gibberellic acid) with averages of 6.25 and 5.05 respectively; for root growth, the best treatment was T3 (MS2+ 1 mg/L-1 gibberellic acid) with an average of 2.48; all the treatments in the evaluated variables were superior to the witness which did not add gibberellic acid.

It is concluded that the Murashige 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
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
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	1
3. PROBLEMÁTICA	2
4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	3
6. OBJETIVOS	4
6.1 Objetivo general	4
6.2 Objetivos específicos	4
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	6
8.1 Origen Cannabis st.....	6
8.2 Taxonomía	6
8.3 Características Botánicas.....	7
8.5 Aspectos morfológicos del cannabis sativa L.	7
8.5.1 Raíz.....	8

8.5.2 Tallo	8
8.5.3 Hojas	8
8.5.4 Flores.....	9
8.5.5 Semilla	10
8.6 Fenología.....	11
8.6.1 Germinación y emergencia	11
8.6.2 Estado vegetativo (código de estadio principal 1).....	11
8.6.3 Floración y formación de semilla (código de estadio principal 2)	12
8.6.4 Senescencia (código de estadio principal 3).....	12
8.8 Biotecnología vegetal: aplicaciones en mejoras de cultivos	13
8.10 Requerimiento para el cultivo in vitro	13
8.10.1 Ambiente físico.....	13
8.10.1.1 Temperatura	13
8.10.1.2 Luz y fotoperiodo	13
8.10.1.3 Luz en la micropropagación	13
8.10.1.4 Humedad.....	14
8.10.1.5 Temperatura y humedad en el cuarto de conservación.....	14
8.12 Propagación por semillas.....	14
8.13 Germinación.....	14
8.15 Materiales para el cultivo in vitro.....	16
8.15.1 Equipos.....	16
8.15.2 Cámara de flujo laminar	16
8.15.3 Cuarto de Crecimiento	17
8.16 Medios de cultivo	17
8.17 Medio de cultivo Murashigue y Skoog.....	18
8.17.1 Descripción.....	18
8.17.2 Propiedades.....	18

8.17.3 pH del medio.....	19
8.17.4 Agente gelificante	19
8.18 Carbón activado.....	19
8.19 Dosis de hormonas.....	20
8.20 Reguladores de crecimiento.....	20
8.21 Giberelinas.....	20
8.22 Efectos en los cultivos in vitro.....	21
8.23 Agentes contaminantes.....	22
9. HIPOTESIS	22
9.1 Hipótesis Nula.....	22
9.2 Hipótesis Alternativa	22
10. METODOLOGÍA.....	22
10.1 Ubicación y duración de la investigación	22
10.2 Condiciones de laboratorio	23
10.3 Tipo de investigación.....	23
10.3.1 Experimental.....	23
10.3.2 Bibliográfica.....	23
10.4 Materiales y Equipos.....	24
10.5 Factores en estudio.....	25
11. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
10.6 Manejo metodológico del ensayo.....	25
10.6.1.3 Preparación del medio de cultivo e incorporación de la fitohormona siguiendo el protocolo establecido por (McKendrick, 2000).....	26
10.6.1.3.1 Murashige y Skoog con carbón.....	26
10.6.1.2.2 Murashige y Skoog sin carbón.....	26
10.6.1.3 Siembra de vitroplantas en el medio de cultivo siguiendo la metodología de (Mendevilla, s.f.).....	27

10.6.1.4 Traslado al cuarto de crecimiento basado	28
10.7 Esquema experimental	29
10.8 Variables evaluadas	30
10.8.1 Altura de planta.....	30
10.8.2 Número de hojas	30
10.8.3 Crecimiento de la raíz	30
10.9 Elaboración del protocolo.....	30
12. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	30
13.2.1 Interpretación general.....	32
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
13.1 CONCLUSIONES.....	35
13.2 RECOMENDACIONES	36
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
15. ANEXOS	41
Anexo 1: Protocolo.....	41
Bibliografía.....	48
Anexo 2. Aval de Traducción.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados	5
Tabla 2 Clasificación botánica del Cannabis st.	6
Tabla 3 Condiciones del laboratorio	23
Tabla 4 Materiales y equipos utilizados en la investigación.....	24
Tabla 5 Factores en estudio.....	25
Tabla 6 Fuente de variación y grados de libertad	25
Tabla 7 Esquema del experimento.....	29
Tabla 8 Cuadro de análisis de varianza para la altura de la planta a los 15 días.	30
Tabla 9 Prueba de Tukey para altura de planta a los 15 días.....	31
Tabla 10 Análisis del ANOVA para el número de hojas	32
Tabla 11 Prueba de Tukey para el número de hojas	32
Tabla 12 Análisis del ANOVA para el crecimiento de raíz	34
Tabla 13 Prueba de Tukey para el crecimiento de la raíz.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Altura de la planta a los 15 días	31
Gráfico 2 Número de hojas	33
Gráfico 3 Crecimiento de la raíz	35

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Aspectos morfológicos del cannabis (Cannabis st).....	7
Imagen 2 Estructura de la sección transversal del tallo de una planta de cáñamo.....	8
Imagen 3 Detalle de hoja de Cannabis sativa	9
Imagen 4. Detalle de una flor masculina estaminada abierta.....	9
Imagen 5 Estructuras de una flor de Cannabis	10
Imagen 6 Detalle de semilla cannabis st	10
Imagen 7 Germinación y emergencia en la etapa fenológica de cannabis st.	11
Imagen 8 Tercer par de hojas en el estado vegetativo de las etapas fenológicas del cannabis st.	12
Imagen 9 Cambio de filotaxis en la etapa de floración y formación de semilla del cannabis st.	12

Imagen 10 Germinación de semillas.....	15
Imagen 11 Presentación del medio Murashige y Skoog.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo.....	26
Figura. 2 Proceso para la preparación y obtención del material vegetativo.....	27
Figura. 3 Proceso para la siembra de las vitroplantas con sus respectivos tratamientos.....	28
Figura. 4 Traslado de los tratamientos al cuarto de crecimiento.....	29

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: Efecto de tres niveles de ácido giberélico en dos medios de cultivos para la obtención de vitroplantas de cannabis (*Cannabis sativa*), en el laboratorio de la facultad CAREN.

Fecha de inicio: Abril 2019

Fecha de finalización: Agosto 2020

Lugar de ejecución: Laboratorios de la Facultad CAREN-UTC

Carrera que auspicia: Agronomía

Proyecto de investigación vinculado: Métodos de propagación y sistemas de cultivo de cannabis (*Cannabis sativa*) no Psicoactivo con fines de investigación en la Universidad Técnica de Cotopaxi

Equipo de Trabajo Autores:

Unaicho Choloquina Mónica Isabel

Pilalumbo Cunuhay Henán Bladimir

Tutor: Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuet

Área de Conocimiento: Códigos de la UNESCO, Agricultura, Silvicultura, Pesca y Veterinaria

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 dos concentraciones de fitohormona (Ácido giberélico) de 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 y desarrollo de la raíz. Teniendo como mejores resultados los tratamientos T6 (MS1+ 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico) para las variables altura de planta y crecimiento de raíz, mientras que para el número de hojas el mejor tratamiento fue T3 (MS2+ 1 mg/L^{-1} de ácido giberélico).

3. PROBLEMÁTICA

La disponibilidad de semillas y genética adecuada comprobada para nuestra realidad, no cuentan 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; 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).

Esto es relevante no tanto para ahorrar costos, sino porque evita la presencia de residuos indeseados en el producto cosechado, siendo esto un requisito para poder certificar cannabis (López & Gómez , 2020)

El cultivo de Cannabis y en otras especies el tiempo para lograr una estabilidad genética es un proceso tardío es por eso que se presentan ventajas frente a la conservación de el método in vitro , ya que logra disminuir o eliminar problemas como la excesiva manipulación del material, y disminuyendo así el riesgo de contaminaciones y de aparición de variación, por tal razón se busca determinar un método que acelere y garantice el proceso de micropropagación. (Kremer Morales, 2016)

Uno de los principales 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” recalcó, 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 los últimos años, el cannabis ha pasado de ser catalogado como una sustancia nociva, a ser materia prima de la medicina. Conocer los beneficios terapéuticos y medicinales que ofrecen los componentes activos de la planta de cannabis como el THC (tetrahidrocannabinol) y CBD (cannabidiol) ha incentivado a que varios países a nivel mundial legalicen su uso. (Guijarro Lasa, 2021)

El Ecuador ha decidido incursionar en la industria del cannabis, por lo que el 17 de septiembre del 2019 la Asamblea Nacional del Ecuador aprobó la reforma del Código Orgánico Integral Penal (COIP) para el uso del cannabis para fines medicinales o terapéuticos como también de cáñamo industrial. El 19 de octubre de 2020 el Ministerio de Agricultura y Ganadería expide el Acuerdo Ministerial No.109, el cual regula la siembra, cosecha, procesamiento, comercialización y exportación de Cannabis no psicoactivo o Cáñamo para uso industrial, cuya concentración de THC (molécula delta-9-Tetrahidrocannabinol) sea menor al 1 % en peso seco. (Guijarro Lasa, 2021)

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). Debido a su elevado costo la Universidad Técnica de Cotopaxi facultad CAREN, carrera de agronomía se plantea el proyecto de “Métodos de propagación y sistemas de cultivo de cannabis no psicoactivo” como una manera de analizar los costos de producción, cumpliendo con uno de los objetivos el cual es la micro propagación del cannabis, sin embargo no se cuenta con un banco vegetativo que garantice plantas de calidad y libre de patógenos para posteriores investigaciones y cumplir con lo establecido en el proyecto formativo. El presente proyecto presentará un protocolo sustentado con documentos bibliográficos y plantas en condiciones controladas las cuales son aptas para la micro propagación.

La presente investigación trata de incentivar a los estudiantes y agricultores a la aplicación de este método de propagación que garantiza un banco vegetativo de plantas libres de enfermedades para la continuidad del proyecto en micropropagación de Cannabis st. La relación de la biotecnología con la agricultura, fomentando beneficios de costos de producción menores en cultivos, la utilidad práctica de la investigación consiste en la obtención de un banco vegetativo de vitroplantas de cannabis.

5. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los principales beneficiarios con realización de 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

Determinar el efecto de dos medios de cultivo y tres niveles de ácido giberélico en el crecimiento de cannabis (*Cannabis sativa*).

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
1. Establecer el protocolo para la obtención de vitroplantas.	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuación del laboratorio para la obtención de vitroplantas bajo protocolo. - Zona de micropropagación - Instalación de luces LED -Preparación de cámara de flujo laminar. -Calefacción -Desinfección -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"> ● Fotografías ● Equipos instalados
2. Determinar el medio de cultivo adecuado para la obtención de vitroplantas.	<ul style="list-style-type: none"> -Preparación de medios de los dos medios de cultivo bajo el protocolo establecido. -Formulación del primer medio de cultivo con carbón activado -Formulación del medio de cultivo Murashige y Skoog sin carbón activado 	<ul style="list-style-type: none"> ● Medios de cultivos preparados 	<ul style="list-style-type: none"> ● Fotos ● Tubos de ensayo con medios de cultivo.
3. Comparar el mejor nivel de ácido giberélico para vitroplantas.	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de la Fitohormona ácido giberélico -Pesar el ácido giberélico 0.5 mg/L^{-1} - Pesar el ácido giberélico en mg/L^{-1} 	<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: (Pilalumbo & Unaicho,2022)

8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

8.1 Origen Cannabis st.

El nombre Cáñamo proviene de la palabra en inglés antiguo hænep y es el nombre común para las plantas de todo el género Cannabis sativa (Thomas, 2012). El legendario Cannabis es probablemente originario de Asia central (Schultes, 1970). Evidentemente los diferentes usos que se le dio al cáñamo en la historia de la humanidad en diferentes lugares en los que se encontraba situada esta planta fueron, Asia central, África, Europa, y desde allí, fue llevado a Chile y de esa manera se introdujo en Norte América y debido a su uso como Droga su expansión en todo el planeta. (Imane & Francisco, 2007).

8.2 Taxonomía

La taxonomía oficial utilizada hoy día es Cannabis sativa L., donde L. hace referencia al padre de la taxonomía Carl Linnæus quien fue el que reconoció y nombró la especie Cannabis sativa (C. sativa) como un cultivo. (Fassio et al., 2013)

Tabla 2 Clasificación botánica del Cannabis st.

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

Fuente: (*Descripcion de La Planta Cannabis Sativa – Wwww.Tecnicoagricola.Es, n.d.*)

8.3 Características Botánicas

C. sativa es una planta herbácea anual, dioica, de tallo erecto y hojas palmadas estipuladas. Las hojas se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja esta compuesta de entre 3 a 9 folíolos, de ápice agudo, con márgenes serrados y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés de un color más claro. El fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimida, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto. (Ángeles López et al., 2014)

El cannabis es dioico, lo que significa que crecen en plantas, que es masculina (estaminada) o femenina (pistilada), aunque se producen hermafroditas genéticamente inestables con flores masculinas y femeninas. (Thomas, 2012). *Cannabis sativa* L. es anemófila, por lo que las flores femeninas son fertilizadas por polen masculino acarreado por el viento, luego de lo cual desarrollan semillas, las que maduran luego de 3 a 6 semanas.

8.5 Aspectos morfológicos del cannabis sativa L.

Imagen 1 Aspectos morfológicos del cannabis (*Cannabis st*)



Fuente: (Para et al., 2010)

8.5.1 Raíz

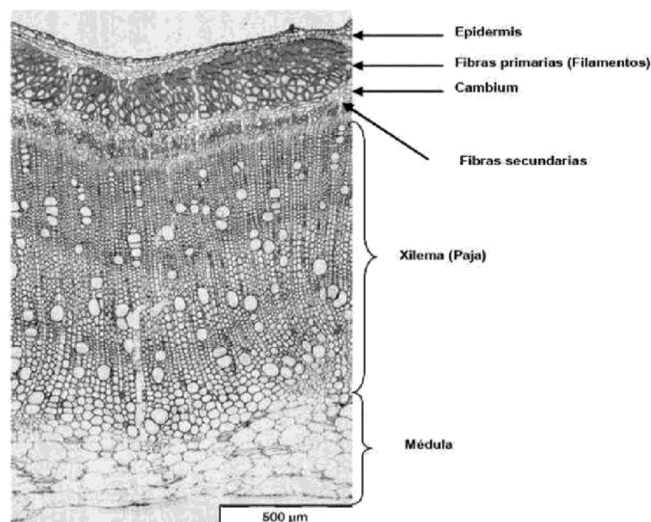
La raíz principal es pivotante y puede llegar a medir entre 30-40 cm de profundidad y a partir de ella se originan muchas raíces secundarias, sobre todo en los primeros 15-20 cm. La raíz completa supone alrededor de 10% total de la planta. (Hernández, 2016)

8.5.2 Tallo

El tallo es recto, hueco, de forma cónica, circular, aunque en determinadas zonas presenta unas acanaladuras, el diámetro es mayor en la parte de la base, decrece en función de la altura, los entrenudos son largos y se acortan conforme se acercan al ápice. (Hernández, 2016)

La corteza, está compuesta por 65-70% de celulosa, 10-15 % de hemicelulosa y 3-5% de lignina. Los haces fibrosos del tallo se componen de fibras primarias y secundarias. Las primarias tienen una sección transversal e irregular y una pared espesa que no cierra el lumen interno, su 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. (Hernández, 2016)

Imagen 2 Estructura de la sección transversal del tallo de una planta de cáñamo



Fuente: (Hernández, 2016)

8.5.3 Hojas

Las hojas varían 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 presentan solamente un foliolo, pero a medida que va creciendo la planta también aumenta el número de foliolos. En una planta madura estos pueden presentarse desde 5 y 11 generalmente 7, lanceolados. El haz presenta un color verde más intenso que el envés, la longitud es de 15-20cm y el ancho de 1-3cm. (Hernández, 2016).

Imagen 3 Detalle de hoja de cannabis sativa



Fuente:(Hernández, 2016)

8.5.4 Flores

Las flores masculinas son ramificadas, 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. (Hernández, 2016)

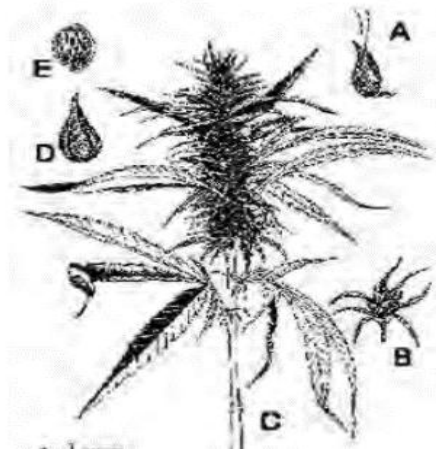
Imagen 4. Detalle de una flor masculina estaminada abierta



Fuente: (Hernández, 2016)

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. (Hernández, 2016)

Imagen 5 Estructuras de una flor de Cannabis



Fuente: A: flor femenina con gineceos B: espiga, C: inflorescencia, D: bráctea perigonal formada, E: semilla dura (Mendevilla, s.f) (Hernández, 2016)

8.5.5 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 una forma ovalada y su color es pardo grisáceo o moteado, el pericarpio es duro y está compuesto de dos valvas soldadas y su peso varía entre 3 y 60mg, generalmente estas oscilan entre 15-20mg (Hernández, 2016)

Imagen 6 Detalle de semilla cannabis st



Fuente: (Hernández, 2016)

8.6 Fenología

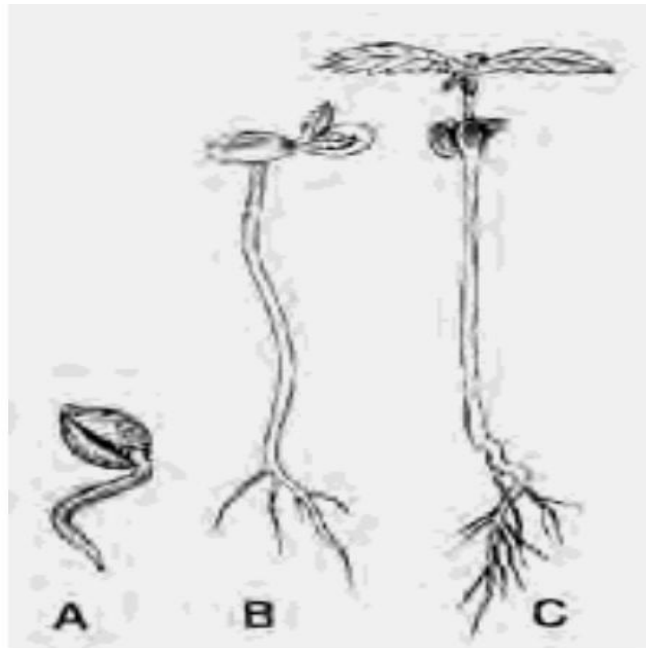
(Mendevilla, s.f.), desarrollaron un código decimal de cuatro dígitos, adaptado del código propuesto por (Zadoks, s.f.) para los cereales, y lo utilizaron para describir los diferentes estadios fenológicos del cáñamo.

8.6.1 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 temperatura óptima para la germinación es 24 °C (Fassio et al., 2013) Temperaturas menores demoran el proceso, que usualmente lleva de tres a siete días (Clarke, 1997). La temperatura mínima de germinación es 0 °C (Werf et al., 1995)

Imagen 7 Germinación y emergencia en la etapa fenológica de cannabis st.



Fuente: (Werf et al., 1995)

8.6.2 Estado vegetativo (código de estadio principal 1)

Este estado se caracteriza por el crecimiento del tallo y las hojas, siendo lento al principio, cuando se forman hasta cinco pares de hojas verdaderas y sus espacios entre nudos son cortos.

Imagen 8 Tercer par de hojas en el estado vegetativo de las etapas fenológicas del cannabis st.



Fuente: (Mendevilla, s.f.)

8.6.3 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 del comienzo de este estadio fenológico principal, y depende básicamente del cultivar y del largo del día.

Imagen 9 Cambio de filotaxis en la etapa de floración y formación de semilla del cannabis st.



Fuente: (Mendevilla, s.f.)

8.6.4 Senescencia (código de estadio principal 3)

Luego de la floración de las plantas dioicas macho, igual que luego de la madurez de semilla en plantas monoicas o dioicas hembras, las hojas y los tallos comienzan a secarse, y luego 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 (Mendevilla, s.f.).

8.8 Biotecnología vegetal: aplicaciones en mejoras de cultivos

En el mundo de las plantas, el objetivo de la biotecnología es crear, por ingeniería genética, nuevas variedades de plantas que presenten algunas características que mejoren su valor sobre los existentes como a la resistencia a patógenos y herbicidas, tolerancia a estrés ambiental, incremento del valor organoléptico. La biotecnología vegetal también ha dedicado incrementar el beneficio que se le puede sacar a un cultivo sin tener que recorrer a cultivar grandes superficies de terrenos y recortando el periodo de cultivo. (Imane & Francisco, 2007)

8.10 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

8.10.1 Ambiente físico

8.10.1.1 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 Mechoulam, 2019).

8.10.1.2 Luz y fotoperiodo

Para cultivo in vitro se utiliza la luz para el proceso de fotomorfogénesis, muy distinto 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 (Stefano Vittorio, 2020)

8.10.1.3 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, (M. et al., 2016).

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 (Stefano Vittorio, 2020)

8.10.1.4 Humedad

La humedad y requerimientos se detallan 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 LEDs, tipo luz día
- Humedad relativa: 50-70%

8.10.1.5 Temperatura y humedad en el cuarto de conservación

Se tiene 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%

8.12 Propagación por semillas.

El siguiente tratamiento hace que todas las bacterias y hongos: Antes de colocar las semillas en el sustrato de germinación, es necesario lavar las semillas con agua destilada esterilizada, más 5 gotas de jabón líquido y antioxidantes como ácido cítrico y ascórbico (50 mg/litro). Enseguida 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).

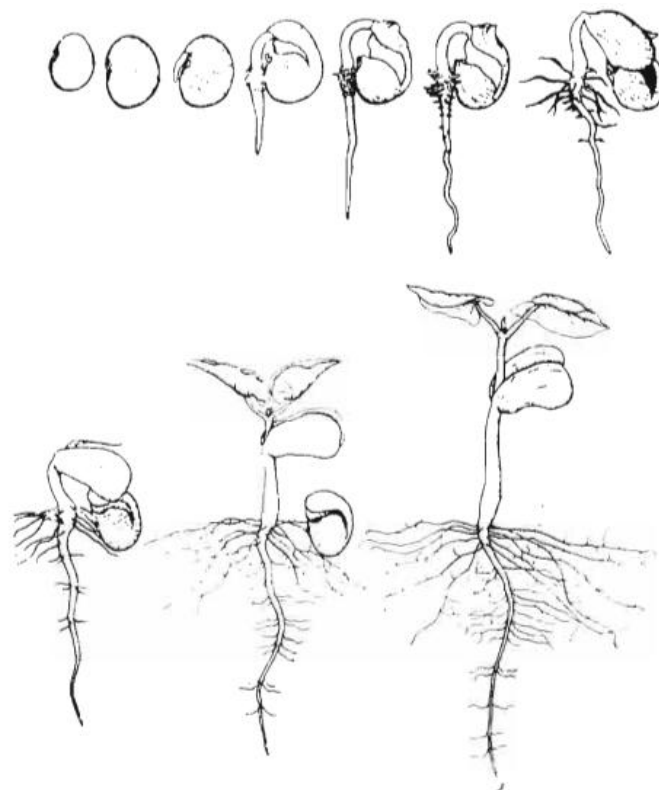
8.13 Germinación

La germinación es el conjunto de procesos que se originan en la semilla desde que el embrión comienza a crecer hasta que se haya formado una pequeña plantula que puede vivir por sí misma. Para que tenga lugar la germinación tiene que reunirse una serie de condiciones, tanto en la semilla como en el ambiente que la rodea. (Li, 2011)

La Germinación inicia con la entrada de agua en la semilla al cual conocemos como (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula. En condiciones de laboratorio, la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula es el hecho que se utiliza para considerar que la germinación ha tenido lugar (Pita & Perez, 2008).

Se puede observar que durante la imbibición la semilla se hincha. Se tiene un apto lugar de clonación hasta que uno de los extremos del eje embrionario, rompe las envueltas seminales y aparece claramente a nuestra vista, dándonos una señal de que la semilla está germinando. El extremo del eje embrionario que aparece primero es el lado libre del hipocótilo, al que se llama radícula, que dará lugar a la raíz principal muy pronto aparecerá el otro extremo del eje que formará el primer brote. (Li, 2011)

Imagen 10 Germinación de semillas



Fuente: (Li, 2011)8.14 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, 2008).

8.15 Materiales para el cultivo in vitro

El laboratorio de micropropagación 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 micropropagación 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).

8.15.1 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 (Pr, n.d.)

8.15.2 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).

8.15.3 Cuarto de Crecimiento

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

- Temperatura: 27°-28° 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%

8.16 Medios de cultivo

Son soluciones o geles que se formulan para que organismos se puedan desarrollar en ellos, tanto en su superficie como en su interior. En estos medios son incorporados carbohidratos, vitaminas, sales, minerales, inhibidores, variación de nutrientes y compuestos químicos para regular las condiciones como pH, salinidad, etc., para que el organismo se adapte y crezca de la mejor manera (Sonny Eli Zaluchu, 2021).

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

Para las formulaciones se requiere de macro y micronutrientes que cada uno cumple una función distinta pero esencial en la planta, la falta de uno de ellos puede ocasionar estrés y por ende menor crecimiento, mientras la presencia de algunos de ellos sirve como potenciadores. La característica principal es que se mantienen estériles y con las condiciones estables durante el crecimiento de la planta, permitiendo que agentes externos no puedan interferir en su desarrollo (Salazar et al., 2013). 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 (Seabrook, 1980).

8.17 Medio de cultivo Murashigue y Skoog

8.17.1 Descripción.

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

8.17.2 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 11 Presentación del medio Murashige y Skoog.



Fuente: (NOVACHEM DEL ECUADOR, s.f.)

8.17.3 pH del medio.

El pH es un factor que interviene en aspectos importantes como la solubilidad de las sales, la disponibilidad de nutrientes y la gelificación adecuada del medio (Sathyanarayana, 2007, pág. 41). El pH del medio es generalmente ajustado, antes de ser autoclavado, a valores comprendidos entre 5.5 y 6.0 ph; el cambio en el valor de pH se logra añadiendo pequeñas cantidades de diluciones preparadas, principalmente de NaOH o HCl, a concentraciones 0.1 o 1.0 N (Smith, 2000, pág. 54). Un medio de cultivo con pH inferior a 5.5 no gelifica apropiadamente, uno con pH superior a 6.0 es demasiado firme (Murashige, 1973).

8.17.4 Agente gelificante

El medio de cultivo puede o no llevar agentes gelificante, dependiendo del objetivo y de los requerimientos de los explantos. El cultivo de células en suspensión, por ejemplo, es un medio rico en nutrientes y reguladores; carece de estos compuestos, debido a que requiere un movimiento continuo para la producción constante de oxígeno, necesario en el crecimiento celular (Perea, 2009)

La propiedad principal en un agente gelificante es la resistencia a la esterilización por autoclavado; los agentes comúnmente utilizados en el cultivo *in vitro* de organismos vegetales son agar, agarosa según, (Bhojwani & Razdan, 1996).

8.18 Carbón activado

El carbón activado es un material de carbón que se prepara en la industria para que tenga una elevada superficie interna y así poder adsorber (retener sobre su superficie) una gran cantidad de compuestos muy diversos, tanto en fase gaseosa como en disolución (Sabio, 2019).

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, pág. 50). Se pueden ser usados otros compuestos (Saad & 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. (Vaca et al., 2018)

8.19 Dosis de hormonas.

Los reguladores de crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1Mm. Cada uno de los reguladores no solo influyen en la respuesta dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos ambientes, por lo que es riesgoso generalizar acerca de los efectos de un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross, 1994).

8.20 Reguladores de crecimiento.

Se las conoce como fitohormonas o fitorreguladores, son sustancias naturales o sintéticas las cuales ayudan a regular la respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando así a coordinar procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Alcantara et al., 2019): son frecuentemente utilizados en cultivos *in vitro*, pues asumen labores de vital importancia en procesos de elongación, tropismos y dominancia apical (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002), es necesario agregar al medio una o más fitohormonas para sustentar el desarrollo de tejidos y órganos, generalmente auxinas, citosinas y giberelinas son las más añadidas (Bhojwani & Razdan, 1996).

A continuación, se detallan las principales fitohormonas:

8.21 Giberelinas.

Las giberelinas son terpenos. Su síntesis se produce en todos los tejidos de los diferentes órganos y puede estar afectada por procesos internos de retroalimentación negativa o por factores externos como la luz, que según su duración lleva a la producción de giberelinas o de inhibidores del crecimiento. Se suelen transportar por vía xilema y vía floema (Alcantara et al., 2019). Son un amplio grupo de compuestos relacionados que a diferencia de las auxinas se definen más por su estructuración que por su actividad biológica”; con frecuencia son asociadas a la promoción del crecimiento del tallo (Taiz & Zeiger, 2006); deben su nombre al hongo *Gibberella fujikuroi*, del cual fueron identificadas por primera vez (Cardemil, 2006).

Químicamente son moléculas diterpenoides tetracíclicas, de entre las cuales el ácido giberélico (GA3) es considerado como la giberelina más activa (Duca, 2015, pág. 207).

Las giberelinas promueven la división celular al reducir la interface del ciclo celular e inducir las células en fase G1 a sintetizar ADN. También promueven la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa, provocando la disminución del potencial hídrico, lo cual permite el ingreso de agua en la célula y produce su expansión. Entre los efectos fisiológicos que causan estas fitohormonas se destacan (Alcantara et al., 2019):

Las giberelinas recorren los flujos floemático y xilemático a una velocidad de 5 a 20 mm/h, se mueven de forma similar a metabolitos orgánicos, GA3 es fácilmente soluble en agua fría, y se acumulan en áreas de crecimiento (Gupta & Chakrabarty, 2013).

- Controlan el crecimiento y elongación de los tallos.
- Crecimiento y desarrollo de frutos.
- Rompimiento de dormancia en semillas de algunas especies.
- Estimulación de la germinación de las semillas.
- Estimulación de la formación de frutas sin semillas.
- Ruptura de letargo de la semilla.

8.22 Efectos en los cultivos in vitro.

Las giberelinas son hormonas de crecimiento, cuyo efecto más notable es inducir crecimiento en longitud, su estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano, algunos de los cuales poseen actividad hormonal. Pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas, tales como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos según (Jiménez & Alvarenga , 20007). Al respecto, mencionan que las giberelinas controlan aspectos importantes en el desarrollo de las plantas, actuando como estimulantes del crecimiento, por lo que se obtiene un mayor tamaño. Una de las funciones más importantes de las giberelinas es la promoción del crecimiento del tallo, hojas y raíces, esto se debe a la inducción de la división celular, pues acortan la interface del ciclo celular al inducir a las células a sintetizar ácido desoxirribonucleico (Ortega et al., 2013), por lo que en el presente trabajo nos proponemos determinar el efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico en la propagación in vitro de cannabis (*Cannabis sativa*).

En general el crecimiento y la diferenciación ocurre 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

8.23 Agentes contaminantes.

La contaminación de los cultivos puede ocurrir en cualquier instante durante el proceso de introducción, principalmente es generada por transferencia de esporas a través del aire o contacto con superficies esterilizadas de forma incorrecta (Sathyanarayana, 2007, pág. 62); los microorganismos patógenos generalmente aparecen de 3 a 5 días después de la introducción (Torres, 2012, pág. 54). Los principales agentes que intervienen en la contaminación se nombran a continuación.

9. HIPOTESIS

9.1 Hipótesis Nula

La utilización de dos medios de cultivo y tres niveles de ácido giberélico no afectan al crecimiento de plantas Cannabis obtenidas por germinación InVitro

9.2 Hipótesis Alternativa

La utilización de dos medios de cultivo y tres niveles de ácido giberélico afectan al crecimiento de plantas Cannabis obtenidas por germinación InVitro

10. METODOLOGÍA

10.1 Ubicación y duración de la investigación

El proyecto se realizó en la ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi en la Universidad Técnica de Cotopaxi, Campus Salache en el laboratorio protección vegetal, Facultad CAREN.

La investigación tuvo la duración de 60 días de trabajo en el laboratorio y 20 días del establecimiento del ensayo. Tiempo en el cual se evaluó los resultados de la aplicación de fitohormonas (ácido giberélico) en distintas concentraciones (0.5 mg/L^{-1} y 1 mg/L^{-1}), para el desarrollo de vitroplantas en dos formulaciones de Murashige y Skoogmedios.

10.2 Condiciones de laboratorio

Las condiciones son controladas como se puede observar en tabla.

Tabla 3 Condiciones del laboratorio

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

Elaborado por: (Pilalumbo y Unaicho, 2022)

10.3 Tipo de investigación

10.3.1 Experimental

Tipo experimental porque esto permitió realizar el procedimiento bajo condiciones de laboratorio comparando dos medios de cultivo con tres concentraciones hormonales diferentes en el desarrollo de vitroplantas.

10.3.2 Bibliográfica

Fue un apoyo tomado de las diferentes investigaciones realizadas anteriormente, para el establecimiento tanto del protocolo como de la investigación.

10.4 Materiales y Equipos

Tabla 4 Materiales y equipos utilizados en la investigación.

Materiales	Equipos
Alcohol al 75%	Autoclave
Cloro al 3%	Balanza analítica
Agua destilada, esterilizada	Plancha de calentamiento
Carbón activado	Agitador magnético
Agar-Agar	Microondas
Sacarosa	Mechero
Lápices	Destilador de agua
Regla	Refrigerador
Teléfono celular	PH – metro
Cuaderno	Taimer
Calculadora	Cámara de flujo laminar
Alcohol antiséptico	
Hipoclorito de sodio	
Alcohol industrial	
Papel aluminio	
Hormonas (Ácido Giberélico)	
Computadora	
Tubos de ensayo	
Pinzas de desinfección	
Bisturí	
Frascos de vidrio	

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

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 mg/L ⁻¹
A2= Murashige y Skoog con Carbón Activado	Ácido giberélico	0,5 mg/L ⁻¹
	Ácido giberélico	1 mg/L ⁻¹

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

11. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utilizó fue un DCA, diseño completamente al azar, con 6 tratamientos y 2 repeticiones utilizando la prueba de rangos múltiples de tukey al 5%.

Tabla 6 Fuente de variación y grados de libertad

Fuente de variación		Grados de libertad
Repetición	(r-1)	1
Tratamientos	(T-1)	5
Error	(r-1)(T-1)	5
Total		6

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

10.6 Manejo metodológico del ensayo

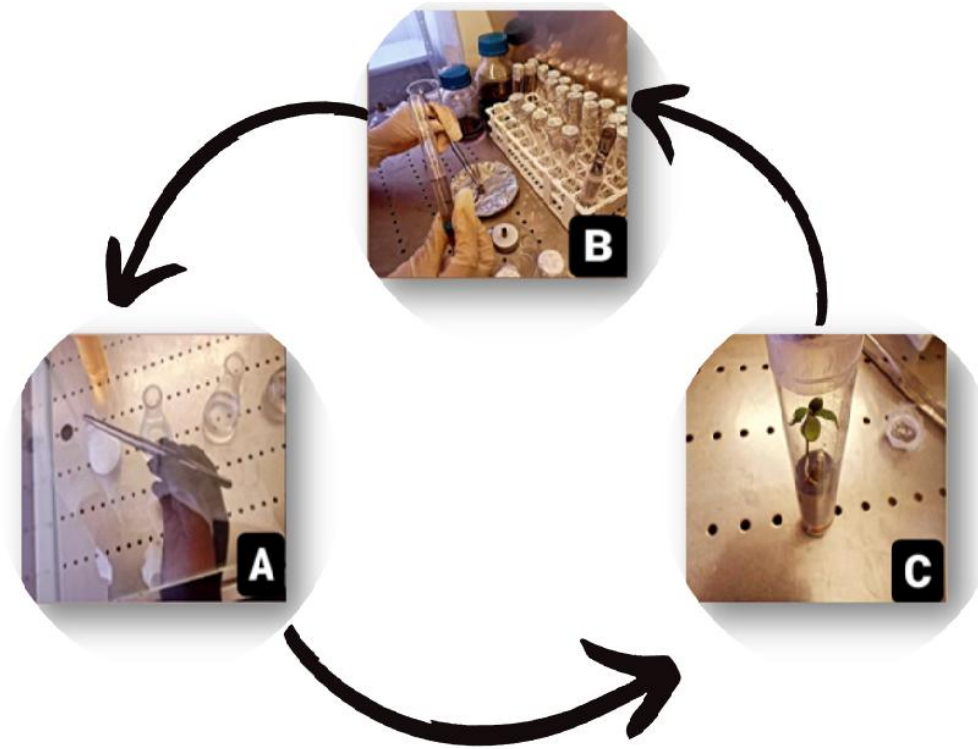
10.6.1 Fase de establecimiento

10.6.1.1 Preparación del material vegetativo según la metodología de (Salgado, 2020; Villezcas 2020).

El material vegetativo se obtuvo del banco de germoplasma de los laboratorios de GENBIO, las semillas fueron almacenadas a -20° -5°C durante 2 meses, las mismas fueron desinfectadas (A) siguiendo la metodología de (Salgado, 2020; Villezcas 2020); este proceso se lo realizó en la cámara de flujo laminar.

Para la obtención 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: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

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

10.6.1.3.1 Murashige y Skoog con carbón.

El medio de cultivo fue M&S (Murashige y Skoog, 1962) (A), con sacarosa 3.0% (p/v) (B) y carbón activado 0.03% (p/v), 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 giberélica (C) en diferentes concentraciones (mg/l^{-1}) (E) (Salgado, 2020; Villezcas 2020)

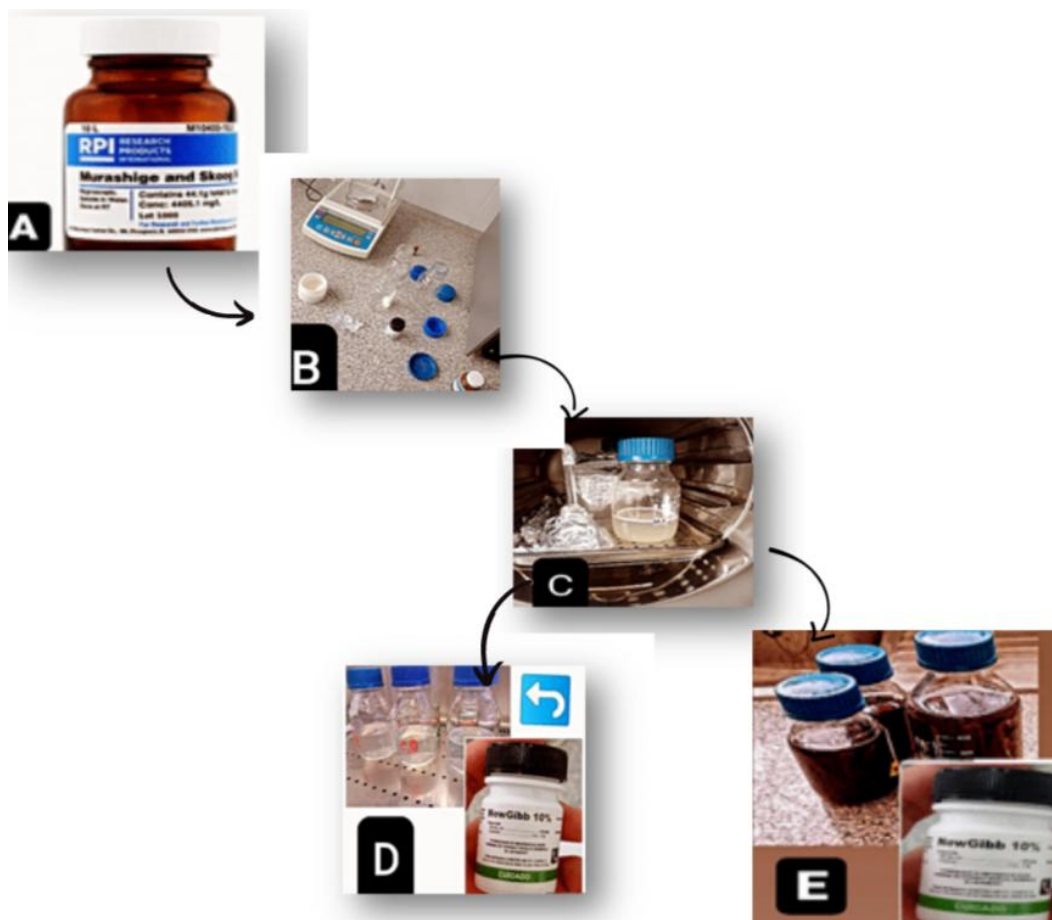
10.6.1.2.2 Murashige y Skoog sin carbón.

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) (Salgado, 2020; Villezcas 2020).

Figura 12: Proceso para la siembra de las vitroplantas con sus respectivos tratamientos.

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



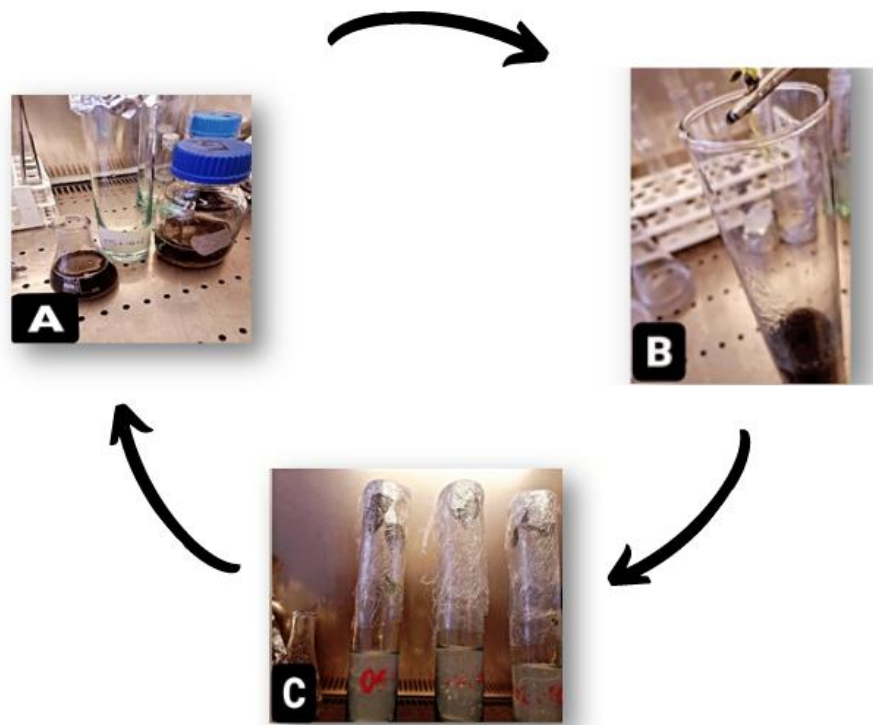
Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

10.6.1.3 Siembra de vitroplantas en el medio de cultivo siguiendo la metodología de (Mendevilla, s.f.).

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar con la debida asepsia, se colocaron 50 ml de medio en cada tubo de ensayo (A) tomando todas las medidas sanitarias y precaución para evitar la contaminación de los medios de cultivo y el material vegetativo, para ello fue

necesaria la desinfección de los materiales, equipos y manos. Una vez 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.

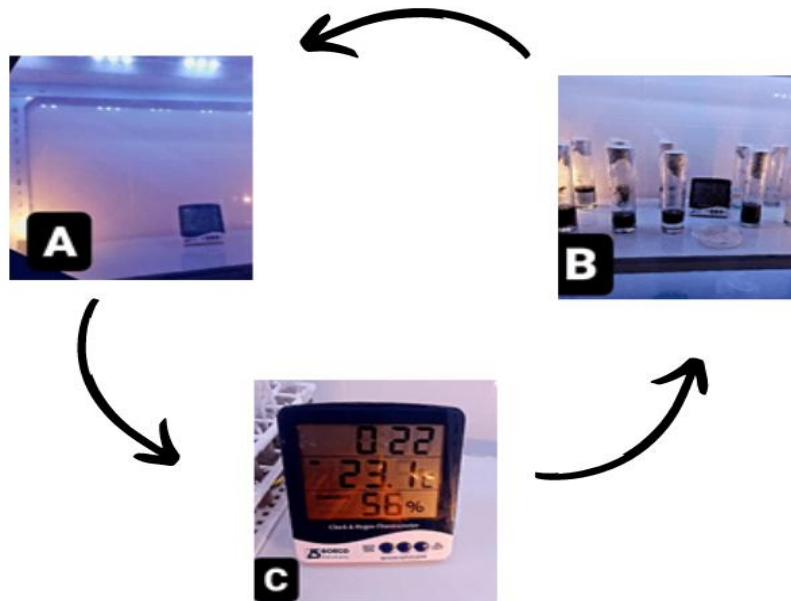


Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

10.6.1.4 Traslado al cuarto de crecimiento basado

La siembra de las vitroplantas de cannabis st se culmina al sellarlas con papel aluminio y parafilm, tomando en cuenta la fecha del trasplante, dando lugar a el traslado hacia el cuarto de crecimiento (A) en el que se tomaran datos durante 15 días en condiciones controladas como es la temperatura de 23-27°C (C), una iluminación de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (A), también una humedad relativa de 30 al 70%. Para 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 24 ± 2 °C (C).

Figura. 4Traslado de los tratamientos al cuarto de crecimiento



Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

10.7 Esquema experimental

Tabla 7 Esquema del experimento

Tratamientos	Descripcion	Unidades	Repeticiones	Total
T1	Murashige y Skoog + Ácido giberélico 0 mg/L ⁻¹ .	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 + Carbon activado + Ácido giberélico 0 mg/L ⁻¹ .	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: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

10.8 Variables evaluadas

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

10.8.1 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.

10.8.2 Número de hojas

Esta variable se evaluó, tomando la medida desde el inicio del tallo hasta la punta de la raíz con la ayuda de una regla durante 15 días.

10.8.3 Crecimiento de la raíz

Para esta variable se procedió a contar de forma directa, el número total de hojas en cada tratamiento y repetición durante 15 días

10.9 Elaboración del protocolo

Se realizó un análisis bibliográfico para la obtención del protocolo.

12. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tabla 8 Cuadro de análisis de varianza para la altura de la planta a los 15 días.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	
Tratamiento	4,91	5	0,98	0,0302	*
Repetición	0,24	1	0,24	0,2621	ns
A	1,69	1	1,69	0,0188	*
B	3,21	2	1,6	0,0133	*
A*B	0,02	2	0,01	0,942	ns
Error	0,75	5	0,15		
Total	5,91	11			
CV%			5,02		

Elaborado: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

Como se observa en la tabla 8 del análisis de varianza para altura de planta a los 15 días se determina que existe diferencias significativas en el factor A, medios de cultivo y el factor B,

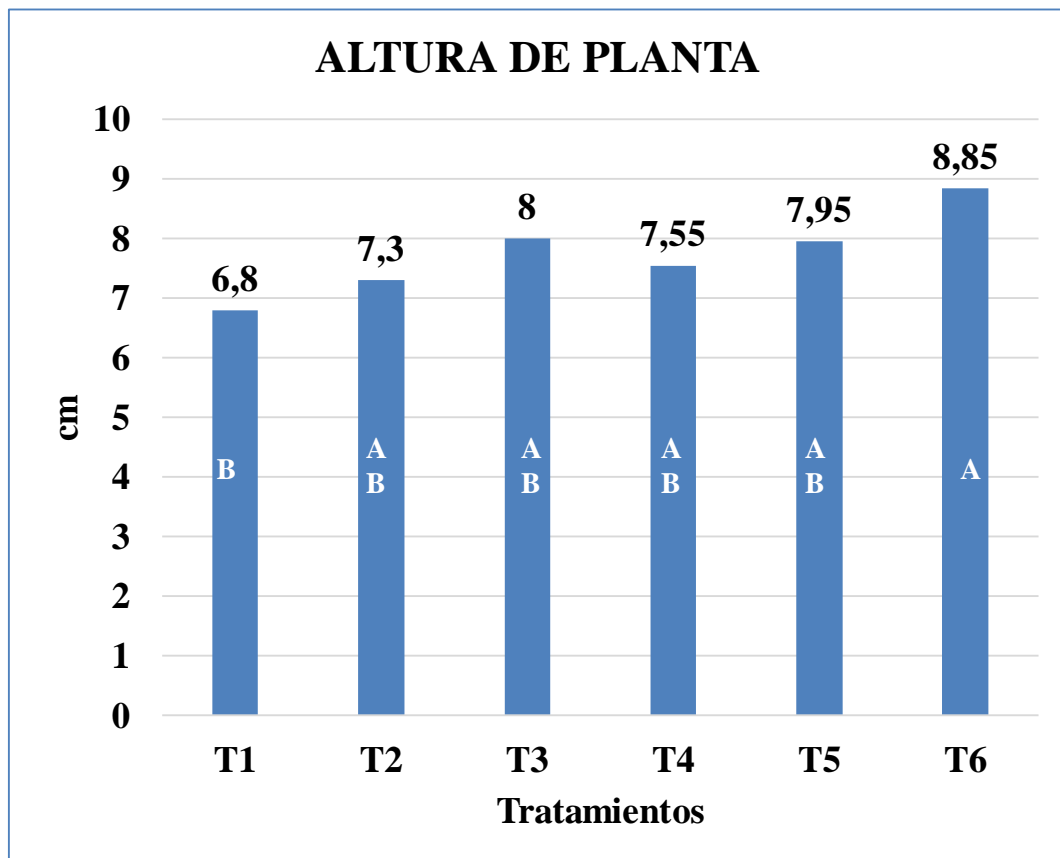
concentraciones ácido giberélico, mas no muestra significancia en la interacción A*B, con un coeficiente de variación 5.02%.

Tabla 9 Prueba de Tukey para altura de planta a los 15 días

Código	Medias		
T6	8,85	A	
T3	8	A	B
T5	7,95	A	B
T4	7,55	A	B
T2	7,3	A	B
T1	6,8		B

Elaborado: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

Gráfico 1 Altura de la planta a los 15 días



Elaborado: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

Como se observa en el (gráfico 1) del análisis de Tukey al 5% para la variable Altura de planta a los 15 días, se muestra que el mejor tratamiento fue el T6 (Murashigue y skoog + carbón activado + ácido giberélico 1mg/ L-1). con un promedio de 8,85 cm., seguido del T3 (Murashigue y skoog + ácido giberélico 1 mg/L-1). con un promedio de 8cm que son superiores a los presentados por el T1 (Murashigue y skoog + ácido giberélico 0mg/ L-1). que no contiene giberelinas.

Por lo manifestado anteriormente se puede indicar que el ácido giberélico y la aplicación del carbón activado es la que promovió el crecimiento de las vitroplantas esto se corrobora con lo descrito por (Shahid, 2018), en su investigación de comparación de ácido giberélico con sacarosa en cultivo in vitro que también obtuvo un buen resultado con una concentración de ácido giberélico de (1 mg/ L-1). Por otro lado el autor (Vaca et al., 2018) reporta que la adición de carbón activado en el cultivo in vitro de limón (*Citrus limón*) favoreció en las curvas de crecimiento y permitió concluir que el mayor incremento de longitud de tallo, número de brotes etc., se da durante las primeras semanas de cultivo, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio; concuerdan también con la revisión de (García & Sosa, 2008) indica que en su investigación la adición de las distintas concentraciones de carbón activado en el medio de cultivo Murashige y Skoog, no tuvo un efecto significativo en la longitud de la planta.

13.2.1 Interpretación general

Tabla 10 Análisis del ANOVA para el número de hojas

F.V.	DÍA 6				DÍA 12				DÍA 15			
	gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor	
Tratamiento	5	0,28	0,5	ns	5	0,68	0,178	ns	5	1,28	0,0047	*
Repetición	1	0,08	0,611	ns	1	4,08	0,013	*	1	4,08	0,0009	**
A	1	0,08	0,585	ns	1	0,75	0,401	ns	1	0,08	0,7502	ns
B	2	0,33	0,332	ns	2	1,08	0,369	ns	2	3,08	0,0751	ns
A*B	2	0,33	0,332	ns	2	0,25	0,77	ns	2	0,08	0,8966	ns
Error	5	0,28			5	0,28			5	0,08		
Total	11				11				11			
CV(%)		14,9				9,53				4,5		

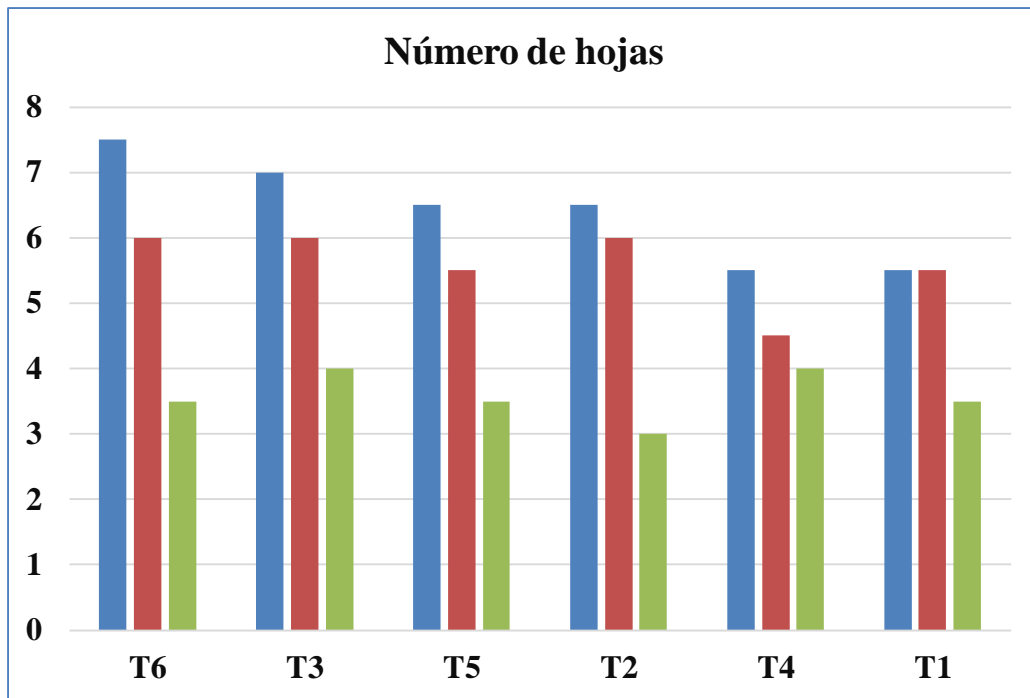
Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

En la tabla (10) se muestra el análisis de varianza para el número de hojas en los días 6, 12 y 15 en el que se determina que ningún Factor muestra diferencias significativas y presenta un coeficiente de variación de 14,9% en el día 6; 9,53% en el día 12 y en 4,5% en el día 15.

Tabla 11 Prueba de Tukey para el número de hojas

Código	DÍA 6		Código	DÍA 12		Código	DÍA 15	
	Medias			Medias			Medias	
T3	2,85	A	T3	5	A	T3	6,25	A
T2	2,5	A	T6	4,3	A	T5	5,05	A
T6	2,35	A	T5	4,3	A	T6	5	A
T5	2,25	A	T2	3,85	A	T2	4,6	A
T4	2	A	T4	3,3	A	T4	3,9	A
T1	1,9	A	T1	2,8	A	T1	3,25	A

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

Gráfico 2 Número de hojas

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho)

Como se indica en el (gráfico 2) del análisis de Tukey al 5% para la variable Número de hojas a los días 6, 12 y 15 días, se muestran que el mejor tratamiento fue el T6 (Murashigue y skoog + carbón activado + ácido giberélico $1\text{mg}/\text{L}^{-1}$) con una media de 8 hojas en la vitroplanta seguido del T3 (Murashigue y skoog + ácido giberélico $1\text{mg}/\text{L}^{-1}$) Con una media de 7 hojas, que son superiores a los presentados por el T1 (Murashigue y skoog + ácido giberélico $0\text{mg}/\text{L}^{-1}$) y el T4 (Murashigue y skoog + carbón activado ácido + giberélico $0\text{mg}/\text{L}^{-1}$) que no presentan diferencia significativa.

Se puede resaltar que en la variable número de hojas existe una incidencia en cuanto a la aplicación de ácido giberélico y carbón activado según (Weatherhead y heanshaw citado por Quisbert & Murillo, 2019), en la adición de carbón activado (AC) a varios sistemas de cultivo de tejidos tienen un efecto promotor sobre el crecimiento, en un intento por explicar este efecto se ha demostrado que el carbón activado absorbe las diferentes hormonas, lo que afirma a los resultados obtenidos en la investigación y no concuerda con lo expuesto por (Salazar et al., 2013) que en su investigación mostró los efectos beneficiosos de las giberelinas, para aumentar la longitud de los brotes micropropagados; sin embargo, la formación de órganos, como hojas, se vieron afectados negativamente por el suministro de ácido giberélico.

Tabla 12 Análisis del ANOVA para el crecimiento de raíz

F.V.	DÍA 3				DÍA 6				DÍA 9				DÍA 12				DÍA 15			
	gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor		gl	CM	p-valor	
Tratamiento	5	0,01	0,46	ns	5	0,02	0,50	ns	5	0,06	0,20	ns	5	0,08	0,25	ns	5	0,11	0,20	ns
Repetición	1	0,01	0,33	ns	1	0,000033	0,97	ns	1	0,07	0,18	ns	1	0,12	0,15	ns	1	0,13	0,17	ns
A	1	8,3E-06	0,98	ns	1	0,02	0,33	ns	1	0,01	0,67	ns	1	0,0037	0,80	ns	1	3E-04	0,95	ns
B	2	0,02	0,19	ns	2	0,04	0,19	ns	2	0,15	0,07	ns	2	0,17	0,12	ns	2	0,23	0,09	ns
A*B	2	0,0036	0,68	ns	2	0,0036	0,84	ns	2	0,0047	0,88	ns	2	0,02	0,66	ns	2	0,05	0,51	ns
Error	5	0,01			5	0,02			5	0,03			5	0,04			5	0,05		
Total	11				11				11				11				11			
CV(%)			7,81				10,21				9,62				10,22				10,33	

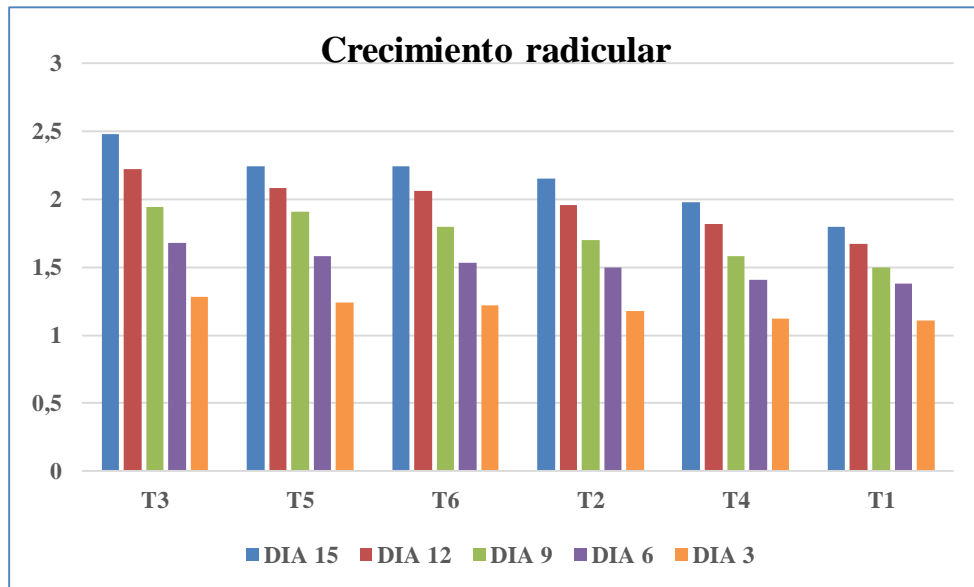
Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

En la tabla (12) se puede observar un análisis de varianza para el crecimiento de la raíz en los días 3, 6, 9, 12 y 15 en el que se determina que ningún Factor muestra diferencias significativas y presenta un coeficiente de variación de 7,81% en el día 3; 10,21% en el día 6; 9,62% en el día 9; 10,22% en el día 12 y 10,33% en el día 15.

Tabla 13 Prueba de Tukey para el crecimiento de la raíz

DÍA 6			DÍA 12			DÍA 15		
Codigo	Medias		Codigo	Medias		Codigo	Medias	
T4	1,9	A	T1	2,8	A	T1	1,8	A
T1	2	A	T4	3,3	A	T4	1,98	A
T5	2,25	A	T2	3,85	A	T2	2,15	A
T6	2,35	A	T5	4,3	A	T5	2,24	A
T2	2,5	A	T6	4,3	A	T2	2,24	A
T3	2,85	A	T3	5	A	T3	2,48	A

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

Gráfico 3 Crecimiento de la raíz

Elaborado por: (Pilalumbo & Unaicho, 2022)

En el (gráfico 3) del análisis de Tukey al 5%, para la variable Crecimiento de raíz a los 6, 12 y 15 días. Se observa que hay mayor desarrollo en la variable crecimiento de raíz T3 (Murashigue y skoog + ácido giberélico 1 mg/L^{-1}), a pesar de que no se encuentra significancia en los demás tratamientos, lo que concuerda con lo expuesto por (Perea, 2009) indica que el ácido giberélico, a las concentraciones trabajadas, no ejerce un efecto estadísticamente significativo para las variables, número de brotes y número de raíces, por otro lado (Álvarez, 2018) en su investigación propagación In Vitro de Guayusa, manifiesta que se observó que el mayor porcentaje de enraizamiento se dio en los tratamientos en ausencia de carbón activado, mostrando un 100% de enraizamiento, mientras que se obtuvo un enraizamiento del 33,3 al 62,5% en presencia de carbón activado y también tenemos autores con más resultados similares como (Hernández, 2017) que menciona que la etapa de enraizamiento el mejor tratamiento fue el establecido con medio MS a la mitad de su concentración y a la (2.0 mg/l) sin carbón activado.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1 CONCLUSIONES

- Se concluye que se elaboró un protocolo para la obtención de vitroplantas basado a las condiciones de laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi para la obtención de vitroplantas de cannabis (*Cannabis sativa*).

- Se determinó que el uso del medio de cultivo Murashigue y skoog con carbón activado y la adición de ácido giberélico promueve el crecimiento de Cannabis en sistemas In Vitro el cual indica que la adición de carbón activado influye en el tejido meristemático, incrementando así la altura de planta.
- Al comparar los niveles de ácido giberélico para vitroplantas se determinó que el T6 denominado (MS2+ 1 mg/L⁻¹ de ácido giberélico), fue el que desarrollo mayor resultado en cuanto a la altura de las vitroplantas y también se determinó que a las concentraciones trabajadas no ejerce efectos estadísticamente significativos para las variables, numero de hojas y crecimiento de la raíz.

13.2 RECOMENDACIONES

- Se debe realizar un correcto manejo de la bioseguridad dentro de los laboratorios y al momento de realizar cualquier proceso.
- Se recomienda dar continuidad a la investigación debido a que se cuenta con el material vegetativo que permite realizar procesos de 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. 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>
- 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 β 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 . Apthapi, 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 . Apthapi, 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](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_Vittorio_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>

Jiménez , M., & Alvarenga , S. (20007). Establecimiento del protocolo de para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* L. 32-40.

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

1Unaicho, M., Pilalumbo, H., 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

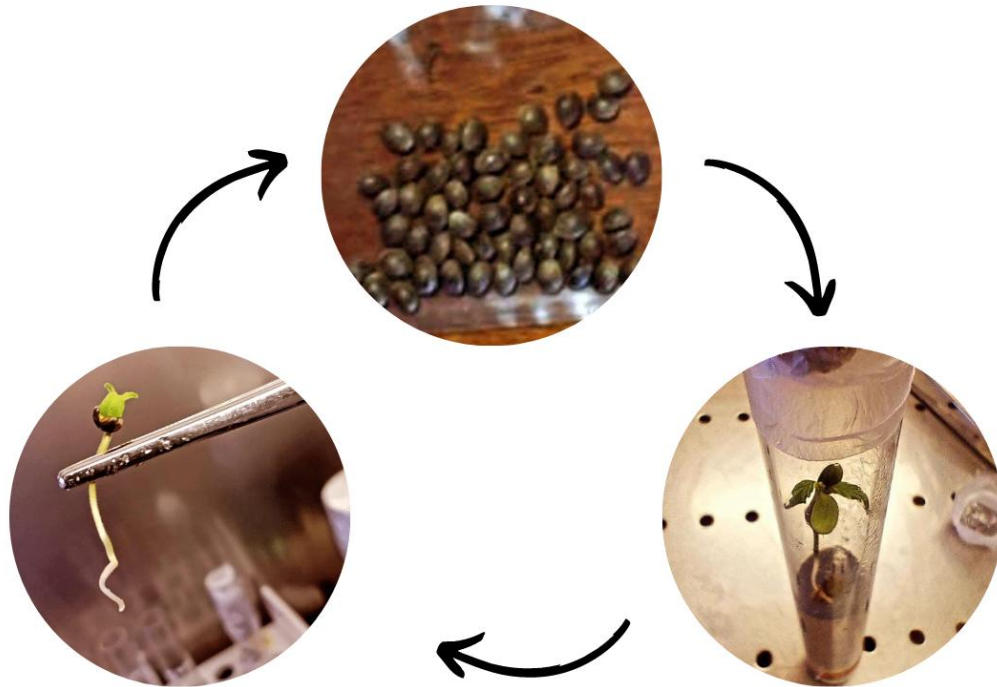
El Cannabis (*Cannabis sativa*) existe desde hace unos 10000 años desde el descubrimiento de la agricultura en el Viejo Mundo; es uno de los cultivos más antiguos del hombre, es fuente de fibra de cáñamo, aceite, aquenios (semillas alimenticias), propiedades narcóticas usadas en medicina y farmacología 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*, distintivas por su modo de crecimiento, aquenios, y principalmente por su fibra (Schultes *et al.* 2000; Thomas 2012). En años recientes, el cannabidiol (CBD), antagonista indirecto de tetrahidrocannabinol (THC), recibe más atención debido a su importancia farmacológica por sus efectos no adictivos.

En estudios con Cannabis, al ser un cultivo industrial es necesario un protocolo eficiente de regeneración de plántulas para transformación genética, micropropagación y conservación de germoplasma (Cheng *et al.* 2016). A continuación, se describe un método para la obtención de vitroplantas de cannabis st (*Cannabis sativa*).

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

La germinación in vitro de semillas de cannabis st, es una fase importante para la obtención de un banco de plantas, el objetivo de este protocolo es la obtención de vitroplantas mediante la germinación de semillas en medios de cultivo (McKendrick, 2000):

Cuando damos inicio para el proceso de germinación de una nueva especie es aconsejable probar con diferentes medios a una concentración total y parcial para determinar cuál es el mejor medio para dicha especie (McKendrick, 2000).



Fundamentos para la germinación de semillas

Mediante la germinación in vitro, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan (McKendrick, 2000).

Las semillas deben ser esterilizadas y transferidas a los frascos sin introducir hongos o bacterias externos. Generalmente, este proceso se realiza sembrando desde la superficie desinfectada de cápsulas verdes, o desinfectando semillas maduras con hipoclorito de sodio o calcio, o peróxido de hidrógeno. Además de asegurarse que todos los instrumentos utilizados en la transferencia estén desinfectados. Con cierto cuidado y práctica se puede crear y mantener condiciones de esterilización desde la germinación hasta el transplante de las semillas (McKendrick, 2000).

Las condiciones de esterilización en la preparación del medio se crean autoclavado el medio y los frascos a utilizarse por 15 minutos a 15 atm. Esta temperatura y presión son suficientes para matar todas las esporas de bacterias y hongos presentes en el medio (McKendrick, 2000).

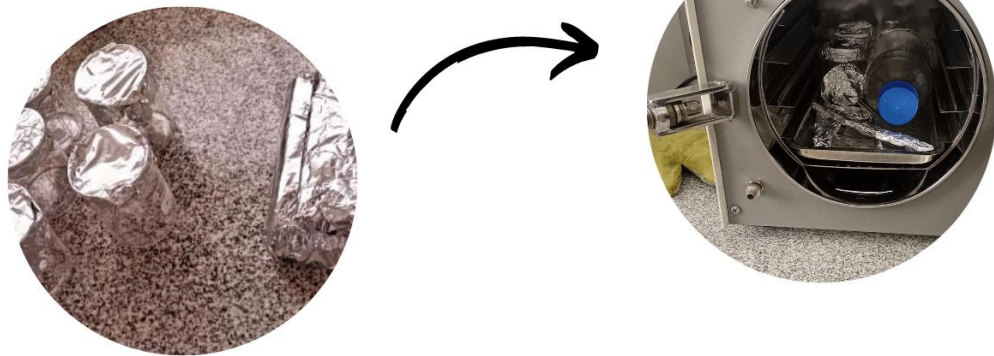
Fundamentos para mantener condiciones de esterilización

Es de vital importancia que el medio, los frascos, los aparatos y las semillas se mantengan desinfectadas desde el principio del proceso de germinación. Cualquier bacteria u hongo que se introduzca en los frascos crecerá más rápido que las semillas y pronto ocupará su espacio hasta matarlas. Las condiciones de esterilización en la preparación del medio se crean autoclavando el medio y los frascos a utilizarse por 15 minutos a 15 atm. Esta temperatura y presión son suficientes para matar todas las esporas de bacterias y hongos presentes en el medio (McKendrick, 2000).

Las semillas deben ser esterilizadas y transferidas a los frascos sin introducir hongos o bacterias externos. La esterilización consiste en vaciar el medio y sembrar las semillas utilizando una cámara de flujo laminar, para mantener estas condiciones de esterilización son posibles (Thompson, 2002) sin embargo, son técnicamente más complicadas y no deben ser desarrolladas en condiciones húmedas y sin limpieza adecuada.

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:

1. 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).
2. 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.
3. 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

En la preparación del medio de cultivo que fue utilizado fue M&S (Murashige y Skoog, 1962) (Castillo Alicia, 2014).

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

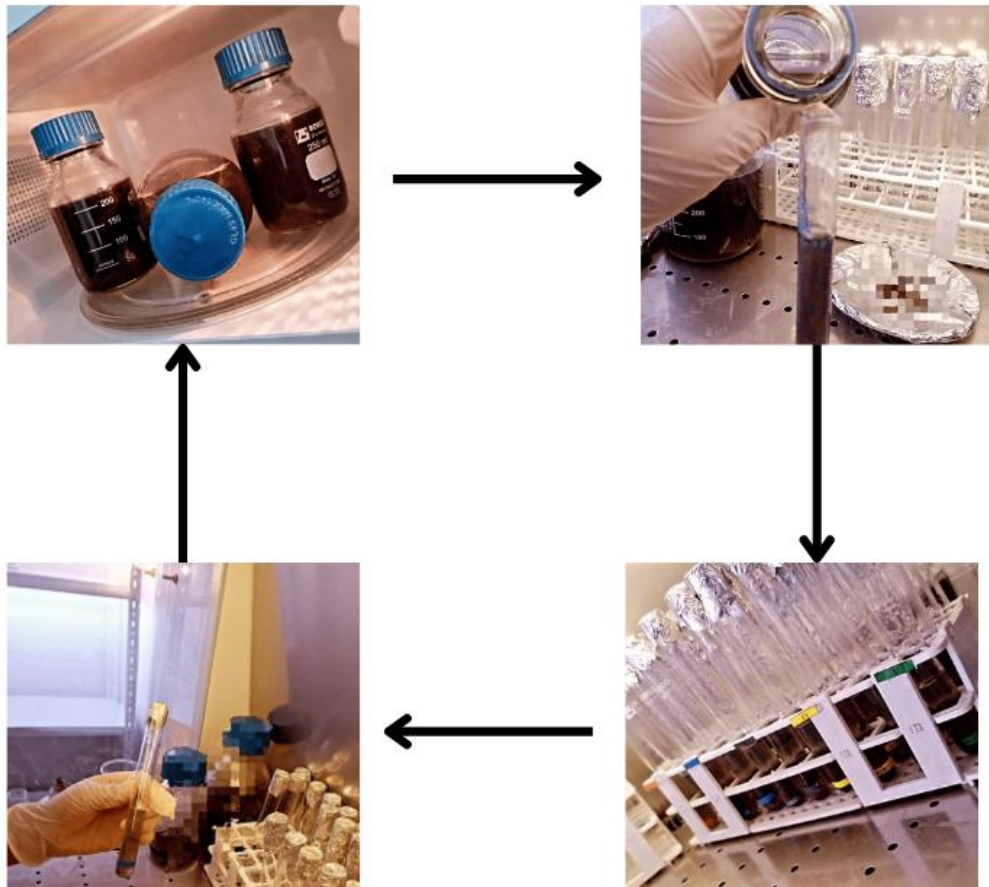
1. Se debe escatimar la cantidad correcta del medio en polvo utilizando una botella de 1 litro y evitando el contacto con el polvo del ambiente.
2. Para el medio Murashige y Skoog: añadir la cantidad correcta de sacarosa 3.0% (p/v).
3. Añadir una barra magnética y una pequeña cantidad de agua destilada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



Traspaso 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 & Alvarenga , 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 aquenios *in vitro* consiste en (Galán-Ávila *et al.*, 2020):

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.

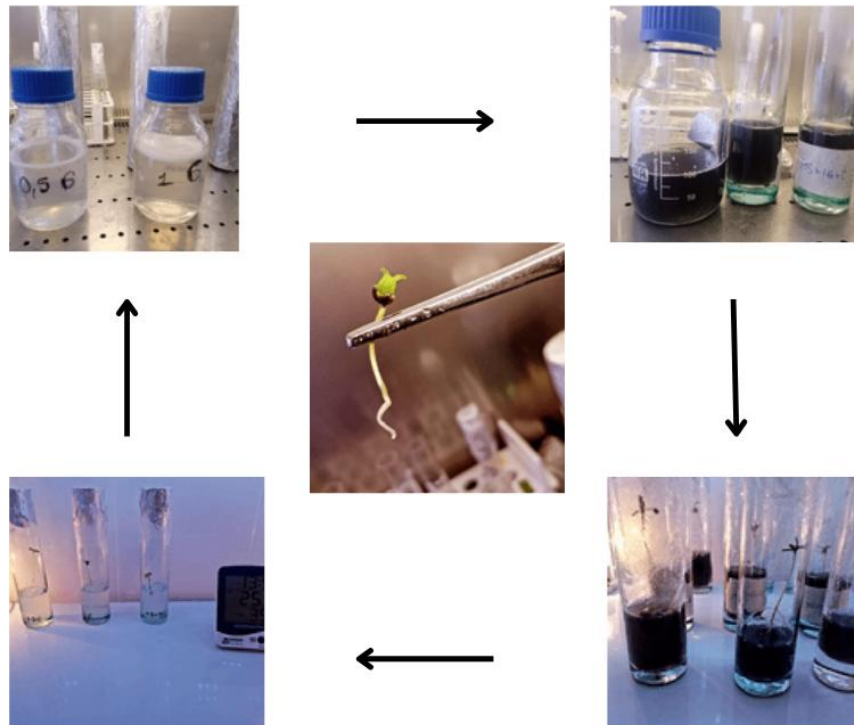
- Los frascos recientes deben ser revisados regularmente luego de la siembra por el riesgo de contaminación.



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. GreenCandy 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, México

Anexo 2. Aval de Traducción