



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN Y PROPAGACIÓN
PARA LA ESPECIE VEGETAL *BACCHARIS LATIFOLIA* (RUIZ & PAV.) CON EL
USO DE YEMAS AXILARES

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: ROSSANA CAROLINA ZALDUA TRELLES

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2024

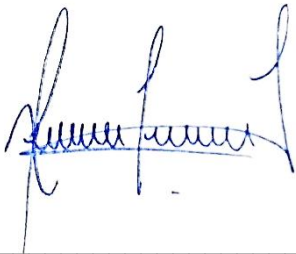
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Rossana Carolina Zaldua Trelles con documento de identificación No. 0106485113,
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera
total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 19 de febrero del 2024

Atentamente,



Rossana Carolina Zaldua Trelles

0106485113

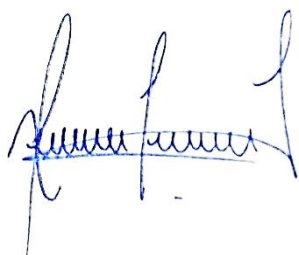
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Rossana Carolina Zaldua Trelles con documento de identificación No. 0106485113, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Comparación de protocolos de desinfección y propagación para la especie vegetal *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) con el uso de yemas axilares”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 19 de febrero del 2024

Atentamente,



Rossana Carolina Zaldua Trelles

0106485113

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación No. 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN Y PROPAGACIÓN PARA LA ESPECIE VEGETAL BACCHARIS LATIFOLIA (RUIZ & PAV.) CON EL USO DE YEMAS AXILARES, realizado por Rossana Carolina Zaldua Trelles con documento de identificación No. 0106485113, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 19 de febrero del 2024

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

0102291044

DEDICATORIA

A mis amados padres, Fausto y Rosa, quienes han sido la fuente inagotable de amor, apoyo y enseñanzas a lo largo de mi vida. Su dedicación y sacrificios han sido la base sobre la cual he construido mis sueños. Este logro es también su triunfo, y agradezco profundamente por su constante guía y aliento.

A mis queridos hermanos y al resto de mi familia, quienes han compartido conmigo risas, lágrimas y momentos inolvidables. Su respaldo incondicional ha sido mi fortaleza, y este éxito lleva consigo la marca de su amor y unidad familiar. Agradezco a cada uno de ustedes por formar parte esencial de mi historia.

A ti, Francisco, mi compañero de vida, agradezco tu presencia constante y tu apoyo inquebrantable. Tu amor ha sido mi inspiración y motivación en cada paso de esta travesía académica. Compartir este logro contigo hace que este momento sea aún más especial.

A mi querido tutora, Dra. Inés Malo, por su guía experta, paciencia y dedicación en ayudarme a dar forma a mi investigación y a crecer personal y profesionalmente.

A todos ustedes, mi gratitud es infinita. Este trabajo lleva impreso el amor, el esfuerzo y la colaboración de cada uno de ustedes. Gracias por ser mi pilar, mi motivación y mi fuente de alegría. Este logro es nuestro, y lo dedico con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Hoy quiero expresar mi más profundo agradecimiento a quienes han sido mi mayor apoyo durante este emocionante viaje académico. Fausto y Rosa, mis queridos padres, su amor incondicional y su constante aliento han sido la fuerza que me impulsó a alcanzar este logro. Su sacrificio y dedicación han sido la luz que ha iluminado mi camino, y estoy eternamente agradecida por su amor y apoyo.

A mis hermanos y al resto de la familia, su presencia y respaldo han sido pilares fundamentales en mi vida. Gracias por ser mi red de apoyo, por celebrar mis éxitos y por sostenerme en los momentos difíciles. Este logro es tan suyo como mío, y estoy agradecida de tenerlos a mi lado.

A ti, Francisco, agradezco tu paciencia, comprensión y amor inquebrantable. Tus palabras de aliento y tu presencia constante han sido un bálsamo en este arduo camino. Gracias por ser mi compañero y por compartir conmigo cada paso de esta travesía.

Este trabajo no solo representa mi esfuerzo individual, sino también la suma de todo el amor y apoyo que he recibido de cada uno de ustedes. Gracias por ser mi fuente de

inspiración y por creer en mí incluso cuando dudaba de mis propias capacidades. Este logro es también suyo, y celebro este momento con gratitud y alegría compartida.

Resumen

Con la ayuda de una tecnología denominada micropropagación, es posible realizar plantaciones a gran escala de forma rápida y en grandes cantidades mediante el cultivo de tejidos en un entorno de laboratorio controlado. La micropropagación de *Baccharis latifolia* es un método valioso para conservar la flora natural y autóctona del país, así como para reproducir especies en peligro de extinción.

Se evaluaron dos protocolos de desinfección y dos protocolos con hormonas, que podrían ayudar a crear un enfoque exitoso para la conservación y propagación a largo plazo de esta especie. Los protocolos de desinfección fueron: método A -etanol al 70% durante 1 minutos, detergente al 1% durante 15 minutos, hipoclorito de sodio al 10% durante 1 minuto con Tween 20 durante 10 minutos- y método B -etanol al 70% durante 3 minutos, detergente al 5% durante 10 minutos, peróxido de hidrógeno al 3% durante 3 minutos e hipoclorito de sodio al 10% con Tween 20 durante 30 minutos. Luego los explantes se colocaron en dos medios de cultivo de establecimiento: medio 1 -BAP 1 mg. L⁻¹/AG3 0,1 mg. L⁻¹ pH 5,6-5,8- y medio 2 -ANA 1 mg. L⁻¹/BAP 0,01 mg L⁻¹ pH 5,6 - 5,8. En cada etapa se aplicó un tratamiento de control.

El segundo protocolo fue el mejor de los obtenidos; tuvo una tasa de contaminación del 22,22% y un porcentaje de crecimiento *in vitro* del 77,77%, lo que lo convierte en el procedimiento más práctico utilizado en este estudio.

Palabras claves: micropropagación, yemas axilares, protocolos de desinfección y propagación.

Abstract

With the help of a technology called micropropagation, large-scale plantings can be made quickly and in large quantities by tissue culture in a controlled laboratory environment. Micropropagation of *Baccharis latifolia* is a valuable method to conserve the country's natural and native flora, as well as to reproduce endangered species.

Two disinfection protocols and two hormone protocols were evaluated, which could help create a successful approach for the long-term conservation and propagation of this species. The disinfection protocols were: method A - 70% ethanol for 1 minute, 1% detergent for 15 minutes, 10% sodium hypochlorite for 1 minute with Tween 20 for 10 minutes - and method B - 70% ethanol for 3 minutes, 5% detergent for 10 minutes, 3% hydrogen peroxide for 3 minutes and 10% sodium hypochlorite with Tween 20 for 30 minutes.

The explants were then placed in two establishment culture media: medium 1 - BAP 1 mg. L⁻¹/AG3 0,1 mg. L⁻¹ pH 5,6-5,8- and medium 2 -ANA 1 mg. L⁻¹/BAP 0,01 mg L⁻¹ pH 5,6 – 5,8. A control treatment was applied at each stage.

The second protocol was the best of those obtained; it had a contamination rate of 22,22% and an in vitro growth rate of 77,77%, making it the most practical procedure used in this study.

Key words: micropropagation, axillary buds, disinfection and propagation protocol.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1	15
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Problema.....	15
1.2. Delimitación	17
1.3. Pregunta de investigación.....	17
1.4. Objetivos	18
1.4.1. General.....	18
1.4.2. Específicos	18
1.5. Hipótesis.....	18
CAPITULO 2	19
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	19
2.1. Antecedentes de la investigación	19
2.2. <i>Baccharis latifolia</i> (Ruiz & Pav.).....	20
2.3. Metabolitos secundarios	22
2.4. Familia Asterácea	27
2.5. Genero <i>Baccharis</i>	29

2.6.	Taxonomía.....	29
2.7.	Propagación.....	30
2.8.	Micropropagación <i>in vitro</i>	32
2.9.	Variables que afectan al crecimiento de brotes en una micropropagación <i>in vitro</i>	33
2.10.	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	34
2.11.	Medio Murashige y Skoog MS	34
2.12.	Reguladores de crecimiento	35
2.13.	Marco Conceptual	35
2.13.1.	Definición de términos básicos.....	35
2.13.2.	Etanol.....	37
2.13.3.	Peróxido de hidrógeno	38
2.13.4.	Hipoclorito sódico.....	39
2.13.5.	Tween 20.....	40
CAPITULO 3		42
METODOLOGÍA.....		42
3.1.	Nivel de investigación.....	42
3.2.	Diseño de la investigación.....	42
3.3.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	42
3.4.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	43
3.5.	Materiales.....	43
3.6.	Reactivos	44

3.7.	Recolección de la muestra.....	45
3.8.	Protocolos de desinfección y siembra en el medio de cultivo.....	45
3.8.1.	Estudios preliminares utilizando yemas axilares como explante... 46	
3.8.2.	Protocolo inicial de desinfección	46
3.8.3.	El segundo protocolo de desinfección	47
3.8.4.	Primer protocolo de propagación.....	47
3.8.5.	Segundo protocolo de propagación.....	48
3.9.	Tratamientos de estudio.....	48
3.10.	Porcentaje de contaminación.....	51
3.11.	Porcentaje de viabilidad	51
Capítulo 4	52
RESULTADOS Y DISCUSION	52
4.1.	Análisis y discusión de los resultados	52
4.1.1.	Estudios preliminares.....	52
4.1.2.	Interpretación	58
4.1.3.	Presentación de datos.....	58
4.2.	Discusión.....	78
Capítulo 5	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
5.1.	Conclusiones	80
5.2.	Recomendaciones.....	80
6.	REFERENCAS.....	81

Índice de ilustraciones

<i>Ilustración 1 Baccharis latifolia</i> _____	21
<i>Ilustración 2 Hojas de la especie</i> _____	21
<i>Ilustración 3 Partes de la flor de la especie Baccharis latifolia: capítulo masculino (A), flor masculina (B), corola masculina (C), filaria interior (D), androceo abierto extendido €, capítulo femenino (F), flor femenina (G), corola femenina (H) y filarias (I)</i> _____	22
<i>Ilustración 4 Hojas de la especie Baccharis latifolia</i> _____	22
<i>Ilustración 5 Estructuras de terpenos por la unión de cadenas de isoprenos</i> _____	23
<i>Ilustración 6 Estructura química de: a) fenol, b) C6C3, c) Cumarina, d) Flavonoides</i> _____	24
<i>Ilustración 7 Estructura química de: Izquierda saponinas. Derecha Glicósido cardiotónico Digitoxina</i> __	26
<i>Ilustración 8 Clases de Alcaloides</i> _____	27
<i>Ilustración 9 Estructura química del Etanol</i> _____	38
<i>Ilustración 10 Estructura química del peróxido de hidrógeno</i> _____	39
<i>Ilustración 11 Estructura química del hipoclorito de sodio</i> _____	40
<i>Ilustración 12 Estructura química del Tween 20</i> _____	41
<i>Ilustración 13 Yema axilar en el medio, primer día</i> _____	73
<i>Ilustración 14 Yema axilar, primera semana</i> _____	74
<i>Ilustración 15 Yema axilar tercera semana</i> _____	74
<i>Ilustración 16 Yema axilar al segundo mes</i> _____	74
<i>Ilustración 17 Yema axilar al segundo mes y medio</i> _____	75
<i>Ilustración 18 Yema axilar al tercer mes</i> _____	75
<i>Ilustración 19 Protocolo número 2</i> _____	75

<i>Ilustración 20 Medio sin contaminación</i>	76
<i>Ilustración 21 Comparación de medios con y sin contaminación</i>	76
<i>Ilustración 22 Medios contaminados a la primera semana</i>	76
<i>Ilustración 23 Medios contaminados al mes</i>	77
<i>Ilustración 24 Medios sin contaminación del protocolo número 2</i>	77
<i>Ilustración 25 Sustancia viscosa al momento de cortar la yema axilar</i>	77

Índice de figuras

<i>Figura 1 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 1 de contaminación</i>	59
<i>Figura 2 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 2 de contaminación</i>	60
<i>Figura 3 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 3 de contaminación</i>	60
<i>Figura 4 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 4 de contaminación</i>	61
<i>Figura 5 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 1 de crecimiento</i>	61
<i>Figura 6 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 2 de crecimiento</i>	62
<i>Figura 7 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 3 de crecimiento</i>	62
<i>Figura 8 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 4 de crecimiento</i>	63
<i>Figura 9 Test anova del protocolo de contaminación</i>	64
<i>Figura 10 Test anova del protocolo de contaminación</i>	64
<i>Figura 11 Test anova del protocolo de crecimiento</i>	65
<i>Figura 12 Test anova del protocolo de crecimiento</i>	65
<i>Figura 13 Test de Tukey contaminación</i>	67
<i>Figura 14 Test de Tukey</i>	68
<i>Figura 15 Test de Tukey crecimiento</i>	70
<i>Figura 16 Test de Tukey</i>	70
<i>Figura 17 Diagrama de barras, niveles de contaminación</i>	71
<i>Figura 18 Diagrama de barras porcentaje total de contaminación</i>	72
<i>Figura 19 Diagrama de barras, niveles de crecimiento</i>	73
<i>Figura 20 Diagrama de barras porcentaje total de crecimiento</i>	73

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de isoprenos y funciones.</i>	24
<i>Tabla 2 Aplicaciones de los alcaloides</i>	27
<i>Tabla 3 Taxonomía Baccharis Latifolia Según el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional</i>	30
<i>Tabla 4 Tratamientos para la fase de desinfección</i>	49
<i>Tabla 5 Tratamientos para la fase de establecimiento in vitro</i>	50
<i>Tabla 6 Tabla de diseño completamente al azar</i>	51
<i>Tabla 7 Tratamiento 0 Control</i>	53
<i>Tabla 8 Tratamiento 1 Desinfección y Tratamiento 2 Crecimiento in vitro (Protocolo 1)</i>	54
<i>Tabla 9 Tratamiento 2 Desinfección y Tratamiento 1 Crecimiento in vitro (Protocolo 2)</i>	55
<i>Tabla 10 Tratamiento 1 Desinfección y Tratamiento 1 Crecimiento in vitro (Protocolo 3)</i>	56
<i>Tabla 11 Tratamiento 2 Desinfección y Tratamiento 2 Crecimiento in vitro (Protocolo 4)</i>	57

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La especie vegetal *Baccharis latifolia*, conocida popularmente como chilca o chilco, es una especie del género *Baccharis* abundante en Sudamérica: Bolivia, Ecuador, Colombia, Argentina, Perú, Uruguay y Chile. La presente exploración se enfoca en abordar este problema crítico y urgente. La micropropagación *in vitro* se presenta como una herramienta potencialmente efectiva para la conservación de la *Baccharis latifolia*. El propósito de este es desarrollar un protocolo de micropropagación específico para esta especie en peligro de extinción, con el fin de multiplicarla y preservarla. Esta técnica ofrece la posibilidad de producir un gran número de plantas genéticamente idénticas a partir de pequeñas muestras de tejido, lo que puede contribuir significativamente a su recuperación. Desde un enfoque teórico, esta se basa en los principios de Biotecnología Vegetal y conservación de la biodiversidad. *Baccharis latifolia*, con su singularidad botánica y su situación crítica, se convierte en un caso de estudio emblemático. Los capítulos que conformarán este trabajo de titulación se centrarán en el proceso de micropropagación *in vitro*, enfocándose en los protocolos de desinfección y propagación, En resumen, esta busca proporcionar una contribución valiosa al esfuerzo de conservación de la *Baccharis latifolia*, una especie endémica del Ecuador que está en peligro de extinción. La micropropagación *in vitro* se presenta como una estrategia prometedora para contrarrestar esta amenaza, y este trabajo se enfoca en su desarrollo y aplicabilidad. La importancia de la temática, su relevancia para la biodiversidad local hace que este proyecto sea de suma importancia en la actualidad.

1.1. Problema

Según los datos recopilados de Lopez (2011) solo se encuentra un 12,83 % de cobertura en la vegetación herbácea, localizada en la cuenca del Río Paute que es una de las cuencas hidrográficas más importantes del Ecuador. Ubicada en las provincias de Azuay, Cañar y Morona Santiago, su territorio se distribuye en alrededor de 16 cantones y cubre un área de 6436 km². Además, la escasa utilización de la Biotecnología como una

herramienta de conservación y gestión de la vida silvestre basada en principios de sostenibilidad, soberanía y distribución equitativa de los beneficios es una problemática de gran relevancia y urgencia que merece una justificación sólida. En primer lugar, la biodiversidad del planeta se encuentra en un estado de crisis sin precedentes debido a la pérdida de hábitat, la sobreexplotación de recursos naturales y el cambio climático. La Biotecnología ofrece herramientas poderosas para la conservación de especies en peligro y la restauración de ecosistemas, lo que es esencial para mantener la estabilidad de los ecosistemas y la biodiversidad en la Tierra (Ante, 2020).

La falta de una implementación adecuada de la Biotecnología en la conservación de la vida silvestre tiene un impacto directo en la soberanía y la equidad. La mayoría de las innovaciones biotecnológicas se desarrollan en países industrializados, lo que plantea desafíos de acceso y control de estas tecnologías para naciones en desarrollo. Es crucial abordar este desequilibrio y garantizar que las naciones tengan la capacidad de utilizar la Biotecnología de manera independiente para sus objetivos de conservación y sostenibilidad (Asas, 2021).

Con ello se apoya la conservación y sostenibilidad de especies amenazadas o en peligro, así como la protección de plantas delicadas como las incluidas en el Libro Rojo de Plantas Endémicas de Ecuador, actualmente hay una escasez de conocimiento y aplicación de protocolos de Biotecnología Vegetal en Ecuador para desarrollar, propagar y manejar la flora endémica y nativa de la nación (Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental, 2015)

Debido a la naturaleza mega diversa de nuestra nación, el objetivo es preservar y propagar las especies nativas y endémicas ecuatorianas. Esto es posible gracias a la Biotecnología Vegetal, que ha desarrollado técnicas para el cultivo de tejidos o semillas. Por ello, para asegurar que las semillas estén libres de contaminantes y evitar pérdidas

materiales y económicas, antes de iniciar la micropropagación se deben seguir protocolos suficientes para la desinfección y propagación de los explantes (Rivero, 2020).

Finalmente, la distribución equitativa de los beneficios es un aspecto crítico que se debe abordar. La Biotecnología tiene el potencial de generar beneficios económicos significativos, pero si no se establecen mecanismos adecuados para garantizar que esos beneficios se compartan de manera justa, existe el riesgo de explotación y desigualdades. Es esencial establecer políticas y acuerdos internacionales que promuevan la equidad en la distribución de los beneficios derivados de la Biotecnología utilizados en la conservación de la vida silvestre (Digilio, P. 2021).

1.2. Delimitación

Según Google Maps, la especie vegetal localizada en las coordenadas -2.8781717, -79.0577909 que corresponden a San Miguel de Putushi se halló la planta que presentaba signos de tallo florido más de veinte días después de haber sido revisada para descartar enfermedad; se supuso que la planta había recibido precipitaciones en las 24 horas anteriores a su recolección.

1.3. Pregunta de investigación

Al tener una escasez de investigación sobre la especie *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.), al no disponer de mayor información sobre protocolos de propagación para esta especie, el objetivo de esta investigación es comparar protocolos de micropropagación en esta especie *Baccharis latifolia*.

¿Qué protocolos son eficaces para la desinfección y propagación de *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.)?

1.4. Objetivos

Con la finalidad de poder alcanzar un protocolo eficaz tanto en desinfección como de propagación, se plantean los siguientes objetivos.

1.4.1. General

Comparar dos protocolos de desinfección y concentraciones hormonales en la micropropagación y desarrollo de explantes de *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) como alternativa para la conservación de especies endémicas.

1.4.2. Específicos

- Investigar la bibliografía esencial mediante búsqueda en bases de datos recopilando la información disponible.
- Evaluar la proliferación de brotes y explantes axilares de *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) modificando las concentraciones hormonales [BAP, AG3, ANA] en medios MS mediante experimentación en laboratorio para un desarrollo *in vitro* adecuado.
- Proporcionar recomendaciones prácticas para la propagación exitosa de *Baccharis latifolia* basados en los resultados obtenidos para el cultivo *in vitro* de esta especie.

1.5. Hipótesis

Existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) al utilizar diferentes protocolos de desinfección y medios de cultivo suplementados con reguladores hormonales.

CAPITULO 2

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La micropropagación *in vitro* se ha convertido en una técnica crucial en la producción masiva de ejemplares genéticamente idénticos. Este proceso se basa en la cultura de tejidos, permitiendo la multiplicación de plantas a partir de una pequeña porción de material vegetal, como yemas, segmentos nodales o meristemas, en condiciones controladas de laboratorio. La micropropagación *in vitro* de *Baccharis latifolia* ofrece ventajas significativas, como la obtención de plantas libres de patógenos, la conservación de genotipos valiosos y la aceleración de su propagación, lo que la convierte en una herramienta esencial tanto para la industria hortícola como para la conservación de esta especie amenazada. El presente marco teórico busca proporcionar una visión general de los fundamentos y aplicaciones de la micropropagación *in vitro* en el contexto de *Baccharis latifolia* (Judge & Hickey, 2019).

2.1. Antecedentes de la investigación

Para la Biotecnología y la conservación de la biodiversidad, es esencial abordar la problemática de las plantas en peligro de extinción. La pérdida de diversidad vegetal es un problema global que amenaza no solo la belleza y singularidad de nuestra flora, sino también la funcionalidad de los ecosistemas y la provisión de servicios ecosistémicos esenciales (Renneberg, R. 2019). La *Baccharis latifolia*, una especie endémica de ciertas regiones geográficas representa un caso de particular interés. Esta planta, conocida por su delicada estructura y características únicas, ha sido afectada por la degradación de su hábitat y la actividad humana, lo que la coloca en riesgo de desaparecer.

Los antecedentes de las plantas en peligro de extinción se remontan a la acelerada degradación del medio ambiente, la deforestación, la expansión agrícola y el cambio

climático. La *Baccharis latifolia*, en específico, es una especie que ha sido objeto de estudios científicos debido a su singularidad. Su hábitat natural se ha reducido drásticamente en los últimos años, lo que ha llevado a su inclusión en listas de especies amenazadas. Además, su limitada distribución geográfica y población hacen que su supervivencia sea aún más crítica (Homero, 2012).

La Biotecnología desempeña un papel crucial en la conservación de plantas en peligro de extinción, incluida la *Baccharis latifolia*. A través de técnicas de propagación *in vitro*, conservación de semillas y estudios genéticos, se busca preservar y restaurar poblaciones de esta especie. La comprensión de su genética y ecología es fundamental para tomar medidas efectivas y desarrollar estrategias de conservación a largo plazo, contribuyendo así a la protección de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas en los que esta planta se encuentra (Asas, 2021).

2.2. *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.)

Árbol o arbusto glabro con ramas verticiladas que crece rápidamente, alcanzando alturas de 1,5-4 m y anchuras de hasta 3 m. Las hojas son elípticas u oblongo lanceoladas, enteras, acuminadas, coriáceas y lustrosas. Tienen la base cuneada, el ápice agudo, el borde aserrado y son glabras por ambas caras. Las hojas miden de 10 a 20 cm de largo y el peciolo de 10 a 30 mm. Las hojas trinervadas tienen tres nervios principales que se originan en la base. Las axilas de las ramas dan lugar a la inflorescencia. Tiene muchas flores pentámeras diminutas, un capítulo con 20-22 flores estaminadas (Cuatrecasas, 1967).



Ilustración 1 Baccharis latifolia

Fuente: Autora



Ilustración 2 Hojas de la especie

Fuente: Autora

El fruto es una cápsula ovalada. El arilo de las semillas oblongas es blanco, este tipo de planta se utiliza comúnmente en jardinería para formar cercas vivas y estabilizar suelos en laderas y terrazas. Su madera se emplea como leña, y la planta también posee propiedades medicinales. *Baccharis latifolia* ha captado la atención de aquellos interesados en los productos vegetales de Colombia. En el pasado, cuando aún no se habían inventado los colorantes sintéticos y resultaba difícil obtener el color verde en telas debido a la limitada disponibilidad de colores estables como el rojo, el amarillo, el

azul y el negro, los indígenas conocían el secreto de obtener este color de la planta (Chilca *Baccharis Latifolia*, 2020).

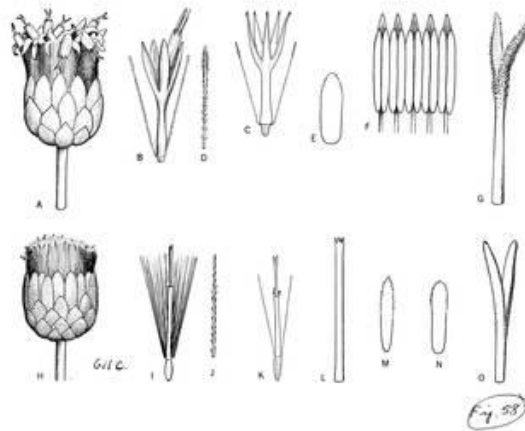


Ilustración 3 Partes de la flor de la especie *Baccharis latifolia*: capitulo masculino (A), flor masculina (B), corola masculina (C), filaria interior (D), androceo abierto extendido (E), capitulo femenino (F), flor femenina (G), corola femenina (H) y filarias (I)

Fuente: (Cuatrecasas, 1967)

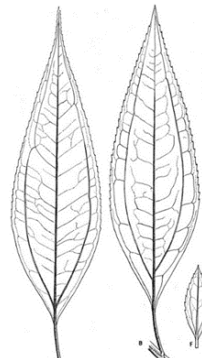


Ilustración 4 Hojas de la especie *Baccharis latifolia*

Fuente: (Cuatrecasas, 1967)

2.3. Metabolitos secundarios

El proceso metabólico es el conjunto de acontecimientos químicos que se producen en un organismo. La mayor parte del carbono, el nitrógeno y la energía se convierten en moléculas compartidas por todas las células y esenciales para la supervivencia del organismo. Se denominan metabolitos principales e incluyen lípidos, carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos (Abdelnour, A y Muñoz, A, 2005).

Sin embargo, a diferencia de otras especies, las plantas dedican gran parte de su energía y carbono almacenados a la producción de una amplia gama de compuestos orgánicos conocidos como metabolitos secundarios (Instituto De Botánica Darwinion, 2020).

Conocidos por otro nombre, "productos naturales", los metabolitos secundarios son muy valiosos tanto en el ámbito médico como en el comercial. Las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética dependen de ellos para sus productos. Terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos y alcaloides son los cuatro grupos principales en los que se dividen los metabolitos secundarios. Con más de 40000 moléculas, los terpenos, también conocidos como terpenoides, constituyen la mayor categoría de metabolitos secundarios, que comprenden casi 40000 compuestos distintos. Todos ellos se producen a partir de la unión de unidades de isopreno [5 átomos de C], y suelen ser insolubles en agua [véase la ilustración 3]. Como resultado, la cantidad de unidades de isopreno que contienen los terpenos [Tabla 1] (Allinger y colaboradores, 1984).

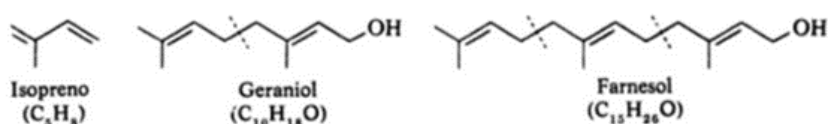


Ilustración 5 Estructuras de terpenos por la unión de cadenas de isoprenos

Fuente: Allinger y colaboradores. 1984

Tabla 1 Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de isoprenos y funciones.

CLASIFICACIÓN DE LOS TERPENOS			
Nombre	nº de isoprenos que componen la molécula	Función	Ejemplo
Monoterpenos	2	Aromas y esencias.	Geraniol, mentol.
Sesquiterpenos	3	Intermediario en la síntesis del colesterol.	Farnesol.
Diterpenos	4	Forman pigmentos y vitaminas.	Fitol, vitamina A, E, K.
Triterpenos	6	Intermediario en la síntesis del colesterol.	Escualeno.
Tetraterpenos	8	Pigmentos vegetales.	Carotenos, xantofilas.
Politerpenos	n	Aislantes.	Látex, caucho.

Fuente: (Allinger y colaboradores. 1984)

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios con un anillo aromático y un grupo hidroxilo, conocidos grupo fenólico, un anillo aromático que contiene un grupo hidroxilo, véase la ilustración 4. Estas moléculas se denominan compuestos fenólicos, a menudo conocidos como polifenoles o fenilpropanoides (Avalos y colaboradores, 2009).

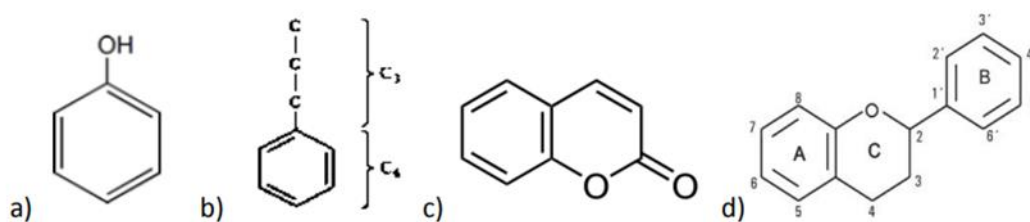


Ilustración 6 Estructura química de: a) fenol, b) C6C3, c) Cumarina, d) Flavonoides

Fuente: (Avalos y colaboradores. 2009)

La fenilalanina es la fuente de la mayoría de los compuestos fenólicos. Como los ácidos cumárico tienen un anillo bencénico [C6] y una cadena lateral de tres carbonos [C3], se clasifican como compuestos químicos fenólicos simples, o fenilpropanoides,

como se puede observar en la ilustración 4. Se han encontrado más de 1.500 cumarinas en más de 800 especies vegetales (Avalos y colaboradores, 2009).

Las cumarinas son una amplia clase de lactonas que tienen propiedades antibacterianas e inhibidoras de la germinación (Avalos y colaboradores, 2009).

Entre las sustancias químicas fenólicas se encuentran los flavonoides. Su esqueleto de carbono, dividido en dos anillos aromáticos conectados por un puente triple de carbono, consta de quince carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos; las categorías principales son antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Sirven como pigmentos y como protección (Jacome, A, 2011).

Los taninos son sustancias químicas fenólicas poliméricas que suelen ser tóxicas porque se adhieren a las proteínas y las desnaturalizan. Muchos animales también los utilizan como repelentes alimentarios; en el caso de los mamíferos, esto significa que se mantienen alejados de las plantas o componentes vegetales que tienen altas concentraciones de taninos. Estos dos grupos son los taninos condensados y los taninos hidrolizables. Los ácidos fuertes pueden oxidar los taninos condensados, que son polímeros de unidades flavonoides conectadas por enlaces C-C incapaces de ser hidrolizados, pero que pueden oxidarse para formar antocianidinas. Menos que los taninos condensados, los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos con ácidos fenólicos compuestos en su mayoría por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples. Son más pequeños y fáciles de hidrolizar que los taninos condensados (Joseph, C. R, 2020).

Los metabolitos vegetales de gran relevancia se denominan glucósidos. La conexión glicosídica que se crea cuando una molécula de azúcar se condensa con otra

molécula que tiene un grupo hidroxilo es lo que les da nombre. Destacan tres categorías de glucósidos: las saponinas, los glucósidos cardiotónicos y los glucósidos cianogénicos (Alejandro, M. O. D, 2016).

Los triterpenoides o esteroides con una o más moléculas de azúcar en su estructura se denominan saponinas (véase la ilustración 5). estructura de las moléculas de azúcar. Pueden describirse como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas, y tienen las cualidades surfactantes o detergentes. cualidades de un surfactante o detergente (Leonor, A. G. M, 2011).

Las saponinas esteroideas y los glucósidos cardiotónicos presentan similitudes. saponinas esteroideas, también poseen cualidades detergentes; sin embargo, a diferencia de las esteroideas Tienen una lactona en su estructura, a diferencia de las saponinas. Cuando se tritura la planta, las moléculas nitrogenadas conocidas como glucósidos cianogénicos -que por sí mismas no son tóxicas- se descomponen y liberan sustancias químicas volátiles y peligrosas como el cianuro de hidrógeno (Marino, C y colaboradores, 2003).

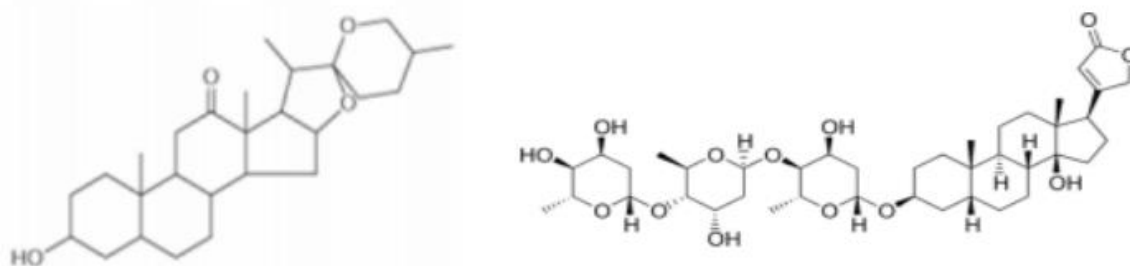


Ilustración 7 Estructura química de: Izquierda saponinas. Derecha Glicósido cardiotónico Digitoxina

Fuente: (Avalos y colaboradores, 2009)

Más de 15000 metabolitos secundarios, conocidos como alcaloides, tienen tres rasgos en común: son biológicamente activos, solubles en agua e incluyen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. Aunque algunos son sustancias químicas

nitrogenadas alifáticas, la mayoría son heterocíclicas. Los alcaloides se clasifican en función de los anillos incluidos en la molécula como se muestra en la ilustración 6. En la Tabla 2 se indican algunos usos de los alcaloides (Marine Species Traits - *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers, 2023).

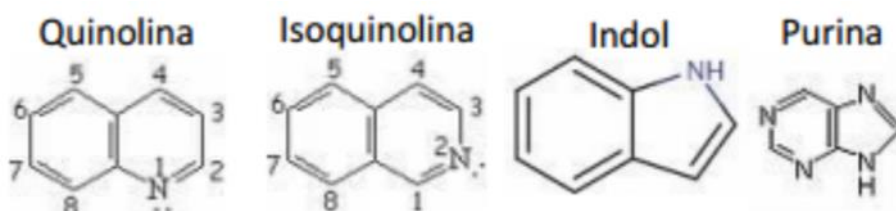


Ilustración 8 Clases de Alcaloides

Fuente: (Avalos y colaboradores, 2009)

Tabla 2 Aplicaciones de los alcaloides

Alcaloide	Planta	Uso
Ajmalina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antiarrítmico, inhibidor de la captación de glucosa por la mitocondria del tejido cardiaco
Atropina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Anticolinérgico, antídoto del gas nervioso
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Estimulante del sistema nervioso central
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Agente anticanceroso
Cocaína	<i>Erythroxylon coca</i>	Anestésico tópico, estimulante del sistema nervioso central, bloqueante adrenérgico, droga de abuso
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico y antitusivo
Coniina	<i>Conium maculatum</i>	Parálisis del sistema nervioso motor
Emetina	<i>Uragoga ipecacuanha</i>	Emético
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, narcótico, droga de abuso
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tóxico, insecticida en horticultura, droga de abuso

Fuente: Allinger y colaboradores. 1984

2.4. Familia Asterácea

Con la excepción de la Antártida, la familia Asterácea está formada por más de 1700 géneros y entre 24000 y 30000 especies repartidas por todo el mundo. Sus miembros han demostrado una notable adaptabilidad a una gran variedad de entornos, desde diminutas hierbas de un centímetro hasta árboles que alcanzan alturas de más de 30 metros. Para identificarlas se utiliza el capítulo, la estructura reproductiva de la familia

de las asteráceas. Las flores sésiles se fijan en un receptáculo que se ha expandido (Herbario Azuay - Universidad Del Azuay, 2023).

Aproximadamente 1300 géneros y 21000 especies componen la mayor familia de dicotiledóneas, de los cuales 181 géneros son nativos de Europa están presentes en los hábitats naturales. Esta familia incluye plantas herbáceas y arbustos, algunos de los cuales tienen látex. Hojas alternas; raramente opuestas; simples; enteras o partidas; a veces espinescentes. Inflorescencias en capítulos, que pueden verse solitarios o en racimos llamados panículas o glomérulos. panículas o glomérulos. Hay dos tipos de flores: zigomorfas [lígulas] y actinomorfas [flósculos]. También pueden ser neutras, unisexuales o hermafroditas (HVAA Collection search Parameters, 2000).

La existencia y disposición de las distintas formas florales varían según el taxón: corola gamopétala, con tubo y limbo, que puede tener tubo y limbo, que puede tener de tres a cinco dientes; cáliz ausente, o cáliz transformado en aspa de pelos, setas, escamas o corona. Además, hay cinco estambres con sus anteras fusionadas para crear un tubo. Gineceo con un estilo, un estigma lobulado y dos ovipositorios en cada ovario. Fruto en cipsela, frecuentemente con papo, y un estigma con un solo lóbulo (Navarrete, H. 2019).

Muchas especies beneficiosas [medicinales, agrícolas, industriales, etc.] se encuentran en la familia de las Asteráceas. Varias de estas están determinadas porque han sido domesticadas y cultivadas desde la antigüedad, y por otras, que crean enormes extensiones de vegetación salvaje en varios terrenos. Su aplicación etnobotánica ha contribuido a la supervivencia de varios pueblos. Unos cuarenta géneros de la familia de las asteráceas son importantes para el caucho, la madera, la leña, la celulosa, el forraje, la miel, el polen, las especias, los edulcorantes y los tintes, así como para el suministro de aceites esenciales y aceites fijos para humanos y animales. Una amplia gama de

metabolitos secundarios producidos por las asteráceas se emplea en aplicaciones medicinales (Vitto, 2009).

2.5. Género *Baccharis*

Con unas 400-500 especies, el género *Baccharis* es el más abundante de la tribu asteráceas. Se desconoce el número exacto de especies que componen este género porque aún no ha sido monografiado (Giuliano, 2001). Los lugares más altos del mundo albergan la mayor parte del género *Baccharis*: Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. Brasil y los Andes albergan una alta densidad de especies, lo que sugiere que estas regiones son probablemente el centro de origen del género. Se conocen 120 especies de *Baccharis* en Brasil, la mayoría de las cuales se encuentran en el sudeste del país. Se estima que 100 especies -de las cuales 38% son endémicas- se encuentran en Argentina, 28 en México y quizás 40 en Colombia, constituyendo uno de los grupos de plantas más significativos de esta nación. Hay un 38% de especies endémicas (Gonzada, 2005).

2.6. Taxonomía

En biología botánica, la taxonomía de la *Baccharis latifolia* es un área crucial de investigación que se ocupa de la categorización y ordenación sistemática de esta especie vegetal. Esta especie pertenece a la familia Asterácea del reino Plantae. El objetivo de la taxonomía es identificar con precisión los rasgos morfológicos, anatómicos y genéticos de una planta para clasificarla en una jerarquía taxonómica que va desde el nivel de especie hasta categorías superiores como género, familia y orden. Para ofrecer un conocimiento exhaustivo del lugar que ocupa en la diversidad biológica, el proceso taxonómico implica un análisis completo de las características distintivas de la planta, como las hojas, las flores, los frutos y otros rasgos pertinentes (Delgado-Paredes y colaboradores, 2023).

Además de ayudar a organizar la información botánica, este enfoque metódico facilita a los científicos y al público en general una comunicación eficaz sobre esta especie vegetal específica.

Tabla 3 Taxonomía *Baccharis Latifolia* Según el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional

Reino:	Plantae
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Asterales</i>
Tribu:	<i>Astereae</i>
Género:	<i>Baccharis</i>
Especie:	<i>B. latifolia</i> (RUIZ Y PAVÓN) PERS., 1807

Fuente: Navarrete, H. 2019

2.7. Propagación

La propagación en plantas hace referencia al proceso mediante el cual las plantas generan nuevas plantas, ya sea de forma natural o a través de métodos controlados de reproducción. A continuación, se proporciona información sobre la propagación en plantas, incluyendo algunos eventos históricos y métodos comunes:

- Selección y propagación de cultivos: durante miles de años, los agricultores han llevado a cabo la selección y propagación de plantas con características deseables, lo que ha resultado en la domesticación de cultivos esenciales como el trigo, el maíz y el arroz.
- Hibridación de plantas: a lo largo de la historia, jardineros y botánicos han realizado cruces selectivos entre distintas variedades de plantas para crear híbridos con atributos específicos. Por ejemplo, Charles Darwin investigó

la propagación de orquídeas y exploró la coevolución entre las plantas y sus polinizadores (López, 2019).

Métodos comunes de propagación de plantas:

- Propagación por semillas: las semillas representan una forma natural de propagar plantas y han sido utilizadas a lo largo de la historia. Los agricultores y jardineros han seleccionado cuidadosamente semillas de plantas fuertes y productivas para su posterior siembra.
- Esquejes: esta técnica implica cortar una sección de una planta madre y colocarla en el suelo o en un medio de cultivo para permitir que desarrolle raíces y crezca como una nueva planta. Se utiliza comúnmente con plantas como rosas y arbustos.
- Injertos: en el injerto, se une parte de una planta, llamada injerto, a otra planta patrón con el objetivo de combinar las características de ambas.
- División: algunas plantas perennes pueden propagarse dividiendo sus raíces y partes aéreas en segmentos separados, que luego desarrollarán raíces y crecerán como plantas individuales.
- Bulbos y rizomas: plantas como tulipanes y lirios se propagan mediante bulbos, rizomas y tubérculos, que son estructuras de almacenamiento que contienen nutrientes y brotes para generar nuevas plantas.
- Micropropagación: este método implica el cultivo de plantas a partir de células individuales en un entorno de laboratorio, permitiendo la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas.

La propagación de plantas es crucial en la horticultura, la agricultura y la conservación de especies vegetales. A lo largo de la historia, se han desarrollado y perfeccionado diversas técnicas de propagación para satisfacer las necesidades humanas

y preservar la diversidad genética de las plantas (Escamilla-Hernández y colaboradores., 2020).

2.8. Micropropagación *in vitro*

La micropropagación *in vitro*, también conocida como propagación de tejidos, es una técnica de Biotecnología Vegetal que se emplea para generar múltiples plantas idénticas genéticamente a partir de una única planta madre. Este proceso se desarrolla en un ambiente estéril y controlado en el laboratorio, permitiendo la manipulación y el cultivo de plantas en condiciones óptimas (Indacochea y colaboradores, 2018).

Lo que se puede hacer en la micropropagación *in vitro*:

- Clonación de plantas: la micropropagación *in vitro* permite crear clones genéticos de plantas seleccionadas, conservando sus características deseables, como resistencia a enfermedades, alta productividad o cualidades ornamentales.
- Preservación de germoplasma: es una herramienta fundamental para la conservación y preservación de la diversidad genética de plantas en peligro de extinción, raras o valiosas.
- Producción de plantas libres de patógenos: la técnica garantiza que las plantas resultantes estén libres de enfermedades, plagas y patógenos, lo que es esencial para la agricultura y la silvicultura.
- Aumento de la producción: permite la producción rápida y masiva de plantas, superando las limitaciones de la propagación tradicional, como la siembra de semillas o el uso de esquejes.

- Mejora de variedades vegetales: se utiliza para el desarrollo de nuevas variedades de plantas con características mejoradas, como mayor resistencia a condiciones adversas, mayor rendimiento y calidad.
- Conservación de la biodiversidad: la técnica juega un papel crucial en la preservación de especies vegetales en peligro de extinción, evitando su desaparición y contribuyendo a la biodiversidad.
- Agricultura sostenible: la micropropagación *in vitro* facilita la producción de plantas saludables y productivas, contribuyendo a la sostenibilidad y seguridad alimentaria.
- Reducción de la propagación de enfermedades: al producir plantas libres de patógenos, ayuda a prevenir la propagación de enfermedades en los cultivos, lo que es esencial para la agricultura y la horticultura.
- Investigación científica: la técnica es esencial en la investigación agrícola y botánica, permitiendo estudios genéticos y experimentos de cultivo en condiciones controladas.
- Industria hortícola: la micropropagación *in vitro* es ampliamente utilizada en la producción comercial de plantas ornamentales, frutales, hortalizas y cultivos de alto valor económico.

2.9. Variables que afectan al crecimiento de brotes en una micropropagación *in vitro*

Los factores que influyen en el crecimiento de brotes en la micropropagación *in vitro* son críticos para el éxito de esta técnica. Estos factores se pueden dividir en tres categorías principales: físicos, químicos y biológicos. Factores físicos: incluyen la temperatura de cultivo y la exposición a la luz y al fotoperiodo, que deben ajustarse a las necesidades específicas de cada planta. Factores químicos: la composición del medio de

cultivo, que proporciona nutrientes esenciales, y el pH del medio son fundamentales para el crecimiento de los brotes. Deben ser cuidadosamente controlados. Factores biológicos: la elección de los explantes de alta calidad y su desinfección adecuada son esenciales. Además, el genotipo de la planta influye en la capacidad de regeneración de brotes. El control y optimización de estos factores son esenciales para el éxito de la micropropagación *in vitro*, permitiendo la producción eficiente de plantas a partir de un pequeño número de explantes (MORALES MIS, 2011).

2.10. Etapas del cultivo *in vitro*

Las etapas clave del cultivo *in vitro* de plantas incluyen la selección y preparación de explantes, la esterilización, el establecimiento en un medio de cultivo, el cultivo y multiplicación de brotes, el subcultivo cuando es necesario, el enraizamiento de ser preciso, y la aclimatación de las plantas al entorno exterior. Cada etapa es esencial para el crecimiento exitoso de plantas en un ambiente controlado (Alvarez Acuña, 2021).

2.11. Medio Murashige y Skoog MS

El medio de cultivo Murashige y Skoog MS, creado por Murashige y Skoog en 1962, se ha convertido en un estándar en la micropropagación de plantas debido a su capacidad para promover el crecimiento óptimo de tejidos vegetales. Este medio contiene una gama completa de sales minerales esenciales, carbohidratos, vitaminas y reguladores de crecimiento, lo que lo hace adecuado para la mayoría de las especies de plantas. Su versatilidad y la posibilidad de ajustar sus componentes lo convierten en una herramienta esencial para investigadores y viveristas que buscan producir plantas de forma eficiente en condiciones de laboratorio o invernadero (Andrade, 2021).

2.12. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son esenciales para el cultivo *in vitro*, ya que estimulan respuestas fisiológicas en las plantas. Las auxinas, que en griego significan "crecimiento", son sustancias químicas que promueven la expansión y elongación celular. Existen auxinas naturales como el ácido indolacético –AIA- y sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético -2,4-D-, el ácido naftalenacético –ANA- y el ácido indol-3-butírico –AIB-. Las auxinas inducen alargamiento celular, división celular, producción de raíces adventicias y, en ocasiones, inhiben la formación de brotes axilares (Sandoval Velasco, M. E, 2021).

Las citoquininas, por otro lado, estimulan la división celular o citocinesis y promueven el crecimiento de tallos y la formación de yemas laterales. Las citoquininas, en conjunto con otros factores como la luz y la nutrición celular, afectan la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos. En cuanto a las giberelinas, estas hormonas favorecen la elongación y extensibilidad celular, estimulando el crecimiento de los entrenudos y meristemos, lo que es crucial en la proliferación de células madre. La giberelina más conocida es el ácido giberélico -AG3-. Su acción principal radica en el alargamiento de los tejidos y la promoción del crecimiento de yemas derivadas de meristemos. El uso de estos reguladores debe ser cuidadosamente controlado debido a su potencial para causar mutaciones (Enriquez y colaboradores, 2020).

2.13. Marco Conceptual

2.13.1. *Definición de términos básicos*

- La micropropagación es una técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* que se utiliza para propagar una planta a gran escala a partir de un pequeño fragmento de tejido vegetal, como un explante, y permite obtener

numerosas plantas genéticamente idénticas. Este proceso se realiza en condiciones controladas de laboratorio y se utiliza en la propagación de especies vegetales con características deseables, como resistencia a enfermedades, calidad genética o características ornamentales.

- Los explantes axilares son fragmentos de tejido vegetal que se obtienen de la unión entre el tallo y la hoja, justo en la axila de una hoja. Estos explantes son utilizados como material inicial en la micropropagación de plantas *in vitro*. Debido a su ubicación, suelen contener células en estado de alta actividad, lo que los convierte en una opción valiosa para la generación de nuevas plantas genéticamente idénticas a la planta madre.
- El cultivo *in vitro* es una técnica que implica el crecimiento de células, tejidos u órganos de una planta en un entorno controlado, como un medio de cultivo, que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta técnica se utiliza en la micropropagación y permite la reproducción de plantas fuera de su ambiente natural. Los protocolos de desinfección son procedimientos utilizados para eliminar microorganismos no deseados, como bacterias, hongos y virus, de los explantes axilares antes de su introducción en el medio de cultivo *in vitro*. Estos protocolos son esenciales para evitar la contaminación y garantizar que las plantas micropropagadas sean genéticamente idénticas a la planta madre.
- El medio de cultivo es una solución que contiene nutrientes esenciales, hormonas vegetales y otros componentes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas en el cultivo *in vitro*. Puede ser ajustado para

favorecer la multiplicación de las células, la formación de brotes o raíces, dependiendo de los objetivos del proceso de micropropagación.

- La contaminación en el contexto de la micropropagación se refiere a la presencia no deseada de microorganismos, como bacterias o hongos, que pueden competir con los explantes axilares en el medio de cultivo y comprometer el éxito del proceso de micropropagación (Yáñez, S. L y colaboradores, 2012).

2.13.2. Etanol

- Etanol al 70%: modo de funcionamiento

Dado que el etanol al 70% puede desnaturalizar las proteínas y dañar las membranas celulares de los gérmenes, es útil para la desinfección. El 30% de agua facilita la entrada de sustancias en las células, lo que aumenta su eficacia contra hongos, virus y bacterias.

- Aplicación en el sector sanitario:

Se utiliza a menudo en entornos médicos para limpiar superficies y dispositivos médicos no críticos, así como para desinfectar la piel antes de los tratamientos.

- Mantenimiento de la estabilidad y almacenamiento:

Dado que el etanol al 70% es menos volátil que el etanol puro, se almacena de forma más estable. El agua ayuda a prolongar la actividad del desinfectante al ralentizar su rápida evaporación.

- Etanol al 96%:

El etanol al 96% es un desinfectante más potente que el etanol al 70% debido a su mayor contenido de alcohol. Cuando es esencial una eficacia óptima, se utiliza para esterilizar equipos en laboratorios y entornos industriales.

- Impacto sobre los microbios:

Como el etanol al 96% contiene un alto contenido de alcohol, los gérmenes se eliminan más rápidamente debido a la rápida desnaturalización de las proteínas y a una desintegración más eficaz de la membrana celular.

- Evaporación rápida

El etanol al 96% tiende a evaporarse más rápidamente debido a su mayor volatilidad. En situaciones en las que la humedad residual es un problema, esto puede ser útil.

- Medidas de seguridad a tomar:

El etanol al 96% tiene un mayor nivel de alcohol, lo que lo hace potencialmente más cáustico y combustible. Al manipularlo, debe extremarse la precaución.

(Etanol | Asociación Española de Pediatría, 2024)

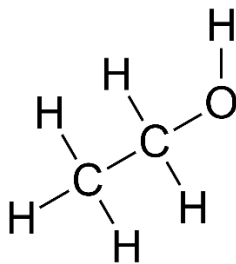


Ilustración 9 Estructura química del Etanol

Fuente: Del Estado De Hidalgo (2023)

2.13.3. Peróxido de hidrógeno

El H₂O₂ peróxido de hidrógeno es una sustancia química que puede utilizarse en diversas disciplinas, como la limpieza y la desinfección. Se utiliza para limpiar y desinfectar superficies en entornos domésticos, medicinales e industriales en el campo de la desinfección y la esterilización. Además, se administra en heridas como desinfectante y agente de prevención de infecciones a dosis menores [3%] (LUMITOS AG, 2024).

El peróxido de hidrógeno se utiliza en el sector alimentario para limpiar frutas, verduras y equipos de procesado de alimentos. Si se siguen ciertas normas, también puede ayudar a reducir la cantidad de residuos de pesticidas en los alimentos. Se utiliza en instalaciones de tratamiento de aguas para garantizar la potabilidad del agua y eliminar microorganismos patógenos, asegurando la potabilidad del agua. El peróxido de hidrógeno también se utiliza en el tratamiento de basuras y suelos, ayudando a descomponer los residuos orgánicos y a limpiar los suelos contaminados, así como en la desinfección del aire y del entorno mediante nebulizadores (Porto & Merino, 2021).

Es vital tener en cuenta que, aunque el peróxido de hidrógeno es un oxidante seguro y potente cuando se utiliza adecuadamente, siempre se deben seguir las recomendaciones específicas de la aplicación y tomar medidas preventivas para evitar consecuencias negativas. Además, la concentración utilizada y las particularidades de la aplicación pueden influir en el éxito de la misma (Amoquimicos, 2019).

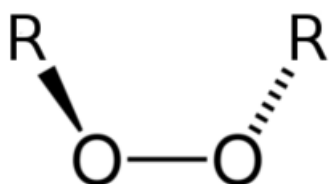


Ilustración 10 Estructura química del peróxido de hidrógeno

Fuente: (Porto & Merino, 2021).

2.13.4. Hipoclorito sódico

El hipoclorito de sodio, o NaClO, es un compuesto químico que se utiliza en la limpieza, el tratamiento del agua y la desinfección. Esta sustancia se utiliza en el ámbito de la desinfección y esterilización para limpiar y desinfectar superficies en entornos residenciales, comerciales e industriales. Los nebulizadores pueden desinfectar eficazmente los entornos que lo utilizan, contribuyendo al mantenimiento de las condiciones sanitarias (Juan, 2020).

El hipoclorito sódico es esencial para mantener altos niveles de limpieza en el sector alimentario mediante la desinfección de superficies y equipos. Para reducir la cantidad de gérmenes en frutas y verduras, también se utiliza para desinfectarlas. El hipoclorito sódico se utiliza en el sector sanitario para limpiar equipos e instrumentos médicos no críticos. Para ayudar a prevenir infecciones, también se utiliza para desinfectar superficies en hospitales e instalaciones sanitarias (Julieta, 2022).

El hipoclorito sódico es muy conocido en el hogar por su uso como blanqueador en detergentes para la ropa y desinfectante de objetos cotidianos como pomos de puertas y mesas. El hipoclorito sódico es un desinfectante vital en el tratamiento de piscinas que ayuda a mantener el agua libre de gérmenes nocivos y protege la salud y la seguridad de los bañistas. Aunque el hipoclorito sódico funciona bien como desinfectante, es importante tener precaución y seguir las recomendaciones para minimizar los riesgos para la salud y cualquier reacción negativa. Además, un almacenamiento adecuado y una gestión concienzuda de los residuos son componentes esenciales de su uso (Instituto Nacional De Estadística Y Censos, 2019).

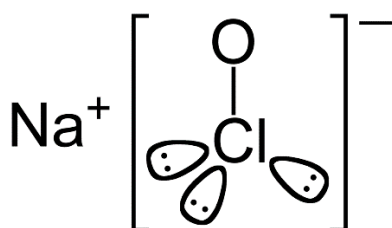


Ilustración 11 Estructura química del hipoclorito de sodio

Fuente: (Julieta, 2022).

2.13.5. Tween 20

El Tween 20, también denominado polisorbato 20, es un tensioactivo no iónico esencial para diversos usos industriales y científicos. Su cadena hidrófoba y su cabeza hidrófila le confieren sus cualidades emulsionantes y detergentes debido a su estructura química. El Tween 20 se utiliza ampliamente en Biología Molecular e investigación

científica para métodos como Western blotting, donde se emplea para bloquear membranas y soluciones de lavado con el fin de aumentar la sensibilidad y disminuir la unión inespecífica de anticuerpos. En pruebas inmunológicas, también actúa como diluyente de anticuerpos, favoreciendo una dispersión uniforme y mejorando el contacto con las sustancias (*Tween 20 - Acción Química*, 2023).

El Tween 20 se utiliza en procedimientos de cultivo celular y biotecnología para mejorar la manipulación y el procesamiento de células, dispersándolas en suspensiones. Además, estabiliza las emulsiones que se utilizan para producir productos biotecnológicos y vacunas, ayudando a aumentar la estabilidad de las formulaciones. El Tween 20 se utiliza en las industrias farmacéutica y cosmética para mejorar la solubilidad y estabilidad de algunos medicamentos, así como para mejorar la textura y dispersión de componentes en productos cosméticos y de cuidado personal (*Polysorbate 20*, 2023).

El Tween 20 es un emulsionante notable en la industria alimentaria, utilizado en la fabricación de alimentos, incluidos productos lácteos y productos horneados, para mejorar su textura y estabilidad. Su uso en bebidas también puede mejorar la difusión de aromas y aceites esenciales. Debido a su adaptabilidad y baja toxicidad, el Tween 20 es un componente muy valorado en una amplia gama de aplicaciones y se utiliza ampliamente tanto en el ámbito industrial como en el de la investigación (*Polisorbato 20 (Tween® 20) - TCKLeanLab*, 2023).

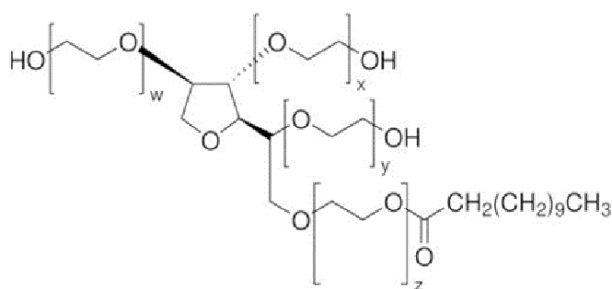


Ilustración 12 Estructura química del Tween 20

Fuente: (*Polisorbato 20 (Tween® 20) - TCKLeanLab*, 2023).

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1. Nivel de investigación

Se busca establecer el protocolo que mejor funcione para el cultivo *in vitro* para *Baccharis latifolia*, considerando el análisis de las variables independientes, las cuales son cuatro protocolos de desinfección y propagación, a su vez se observan los resultados y se caracterizan para definir la eficiencia en la propagación. Por lo tanto, es una investigación de tipo explicativa.

3.2. Diseño de la investigación

El diseño de investigación que ocupa el presente trabajo es experimental, la unidad experimental será de un tubo de ensayo con medio de cultivo en el cual se sembrará un explante, resultando en 90 explantes debido a que se van a emplear seis por cada protocolo y cada uno tendrá tres repeticiones, el tubo de ensayo tiene medio MS suplementado con sacarosa y diferentes concentraciones de hormonas en el cual se colocará una yema axilar que previamente pasó por los diferentes protocolos de desinfección.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Diseño de investigación documental:

- Análisis documental fichas computadora y sus unidades de almacenaje.
- Análisis de contenido, cuadro de registro y clasificación de las categorías.

Diseño de investigación de campo observacional:

- No estructurada: diario de campo cámaras, fotográfica y de video.

3.4. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Método estadístico, se utilizará el análisis de varianza ANOVA para analizar la variabilidad de los datos y determinar si existen diferencias significativas entre las medias de tres o más grupos o tratamientos, esto es evaluar las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas o si deben a la variabilidad inherente dentro de los grupos.

Método Tukey, se utilizará para realizar pruebas de comparaciones múltiples después de realizar el Anova cuando se hayan identificado diferencias significativas entre los grupos. Permite identificar qué pares de grupos específicos son significativamente diferentes entre sí.

3.5. Materiales

Cuando se trata de micropropagación *in vitro*, un sofisticado método para el crecimiento masivo de plantas en un entorno controlado de laboratorio, es crucial contar con aparatos precisos. Cuando se trabaja con materiales y medios de cultivo, el mechero es necesario para mantener la esterilidad, y las pinzas son necesarias para manipular con precisión los tejidos vegetales. Cuando se cortan y preparan explantes en rebanadas de tejido vegetal utilizadas como material de partida, el bisturí es una herramienta indispensable.

Cuando se elabora un medio de cultivo determinado, los vasos de precipitados de 100 mL y 250 mL son esenciales para crear un entorno nutricional favorable para el desarrollo de los explantes.

Los explantes pueden cultivarse y multiplicarse más fácilmente en los tubos de ensayo de 250 mL, lo que permite seguir su crecimiento.

Además, el autoclave, el film y el papel de aluminio son herramientas útiles para la micropropagación *in vitro*. El papel de aluminio y el film se utilizan para encapsular y

salvaguardar los cultivos de los explantes, creando un entorno cerrado y estéril. El autoclave se utiliza para esterilizar las herramientas y el medio de cultivo. Todo este equipo es necesario para realizar técnicas de micropropagación *in vitro* de forma fiable y eficiente, proporcionando condiciones reguladas y repetibles para el crecimiento y desarrollo de plantas en un entorno de laboratorio.

3.6. Reactivos

La micropropagación *in vitro* es un método sofisticado de multiplicación masiva de plantas en entornos de laboratorio cuidadosamente regulados, y requiere el uso de determinados productos químicos.

Las soluciones salinas se elaboran con cloruro sódico, que ayuda a mantener el equilibrio iónico necesario para el crecimiento de los tejidos vegetales. El pH del medio de cultivo se ajusta a los valores ideales para el desarrollo celular. El alcohol al 95% y al 70%, son esenciales para limpiar los instrumentos, los explantes y las superficies de trabajo, así como para mantener las condiciones de asepsia durante el cultivo.

El Tween 20 se añade a las soluciones para aumentar la solubilidad y dispersión de las sustancias, lo que facilita la aplicación uniforme de determinados ingredientes en el medio de cultivo. Las superficies de los explantes pueden limpiarse eficazmente con hipoclorito sódico antes de colocarlos en el medio de cultivo. El peróxido de oxígeno tiene usos particulares en la desinfección y puede aplicarse para reducir la contaminación microbiana.

El medio Murashige y Skoog, MS, es una formulación nutritiva vital que ofrece la base de nutrientes necesaria para el crecimiento y desarrollo de los explantes. En el medio de cultivo, la sacarosa sirve como fuente de carbono y energía, y las hormonas de crecimiento son necesarias para controlar el crecimiento y la diferenciación de los tejidos

vegetales, superficies y mantener las condiciones asépticas durante el proceso de micropropagación.

Por último, todos los medios y soluciones se preparan con agua destilada, lo que garantiza la calidad y pureza necesarias para mantener estéril la instalación de micropropagación *in vitro*. Cuando se combinan, estos productos químicos proporcionan un conjunto necesario para el establecimiento y mantenimiento de un entorno de laboratorio favorable a la micropropagación eficaz y eficiente de las plantas.

3.7. Recolección de la muestra

De acuerdo con Google Maps, la planta que mostró indicadores de tallo florido se encontró en las coordenadas -2.8781717, -79.0577909, que corresponden a San Miguel de Putushi. También, más de veinte días después de haber sido examinado para descartar enfermedad.

3.8. Protocolos de desinfección y siembra en el medio de cultivo

Existen muchos regímenes de desinfección, y la mayoría de ellos incluyen el uso de hipoclorito sódico en concentraciones y tiempos variables. También se utiliza etanol al 70% o al 96% junto con detergentes o tensioactivos como el Tween 20 (Mamani y colaboradores, 2022).

El medio de cultivo más utilizado para la plantación de yemas axilares es Murashige y Skoog 1962 en diversas concentraciones, junto con un agente gelificante como el agar. Además, se añaden fitorreguladores como el ácido indol-3-acético o el ácido giberélico, en función del objetivo del cultivo (Flores y colaboradores., 2017).

3.8.1. Estudios preliminares utilizando yemas axilares como explante

Para sentar las bases del diseño experimental [tratamientos] de los procedimientos de desinfección y establecimiento utilizados en la investigación, se realizaron experimentos preliminares. Para estos experimentos, los explantes fueron yemas axilares de *Baccharis latifolia* o chilca azul que se cosecharon frescas del campo. Estas investigaciones recibieron posteriormente la denominación T0 para el tratamiento de control.

El paso de preparación consistió en limpiar los recortes con jabón industrial y un cepillo antes del proceso de desinfección. De cada estaca se cosecharon segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud y con yemas axilares. A continuación, los segmentos se colocaron en frascos de vidrio con una solución antioxidante y se dejaron reposar durante cinco minutos. Los explantes se expusieron a continuación a dos técnicas de desinfección.

Tras la aplicación de cada desinfectante, se realizaron dos rondas de lavados con agua destilada estéril utilizando hipoclorito sódico, Tween 20 y alcohol.

Además, tras el último lavado, los explantes de la técnica A se sumergieron en una solución antioxidante antes de ser sembrados. No se aplicó antioxidante a los explantes de la técnica B.

3.8.2. Protocolo inicial de desinfección

Para eliminar toda la suciedad posible, los explantes se enjuagaron bajo agua corriente durante cinco minutos. A continuación, se agitaron durante quince minutos en una solución de detergente al 1%. Después de tres rondas de lavado en agua estéril los explantes se sumergieron en hipoclorito de sodio durante treinta minutos, añadiendo dos gotas de Tween-20 por cada 100 mililitros de solución. A continuación, se agitaron

durante un minuto en alcohol al 70%. A continuación, dentro de la cámara de flujo laminar que se había desinfectado previamente con alcohol al 90% y radiación UV durante 15 minutos-, los explantes se limpiaron tres veces con agua destilada estéril.

Para evitar cualquier fuente de contaminación, todos los elementos utilizados dentro de la cámara se esterilizaron minuciosamente en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi de presión. Durante el procedimiento de manipulación se utilizaron pinzas estériles (Freire Vasconez, 2013).

3.8.3. El segundo protocolo de desinfección

Este consistió en tratar los explantes durante tres minutos con etanol al 70%, sumergirlos en peróxido de hidrógeno al 3% durante tres minutos, se sumergió en detergente al 5% durante 10 min, se hicieron tres lavados con agua estéril y, a continuación, sumergirlos durante treinta minutos en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo del 2,4%. Los explantes se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril antes de dejarlos en remojo durante veinticuatro horas. Después, los explantes pasaron tres minutos en una campana de flujo laminar y treinta minutos en una solución de agua destilada estéril. Los explantes se sembraron bajo una campana de flujo laminar de aire (Zurita-Valencia, 2014).

3.8.4. Primer protocolo de propagación

En la primera técnica de micropropagación, los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con mezclas de BAP -1 mg L⁻¹- y ANA -0,1 mg L⁻¹- como tratamientos. El pH del medio se llevó a 5,6-5,7 antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Cada tubo de ensayo contenía un explante. A continuación, cada tubo de ensayo se sometió a un régimen fotoperiódico de 16:8 horas a 23 ± 1°C y 20 ± 1°C, respectivamente (Ebrahimzadeh y colaboradores 2021).

3.8.5. Segundo protocolo de propagación

Los explantes se colocaron en tubos de ensayo con el medio de cultivo de Murashige y Skoog, que se mejoró con 6-bencilaminopurina, BAP, y ácido giberélico, AG3, en esta técnica de micropropagación. Los cultivos se mantuvieron en circunstancias idénticas a las descritas durante la fase de establecimiento en las cuales el pH del medio se llevó a 5,6-5,7 antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 minutos a 121°C, cada tubo de ensayo se sometió a un régimen fotoperiódico de 16:8 horas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Para la multiplicación se empleó un diseño totalmente aleatorizado, empleando 0,01 mg L⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina, BAP (Corozo, 2020).

3.9. Tratamientos de estudio

Este estudio se centra en la gestión de la desinfección de los brotes, con especial atención a dos técnicas, A y B, destinadas a garantizar el éxito de la eliminación de patógenos y el mantenimiento de la calidad biológica a lo largo de este importante procedimiento. En el método A se combinan etanol al 70%, detergente al 1%, hipoclorito sódico al 10% y Tween 20, y se exponen durante un tiempo predeterminado. Sin embargo, el Método B ofrece una variante de desinfección que utiliza una mezcla de 70% de etanol, 5% de detergente, 3% de peróxido de hidrógeno, 10% de hipoclorito de sodio y Tween 20, con variaciones en los tiempos y concentraciones de aplicación. Ambos enfoques pretenden garantizar la eficacia de la desinfección en los brotes, haciendo hincapié en lo crucial que es elegir y aplicar correctamente los agentes desinfectantes para maximizar la salud de los brotes y asegurar el éxito de los procedimientos relacionados.

Tabla 4 Tratamientos para la fase de desinfección

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T0 (CONTROL)	Método A, B para desinfección en yemas.
T1 (MÉTODO A)	Etanol al 70% durante 1 minuto, detergente al 1% durante 15 minutos, hipoclorito sódico 10 % durante 1 minuto con Tween 20 durante 10 minutos.
T2 (MÉTODO B)	Etanol al 70 % por 3 minutos, detergente al 5% durante 10 minutos, agua oxigenada al 3% durante 3 minutos e hipoclorito sódico 10% con Tween 20 durante 30 minutos.

Fuente: Autora

En la tabla 5 se examina los diversos tratamientos hormonales al crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, así como al desarrollo de determinados procesos biológicos. Tres condiciones experimentales componen el estudio: el grupo control [T0], que no recibe ninguna aplicación hormonal; el grupo T1 [Medio 1], que recibe aplicaciones de BAP y AG3 con un pH ajustado entre 5,6 y 5,8; y, por último, el grupo T2 [Medio 2], que recibe aplicaciones de ANA y BAP con un pH mantenido también entre 5,6 y 5,8. Mediante el uso de un método experimental, queremos conocer mejor la forma en que las diferentes combinaciones y concentraciones de hormonas influyen en el crecimiento del tejido vegetal. Este conocimiento será útil para aplicaciones en agricultura y biotecnología vegetal.

Tabla 5 Tratamientos para la fase de establecimiento in vitro

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T0 (CONTROL)	Ninguna hormona
T1 (MEDIO 1)	BAP (1 mg. L ⁻¹) y AG3 (0,1 mg. L ⁻¹) pH 5,6-5,8
T2 (MEDIO 2)	ANA (1 mg. L ⁻¹) y BAP (0,01 mg L ⁻¹) pH 5,6 - 5,8

Fuente: Autora

En la Tabla 6 se muestra un diseño experimental totalmente aleatorizado, creado con la intención de examinar y evaluar los efectos de diversos tratamientos en una serie de pruebas. Con respecto a los niveles de repetición, se administran tratamientos distintos [T0, T1, T2, T3, T4] en cada fila de la tabla, que se designa con un número único. La gama de condiciones experimentales evaluadas se refleja en la varianza de las unidades de medida en cada tratamiento y duplicado.

Este enfoque ofrece un marco sólido para evaluar de forma objetiva y aleatoria el impacto de los tratamientos en las unidades de investigación, lo que permite una mayor aplicabilidad de los resultados. Al utilizar un diseño totalmente aleatorizado, esperamos obtener datos representativos y fiables que nos ayuden a comprender mejor las conexiones entre las respuestas y los tratamientos y a aumentar nuestra comprensión de la investigación experimental.

Tabla 6 Tabla de diseño completamente al azar

#Experimentos	Tratamiento	Replicas	Unidades
1	T0	1	0.1
2	T1	1	1.1
3	T2	1	2.1
4	T3	1	3.1
5	T4	1	4.1
6	T0	2	0.2
7	T1	2	1.2
8	T2	2	2.2
9	T3	2	3.2
10	T4	2	4.2
11	T0	3	0.3
12	T1	3	1.3
13	T2	3	2.3
14	T3	3	3.3
15	T4	3	4.3

Fuente: Autora

3.10. Porcentaje de contaminación

Las inspecciones frecuentes de los tratamientos desde el día de la plantación hasta 20 días después permitieron determinar el porcentaje de contaminación y distinguir si la contaminación estaba causada por bacterias u hongos. Para determinar el porcentaje de contaminación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%contaminación = \frac{\text{número de explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

3.11. Porcentaje de viabilidad

Contando los explantes que se desarrollaron con éxito desde el día de la siembra hasta 45 días después, se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\%viabilidad = \frac{\text{número de explantes viables}}{\text{total de explantes}} * 100 \quad (\text{Ec.2})$$

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Estudios preliminares

El objetivo principal de la investigación inicial sobre la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la planta *Baccharis latifolia* fue establecer una línea base que permitiera conocer claramente los parámetros para la evaluación y modificación de los protocolos de desinfección y la creación del medio de cultivo de establecimiento, que posteriormente se emplearon en el presente estudio. También permitieron elegir el tipo de trasplante más adecuado que debía emplearse.

En la tabla 7 se evalúa la calidad y la eficacia de los métodos utilizados, es preciso analizar la contaminación y el crecimiento en un entorno experimental. En la presente investigación, se constata que el grado de contaminación en cada una de las tres situaciones examinadas supera el 100%, lo que sugiere que la muestra analizada contenía elementos indeseables. El resultado de la viabilidad, en cambio, muestra una ausencia total de crecimiento, con un 0% en cada caso. Esta tendencia se mantiene en los tres escenarios evaluados. La viabilidad del crecimiento se sitúa en el 0% y la contaminación en el 100% en el conjunto del análisis, que incluye 18 observaciones.

Tabla 7 Tratamiento 0 Control

Contaminación	Crecimiento
$\%contaminación = \frac{6}{6} * 100$ $= 100\%$	$\%viabilidad = \frac{0}{6} * 100 = 0\%$
$\%contaminación = \frac{6}{6} * 100$ $= 100\%$	$\%viabilidad = \frac{0}{6} * 100 = 0\%$
$\%contaminación = \frac{6}{6} * 100$ $= 100\%$	$\%viabilidad = \frac{0}{6} * 100 = 0\%$
Total, de contaminación:	Total, de crecimiento:
$\%contaminación = \frac{18}{18} * 100$ $= 100\%$	$\%viabilidad = \frac{0}{18} * 100 = 0\%$

Fuente: Autora

La tabla 8 presenta los resultados de dos tratamientos específicos, el tratamiento 1 enfocado en la desinfección y el tratamiento 2 orientado al crecimiento *in vitro*, ambos implementando el Protocolo 1. La evaluación de la contaminación y el crecimiento en estas condiciones revela patrones significativos. En este protocolo 1 la desinfección demuestra una efectividad relativa con un 66,66% de contaminación y una viabilidad del 33,33%. Por otro lado, el total destinado al crecimiento *in vitro* muestra un mayor grado

de contaminación, alcanzando un 77,77%, mientras que la viabilidad de crecimiento se mantiene en un 22,22%. Estos resultados sugieren que, aunque se logra cierto control en la desinfección, persisten desafíos para mantener condiciones óptimas de crecimiento.

Tabla 8 Tratamiento 1 Desinfección y Tratamiento 2 Crecimiento *in vitro* (Protocolo 1)

Contaminación	Crecimiento
$\%contaminación = \frac{4}{6} * 100$ $= 66,66\%$	$\%viabilidad = \frac{2}{6} * 100 = 33,33\%$
$\%contaminación = \frac{5}{6} * 100$ $= 83,33\%$	$\%viabilidad = \frac{1}{6} * 100 = 16,66\%$
$\%contaminación = \frac{5}{6} * 100$ $= 83,33\%$	$\%viabilidad = \frac{1}{6} * 100 = 16,66\%$
Total, de contaminación:	Total, de crecimiento:
$\%contaminación = \frac{14}{18} * 100$ $= 77,77\%$	$\%viabilidad = \frac{4}{18} * 100 = 22,22\%$

Fuente: Autora

La Tabla 9 presenta los resultados de dos tratamientos distintos: el Tratamiento 2, enfocado en la desinfección, y el Tratamiento 1, orientado al crecimiento *in vitro*, ambos implementando el Protocolo 2. Este análisis exhaustivo de contaminación y crecimiento proporciona información valiosa sobre la eficacia de dichos tratamientos. En el Tratamiento 2, la desinfección muestra una notable reducción de la contaminación,

alcanzando un 33,33%, y una viabilidad de crecimiento del 66,66%. En contraste, el Tratamiento 1, dirigido al crecimiento *in vitro*, presenta una contaminación aún más reducida, con un 22,22%, y una impresionante viabilidad de crecimiento del 77,77%. Estos resultados sugieren que el Protocolo 2, con un enfoque más intensivo en la desinfección, ha logrado controlar efectivamente la contaminación, permitiendo condiciones más propicias para el crecimiento *in vitro*.

Tabla 9 Tratamiento 2 Desinfección y Tratamiento 1 Crecimiento *in vitro* (Protocolo 2)

Contaminación	Crecimiento
$\%contaminación = \frac{2}{6} * 100 = 33,33\%$	$\%viabilidad = \frac{4}{6} * 100 = 66,66\%$
$\%contaminación = \frac{1}{6} * 100 = 16,66\%$	$\%viabilidad = \frac{5}{6} * 100 = 83,33\%$
$\%contaminación = \frac{1}{6} * 100 = 16,66\%$	$\%viabilidad = \frac{5}{6} * 100 = 83,33\%$
Total, de contaminación:	Total, de crecimiento:
$\%contaminación = \frac{4}{18} * 100 = 22,22\%$	$\%viabilidad = \frac{14}{18} * 100 = 77,77\%$

Fuente: Autora

La Tabla 10 refleja los resultados de dos tratamientos distintos: el Tratamiento 1, centrado en la desinfección, y el Tratamiento 1, dedicado al crecimiento *in vitro*, ambos implementando el Protocolo 3. Esta evaluación detallada de contaminación y crecimiento proporciona información crucial sobre la eficacia de los tratamientos bajo este protocolo

específico. En el Tratamiento 1, la desinfección presenta una tasa de contaminación del 66,66% y una viabilidad de crecimiento del 33,33%. Por otro lado, el Tratamiento 1, orientado al crecimiento *in vitro*, logra una reducción significativa en la contaminación, alcanzando un 44,44%, y una mejora sustancial en la viabilidad de crecimiento del 55,55%. Estos resultados sugieren que el Protocolo 3, con un enfoque equilibrado entre desinfección y apoyo al crecimiento, ha demostrado ser efectivo en controlar la contaminación y proporcionar condiciones más propicias para el desarrollo *in vitro*.

Tabla 10 Tratamiento 1 Desinfección y Tratamiento 1 Crecimiento *in vitro* (Protocolo 3)

Contaminación	Crecimiento
$\%contaminación = \frac{4}{6} * 100$ $= 66,66\%$	$\%viabilidad = \frac{2}{6} * 100 = 33,33\%$
$\%contaminación = \frac{2}{6} * 100$ $= 33,33\%$	$\%viabilidad = \frac{4}{6} * 100 = 66,66\%$
$\%contaminación = \frac{2}{6} * 100$ $= 33,33\%$	$\%viabilidad = \frac{4}{6} * 100 = 66,66\%$
Total, de contaminación:	Total, de crecimiento:
$\%viabilidad = \frac{8}{18} * 100 = 44,44\%$	$\%viabilidad = \frac{10}{18} * 100 = 55,55\%$

Fuente: Autora

La Tabla 11 presenta los resultados de dos tratamientos distintos bajo el Protocolo 4: el Tratamiento 2, enfocado en la desinfección, y el Tratamiento 2, destinado al

crecimiento *in vitro*. Este análisis detallado de contaminación y crecimiento proporciona una visión integral de la efectividad de los tratamientos bajo este protocolo específico. En el Tratamiento 2 de desinfección, se observa una tasa de contaminación del 66,66% y una viabilidad de crecimiento del 33,33%. Por otro lado, en el Tratamiento 2 de crecimiento *in vitro*, se registra una disminución de la contaminación al 66,66%, pero con una mejora en la viabilidad de crecimiento al 33,33%. Estos resultados indican que el Protocolo 4, con un enfoque más intensivo en la desinfección, ha logrado un control relativamente eficiente de la contaminación, aunque a expensas de la viabilidad del crecimiento.

Tabla 11 Tratamiento 2 Desinfección y Tratamiento 2 Crecimiento *in vitro* (Protocolo 4)

Contaminación	Crecimiento
$\%contaminación = \frac{4}{6} * 100$ $= 66,66\%$	$\%viabilidad = \frac{2}{6} * 100 = 33,33\%$
$\%contaminación = \frac{3}{6} * 100$ $= 50,00\%$	$\%viabilidad = \frac{3}{6} * 100 = 50,00\%$
$\%contaminación = \frac{5}{6} * 100$ $= 83,33\%$	$\%viabilidad = \frac{1}{6} * 100 = 16,66\%$
Total, de contaminación:	Total, de crecimiento:
$\%contaminación = \frac{12}{18} * 100$ $= 66,66\%$	$\%viabilidad = \frac{6}{18} * 100 = 33,33\%$

Fuente: Autora

4.1.2. Interpretación

En la presente investigación, se analizaron los datos relativos a los métodos de crecimiento y los niveles de contaminación, evaluando las tasas de crecimiento y los niveles de contaminación en varios escenarios experimentales. Las estadísticas se muestran como porcentajes, siendo el 100% la mayor cantidad posible de contaminación y el 0% la ausencia total de crecimiento o contaminación.

El objetivo de esta interpretación es ofrecer una comprensión exhaustiva de la diversidad observada en los procedimientos, lo que permite una visión pertinente para futuros estudios y toma de decisiones. Se analizarán las tendencias, pautas y posibles ramificaciones de cada protocolo, haciendo hincapié en la importancia de estos descubrimientos en el contexto de la investigación científica.

4.1.3. Presentación de datos

Un método estadístico para evaluar si una muestra de datos procede de una población con una distribución normal es la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que muchos métodos estadísticos paramétricos suponen que los datos siguen una distribución normal, esta prueba es crucial para la estadística.

La hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal se examina mediante la prueba de Shapiro-Wilk. El valor p de la prueba indica si los datos proceden o no de una distribución normal si es mayor que el umbral de significación predeterminado, que suele ser 0,05. Esto indica que no hay pruebas suficientes de que los datos procedan de una distribución normal. Esto indica que no hay pruebas suficientes para rechazar la hipótesis nula. Por consiguiente, antes de realizar un análisis estadístico, conviene confirmar si los datos son normales mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

4.1.3.1. Test de normalidad de contaminación

Las hipótesis que se van a usar son:

- H0: existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.
- H1: no existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk arrojó un valor de $W = 0,8275$ y un valor p de $0,1614$ para los datos CT1. La hipótesis nula de normalidad no puede rechazarse porque no hay pruebas suficientes, ya que el valor p es superior a $0,05$. Esto implica que los datos de T1 pueden tener una distribución normal, lo que facilita la aplicación de varios estudios estadísticos que dependen de esta presunción.

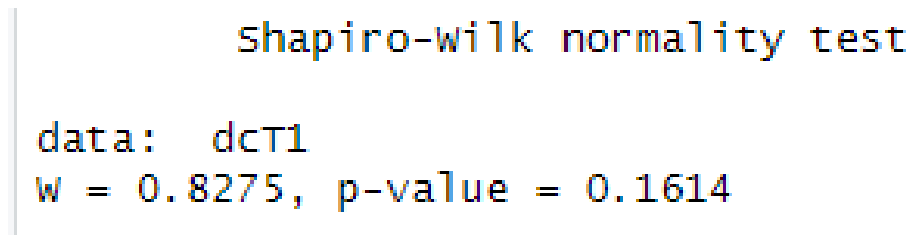


Figura 1 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 1 de contaminación

Fuente: Autora

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk arrojó un valor de $W = 0,8275$ y un valor p de $0,1614$ para los datos CT2. La hipótesis nula de normalidad no puede rechazarse porque no hay pruebas suficientes, ya que el valor p es superior a $0,05$. Esto implica que los datos CT2 pueden tener una distribución normal, lo que facilita la aplicación de varios estudios estadísticos que dependen de esta presunción.

```
shapiro-wilk normality test
data:  dcT2
w = 0.8275, p-value = 0.1614
```

Figura 2 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 2 de contaminación

Fuente: Autora

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk arroja un valor de $W = 0,82743$ y un valor p de $0,1612$ para los datos CT3. La hipótesis nula de normalidad no puede rechazarse porque no hay pruebas suficientes, ya que el valor p es superior a $0,05$. Esto implica que la distribución de los datos CT3 es normal, lo que es relevante para varios estudios estadísticos que presuponen esta distribución.

```
shapiro-wilk normality test
data:  dcT3
w = 0.82743, p-value = 0.1612
```

Figura 3 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 3 de contaminación

Fuente: Autora

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk arroja un valor de $W = 0,94466$ y un valor p de $0,683$ para los datos dcT4. La hipótesis nula de normalidad no puede rechazarse porque no hay pruebas suficientes, ya que el valor p es superior a $0,05$. Esto implica que la distribución de los datos CT4 es normal. Esto implica que la distribución de los datos CT4 puede ser normal, lo que es relevante para varios estudios estadísticos que necesitan esta hipótesis.

shapiro-wilk normality test

```
data: dCT4  
W = 0.94466, p-value = 0.683
```

Figura 4 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 4 de contaminación

Fuente: Autora

4.1.3.2. Test de normalidad de crecimiento

Las hipótesis que se van a usar son:

- H0: existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.
- H1: no existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.

El resultado de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos dcreT1 muestra un valor de $W = 0.73484$ y un valor $p = 0.02141$. Dado que el valor p es menor que 0.05 , hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Esto sugiere que los datos dcreT1 no siguen una distribución normal y puede ser necesario considerar métodos estadísticos alternativos que no requieran esta suposición.

shapiro-wilk normality test

```
data: dcreT1  
W = 0.73484, p-value = 0.02141
```

Figura 5 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 1 de crecimiento

Fuente: Autora

El resultado de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos dcreT2 muestra un valor de $W = 0.8275$ y un valor $p = 0.1614$. Dado que el valor p es mayor que

0.05, no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Esto sugiere que los datos dcreT2 podrían seguir una distribución normal, lo que es importante para ciertos análisis estadísticos que requieren esta suposición.

```
shapiro-wilk normality test
data: dcreT2
W = 0.8275, p-value = 0.1614
```

Figura 6 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 2 de crecimiento

Fuente: Autora

El resultado de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos dcreT3 muestra un valor de $W = 0.82743$ y un valor $p = 0.1612$. Dado que el valor p es mayor que 0.05, no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Esto sugiere que los datos dcreT3 podrían seguir una distribución normal, lo cual es importante para ciertos análisis estadísticos que asumen esta distribución.

```
shapiro-wilk normality test
data: dcreT3
W = 0.82743, p-value = 0.1612
```

Figura 7 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 3 de crecimiento

Fuente: Autora

El resultado de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos dcreT4 muestra un valor de $W = 0.94466$ y un valor $p = 0.683$. Dado que el valor p es mayor que 0.05, no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Esto

sugiere que los datos dcreT4 podrían seguir una distribución normal, lo que es importante para ciertos análisis estadísticos que requieren esta suposición.

```
shapiro-wilk normality test
data: dcreT4
W = 0.94466, p-value = 0.683
```

Figura 8 Prueba de normalidad con Shapiro- Wilk protocolo 4 de crecimiento

Fuente: Autora

4.1.3.3. Test análisis de varianza (Anova)

Para comparar las medias de tres o más grupos y ver si existen diferencias significativas entre ellos se utiliza un método estadístico denominado análisis de la varianza. El ANOVA permite determinar si al menos un grupo varía con respecto a los demás en cuanto a la variable medida, a diferencia de utilizar múltiples pruebas t para comparar pares de grupos.

El ANOVA separa la variabilidad global de los datos en dos partes: la variabilidad dentro del grupo y la variabilidad entre grupos. Posteriormente, la variabilidad dentro del grupo y la variabilidad entre grupos se comparan para determinar la significación estadística de las diferencias medias observadas.

El ANOVA se presenta en diversas formas; por ejemplo, el ANOVA unidireccional, que compara un componente, y el ANOVA factorial, que analiza dos o más factores a la vez. En la investigación científica y experimental, este método se emplea con frecuencia para examinar la importancia de las variaciones entre distintos grupos.

- H0: no existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.

- H1: existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de las yemas.

La suma de cuadrados de la variable "contaminación" es de 323,954 y tiene tres grados de libertad, según el informe ANOVA. Hay 12 grados de libertad residuales y una suma de cuadrados residual de 8626,485. el valor p vinculado al factor "contaminación" es 0,928. Este elevado valor p sugiere que la hipótesis nula (que la contaminación no tiene un impacto perceptible en los resultados) no puede rechazarse por falta de pruebas. Dicho de otro modo, no se observaron variaciones perceptibles en los resultados entre los distintos grados de contaminación evaluados durante la investigación.

```

Terms:
                contaminación Residuals
Sum of Squares      323.954  8626.485
Deg. of Freedom         3      12

Residual standard error: 26.81182
Estimated effects may be unbalanced

```

Figura 9 Test anova del protocolo de contaminación

Fuente: Autora

```

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
contaminación  3     324   108.0    0.15  0.928
Residuals     12    8626   718.9
> |

```

Figura 10 Test anova del protocolo de contaminación

Fuente: Autora

Los resultados del análisis de la varianza ANOVA utilizado para evaluar cómo afectaba el factor de crecimiento a los resultados de la variable de respuesta muestran que no hay datos suficientes para rechazar la hipótesis nula, que afirma que no hay diferencias significativas entre las medias de los niveles de crecimiento $p = 0,928$. Esto implica que

no existe una relación estadísticamente significativa entre el factor de crecimiento y la variable de resultado. Los datos arrojan una suma de cuadrados de 8626,401 para los residuos y 324,093 para el término de crecimiento, con tres y doce grados de libertad, respectivamente. El valor F de 0,15 corrobora la falta de importancia del factor de crecimiento. Además, 26,81169 es el error típico residual.

```
Call:
  aov(formula = resultados ~ crecimiento, data = datos)

Terms:
      crecimiento Residuals
Sum of Squares    324.093  8626.401
Deg. of Freedom      3      12

Residual standard error: 26.81169
Estimated effects may be unbalanced
```

Figura 11 Test anova del protocolo de crecimiento

Fuente: Autora

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
crecimiento	3	324	108.0	0.15	0.928
Residuals	12	8626	718.9		

Figura 12 Test anova del protocolo de crecimiento

Fuente: Autora

4.1.3.4. Método de Tukey-Kramer

Tras realizar un análisis de la varianza ANOVA, en el análisis estadístico se llevan a cabo comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey, a veces denominada técnica de Tukey-Kramer. Su objetivo principal es encontrar variaciones significativas entre las medias de distintos grupos. La prueba de Tukey ayuda a identificar qué emparejamientos concretos de grupos muestran diferencias significativas entre sus medias una vez que se realiza un ANOVA y se encuentra al menos una diferencia significativa.

Una de las principales características de la prueba de Tukey es su capacidad para tratar el problema de la inflación del error de tipo I que se produce en muchas comparaciones. La prueba modifica los intervalos de confianza para las diferencias de medias con el fin de controlar la tasa de error total en el nivel adecuado.

La prueba de Tukey no sólo proporciona valores p , sino también intervalos de confianza para las diferencias de medias. Esto ofrece más detalles sobre el alcance de los cambios observados, además de ayudar en la estimación precisa del tamaño del impacto.

La tabla muestra los intervalos de confianza y los valores p corregidos junto con las diferencias de medias de los cuatro niveles de la variable categórica "contaminación" T1, T2, T3 y T4. La explicación de cada comparación es la siguiente:

- T2-T1: la diferencia entre la media de T2 y T1 es -12.4975, con un intervalo de confianza que va desde -68.78436 hasta 43.78936. El valor p ajustado es 0.9102847, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- T3-T1: la diferencia entre la media de T3 y T1 es -4.1650, con un intervalo de confianza desde -60.45186 hasta 52.12186. El valor p ajustado es 0.9960494, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- T4-T1: la diferencia entre la media de T4 y T1 es -5.5550, con un intervalo de confianza desde -61.84186 hasta 50.73186. El valor p ajustado es 0.9907891, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- T3-T2: la diferencia entre la media de T3 y T2 es 8.3325, con un intervalo de confianza desde -47.95436 hasta 64.61936. Aunque el intervalo incluye

cero, el valor p ajustado es 0.9704024, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.

- T4-T2: la diferencia entre la media de T4 y T2 es 6.9425, con un intervalo de confianza desde -49.34436 hasta 63.22936. El valor p ajustado es 0.9824141, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- T4-T3: la diferencia entre la media de T4 y T3 es -1.3900, con un intervalo de confianza desde -57.67686 hasta 54.89686. El valor p ajustado es 0.9998502, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.

En conclusión, dado que los valores p corregidos son elevados en todos los casos, estas comparaciones múltiples no revelaron diferencias significativas entre las medias de los distintos niveles de contaminación. Según estos resultados, no hay suficiente apoyo estadístico para afirmar que las medias de las variables de resultado varíen entre los niveles de contaminación considerados.

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = resultados ~ contaminación, data = datos)

$contaminación
      diff      lwr      upr    p adj
T2-T1 -12.4975 -68.78436 43.78936 0.9102847
T3-T1  -4.1650 -60.45186 52.12186 0.9960494
T4-T1  -5.5550 -61.84186 50.73186 0.9907891
T3-T2   8.3325 -47.95436 64.61936 0.9704024
T4-T2   6.9425 -49.34436 63.22936 0.9824141
T4-T3  -1.3900 -57.67686 54.89686 0.9998502
```

Figura 13 Test de Tukey contaminación

Fuente: Autora

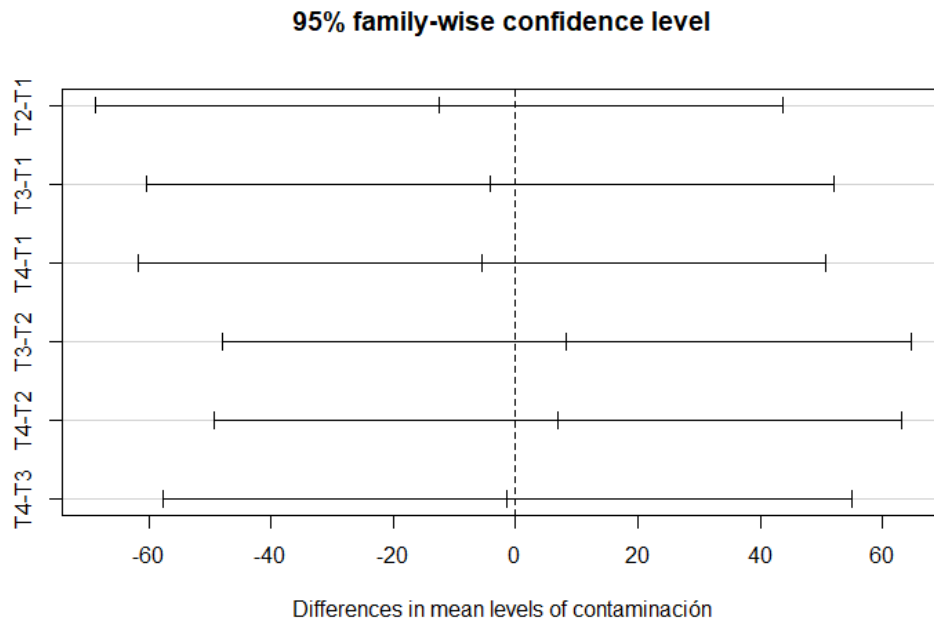


Figura 14 Test de Tukey

Fuente: Autora

Una vez realizado en los datos un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la fórmula "resultados ~ crecimiento", estos resultados equivalen a un análisis de comparaciones múltiples de medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

La tabla muestra los valores p corregidos, los intervalos de confianza y las diferencias de medias de los cuatro niveles de la variable categórica "crecimiento" P1, P2, P3 y P4. La explicación de cada comparación es la siguiente:

- P2-P1: la diferencia entre la media de P2 y P1 es 12.500, con un intervalo de confianza que va desde -43.78659 hasta 68.78659. El valor p ajustado es 0.9102365, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- P3-P1: la diferencia entre la media de P3 y P1 es 4.165, con un intervalo de confianza desde -52.12159 hasta 60.45159. El valor p ajustado es

0.9960494, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.

- P4-P1: la diferencia entre la media de P4 y P1 es 5.555, con un intervalo de confianza desde -50.73159 hasta 61.84159. El valor p ajustado es 0.9907890, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- P3-P2: la diferencia entre la media de P3 y P2 es -8.335, con un intervalo de confianza desde -64.62159 hasta 47.95159. Aunque el intervalo incluye cero, el valor p ajustado es 0.9703769, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- P4-P2: la diferencia entre la media de P4 y P2 es -6.945, con un intervalo de confianza desde -63.23159 hasta 49.34159. El valor p ajustado es 0.9823956, indicando que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.
- P4-P3: la diferencia entre la media de P4 y P3 es 1.390, con un intervalo de confianza desde -54.89659 hasta 57.67659. El valor p ajustado es 0.9998502, sugiriendo que no hay una diferencia significativa entre estas dos medias.

Como los valores p corregidos son altos en todos los casos, se puede concluir que no hubo diferencias significativas entre las medias de los distintos niveles de crecimiento sobre la base de estas comparaciones múltiples. Según estos resultados, no hay suficiente apoyo estadístico para afirmar que las medias de las variables de resultado varían entre los niveles de crecimiento considerados.

```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = resultados ~ crecimiento, data = datos)

$crecimiento
      diff      lwr      upr    p adj
P2-P1 12.500 -43.78659 68.78659 0.9102365
P3-P1  4.165 -52.12159 60.45159 0.9960494
P4-P1  5.555 -50.73159 61.84159 0.9907890
P3-P2 -8.335 -64.62159 47.95159 0.9703769
P4-P2 -6.945 -63.23159 49.34159 0.9823956
P4-P3  1.390 -54.89659 57.67659 0.9998502

```

Figura 15 Test de Tukey crecimiento

Fuente: Autora

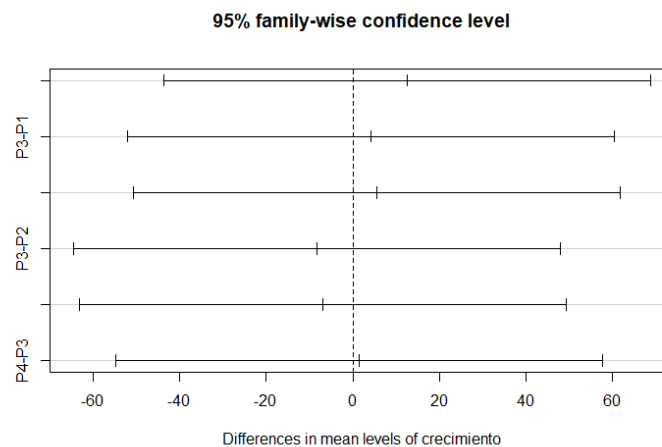


Figura 16 Test de Tukey

Fuente: Autora

4.1.3.5. Gráfico de barras

Un gráfico de barras es un tipo de representación visual que utiliza barras rectangulares de longitudes proporcionales para comparar datos entre diferentes categorías. En un gráfico de barras, el eje horizontal suele representar las categorías o grupos, mientras que el eje vertical muestra la magnitud de la variable que se está representando. Este tipo de gráfico es útil para visualizar y comparar rápidamente diferentes valores o cantidades asociadas a cada categoría.

Este tipo de gráfico es útil para comparar de manera visual cómo varía el crecimiento en función de los diferentes protocolos y repeticiones. Al representar los datos de esta manera, se facilita la interpretación y el análisis de las diferencias en el crecimiento entre los distintos protocolos evaluados.

Se presentan datos sobre contaminación para diferentes protocolos y repeticiones, cada una muestra el porcentaje de contaminación correspondiente a cada protocolo y repetición.

- Por ejemplo, para el Protocolo 0, se observa que la contaminación se mantiene constante en un 100% en todas las repeticiones.
- En el caso del Protocolo 1, la contaminación varía entre un mínimo de 66,66% y un máximo de 83,33% a lo largo de las repeticiones.
- Para el Protocolo 2, la contaminación disminuye significativamente de un 33,33% en la primera repetición a un 16,66% en las siguientes repeticiones.

Los datos muestran cómo varía el nivel de contaminación en función de los diferentes protocolos y repeticiones realizadas, lo que puede ser útil para analizar y comparar la eficacia de cada protocolo en la reducción de la contaminación.

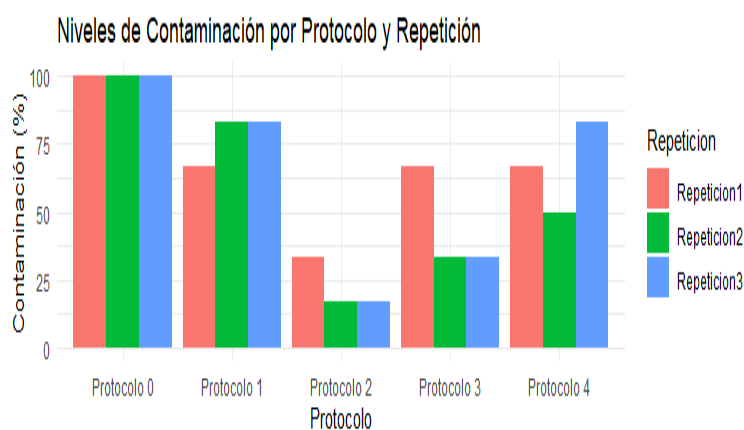


Figura 17 Diagrama de barras, niveles de contaminación

Fuente: Autora

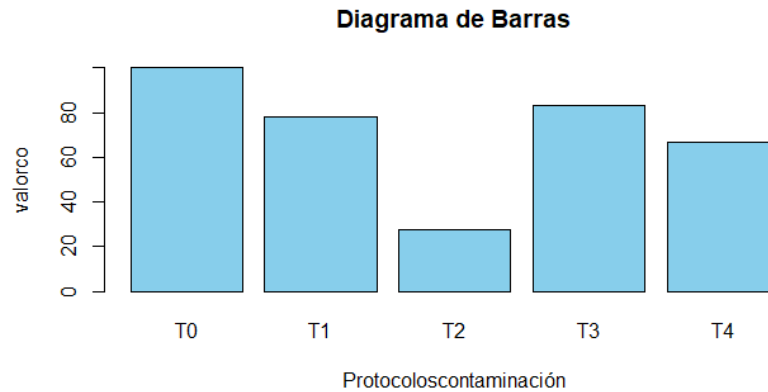


Figura 18 Diagrama de barras porcentaje total de contaminación

Fuente: Autora

Se presentan datos de crecimiento para diferentes protocolos en distintas repeticiones. Cada celda muestra el porcentaje de crecimiento correspondiente a cada protocolo y repetición.

- Por ejemplo, para el Protocolo 0, no se observa crecimiento ya que todos los valores son 0 en todas las repeticiones.
- En el caso del Protocolo 1, se muestra un crecimiento que varía entre un mínimo de 16,66% y un máximo de 33,33% en las diferentes repeticiones.
- Para el Protocolo 2, se observa un crecimiento significativo que oscila entre un mínimo de 66,66% y un máximo de 83,33% en las distintas repeticiones.

En resumen, los datos proporcionados muestran cómo varía el crecimiento en función de los diferentes protocolos y repeticiones, lo que puede ser útil para analizar y comparar la eficacia de cada protocolo en el crecimiento observado.

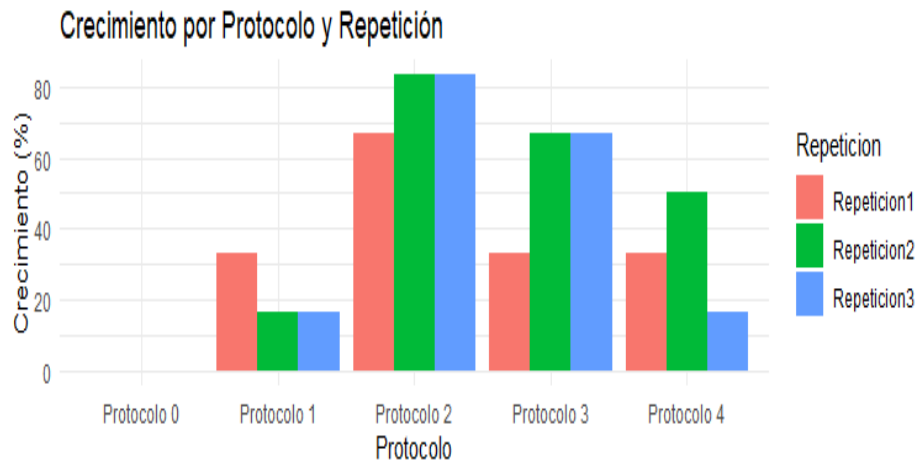


Figura 19 Diagrama de barras, niveles de crecimiento

Fuente: Autora

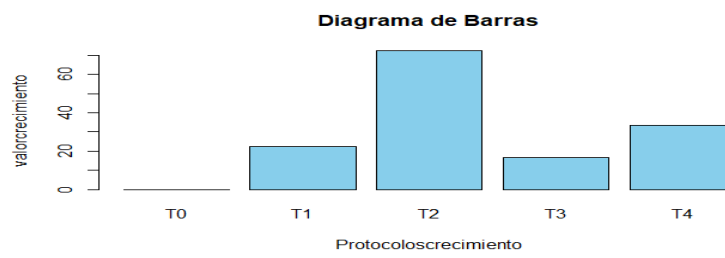


Figura 20 Diagrama de barras porcentaje total de crecimiento

Fuente: Autora



Ilustración 13 Yema axilar en el medio, primer día

Fuente: Autora



Ilustración 14 Yema axilar, primera semana

Fuente: Autora



Ilustración 15 Yema axilar tercera semana

Fuente: Autor



Ilustración 16 Yema axilar al segundo mes

Fuente: Autora

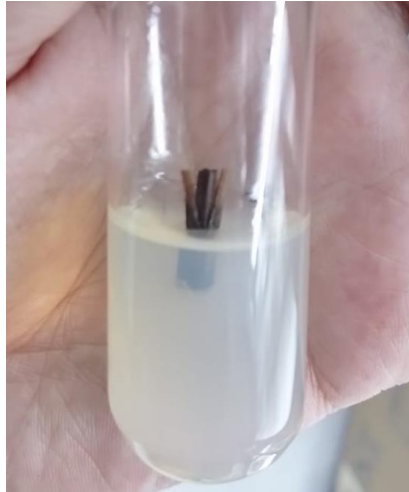


Ilustración 17 Yema axilar al segundo mes y medio

Fuente: Autora



Ilustración 18 Yema axilar al tercer mes

Fuente: Autora



Ilustración 19 Protocolo número 2

Fuente: Autora

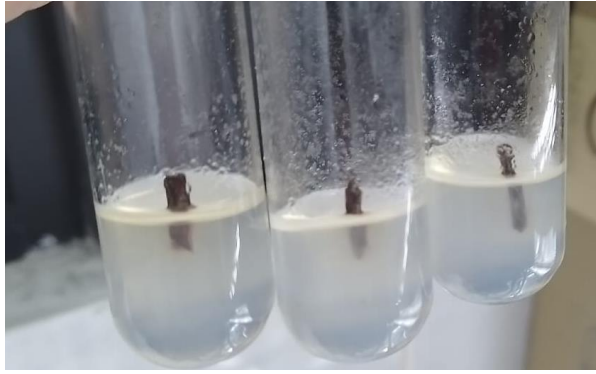


Ilustración 20 Medio sin contaminación

Fuente: Autora

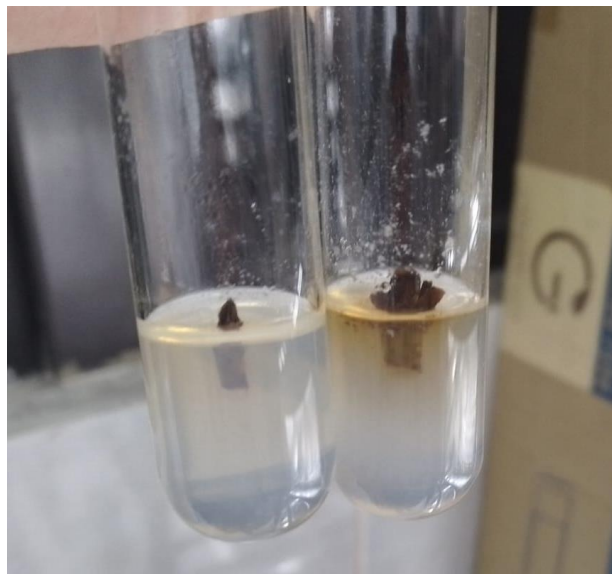


Ilustración 21 Comparación de medios con y sin contaminación

Fuente: Autora

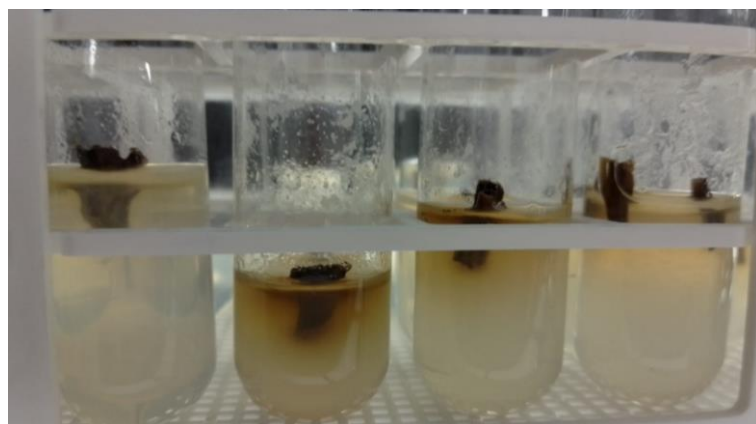


Ilustración 22 Medios contaminados a la primera semana

Fuente: Autora



Ilustración 23 Medios contaminados al mes

Fuente: Autora

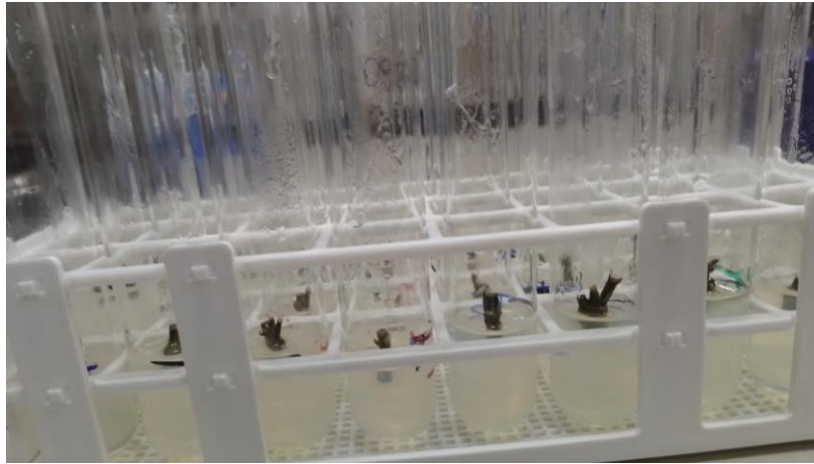


Ilustración 24 Medios sin contaminación del protocolo número 2

Fuente: Autora

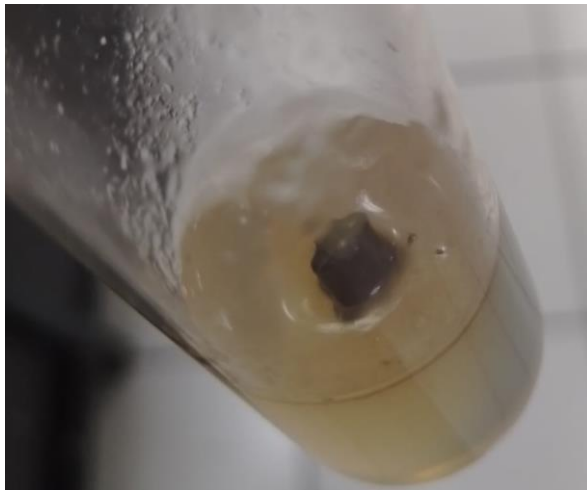


Ilustración 25 Sustancia viscosa al momento de cortar la yema axilar

Fuente: Autora

4.2. Discusión

Debido a la baja información que hay sobre los protocolos de desinfección y propagación sobre la especie *Baccharis latifolia*, el trabajo presente se tuvo que basar en protocolos de diferentes especies vegetales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con el método propagación usando los reguladores hormonales "BAP -1 mg. L⁻¹- y AG3 -0,1 mg. L⁻¹ pH 5,6-5,8" del trabajo de titulación de Guamán Carrasco (2018) y con el protocolo de desinfección "Etanol al 70 % por 3 minutos, detergente al 5% durante 10 minutos, agua oxigenada al 3% durante 3 minutos e hipoclorito sódico 10% con Tween 20 durante 30 minutos" del trabajo de titulación de Medina y Rodríguez (2018).

El método de propagación de "ANA (1 mg. L⁻¹) y BAP (0,01 mg L⁻¹) pH 5,6 - 5,8" del trabajo de titulación de Ebrahimzadeh y colaboradores (2021) no dieron el resultado esperado en el crecimiento de la especie vegetal *Baccharis latifolia* y usando el método de desinfección "Etanol al 70% durante 1 minuto, detergente al 1% durante 15 minutos, hipoclorito sódico 10 % durante 1 minuto con Tween 20 durante 10 minutos" basado en el trabajo de titulación de Zurita-Valencia (2014) la especie vegetal se llegó a contaminar debido a que este método no pudo suprimir la sustancia viscosa que la especie vegetal produce.

Una diferencia notoria que hubo, fue que, al momento de aplicar los protocolos de desinfección, había zonas quemadas por el peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio y se debía cortar la yema axilar y esta especie bota una sustancia viscosa que, si no se la trata, esta puede llegar a contaminar por completo el medio de cultivo. Esto se puede ver en la ilustración 25.

Una medida que se puede usar respecto a los protocolos de desinfección es que después del corte volver hacer un lavado con detergente y agua destilada, para así eliminar toda sustancia que pueda llegar hacer un contaminante. Respecto a la propagación se debería implementar un porcentaje más alto de la hormona o intentar una diferente a la ya usada.

La limitación en los protocolos de propagación fue que la especie tarda en crecer de 5 a 6 meses y por la limitación del tiempo del trabajo, se obtuvo el crecimiento hasta el tercer mes, esto que puede observar en las ilustraciones 13,14,15,16,17,18.

Capítulo 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El segundo protocolo resultó ser el más exitoso, lo que constituye un resultado importante de los datos adicionales. Con una tasa de crecimiento *in vitro* del 77,77%, esta técnica demostró una tasa de contaminación del 22,22%. Este hallazgo consolida el estatus del segundo protocolo como la técnica más importante y viable dentro de los parámetros de esta investigación, destacando su eficacia e importancia práctica.

Combinados, los análisis estadísticos reforzados por los datos adicionales ofrecen una perspectiva exhaustiva e imparcial sobre la eficacia de las prácticas de cultivo consideradas. La selección de la segunda técnica como la más ventajosa tiene importantes consecuencias prácticas, y estos resultados amplían nuestra comprensión de los mecanismos que influyen en la contaminación y el desarrollo *in vitro*.

Es crucial tener en cuenta las limitaciones del estudio y ofrecer oportunidades para futuras investigaciones que puedan examinar temas más especializados o incluir otros factores con el fin de profundizar en nuestra comprensión de estos procesos biológicos.

5.2. Recomendaciones

Uno de los principales problemas fue la manipulación de la yema axilar al cortar las zonas quemadas por el peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio. Esto se debe a que al cortar la yema se libera una sustancia viscosa que puede contaminar el medio de cultivo si no se limpia de nuevo con detergente.

Se requeriría de mayor tiempo en la cámara de crecimiento para poder observar un mayor desarrollo del experimento realizado.

6. REFERENCAS

Abdelnour, A., & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). *Revista Forestal Kurú* (Costa Rica), 2(5)

Alejandro, M. O. D. (2016). Riqueza y composición florística del ecotono altoandino en las micro-cuencas Angas y Machángara, Macizo del Cajas- Ecuador. <https://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/5724>

ALVAREZ ACUÑA, J. A. (2021). Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de rosa chinensis [tesis]. universidad politécnica salesiana.

Amoquimicos. (2019). <https://www.amoquimicos.com/noticias/usos-del-peroxido-de-hidrogeno-en-agricultura>

Andrade, A. A. (2021). Vista de evaluación de medios de cultivo para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de mora (*Rubus glaucus* Benth.). Scielo. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/5229/4931>

Ante, D. A. O. (2020). Enfoque de la Biotecnología Industrial en Ecuador y la Provincia de Esmeraldas. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?Codigo=7554325>

Asas, C. (2021). El lactosuero: impacto ambiental, usos y aplicaciones vía mecanismos de la biotecnología. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?Codigo=8085141>

Allinger (1984) *Química Orgánica*. Editorial Reverte. Segunda Edición. Barcelona, España. Págs. 1051. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?Id=0hlx1i8uq5sc&pg=PA1051&dq=estructura+de+los+terpenos&hl=es419&sa=X&ei=jigvvyihoyrtqxj7ihwcq&ved=0CC0Q6AEwAw#v=onepage&q=estructura%20de%20los%20terpenos&f=true>

Avalos A (2009) *Metabolismos Secundario de Plantas*. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Biología Vegetal. Madrid, España. Disponible en: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

Cuatrecasas (1967) *Revisión de las especies colombianas del género Baccharis*. Responsable: José Cuatrecasas. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Disponible en: http://www.accefyn.org.co/revista/Volumen_13/49/5-102.pdf

Chilca (*Baccharis latifolia*). (2020). Inaturalist Ecuador. <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/534316-Baccharis-latifolia>

CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas). (1992). Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito: FEPP

Corozo, L. (2020, October 27). Vista de MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIETADES ECUATORIANAS DE YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ). Scielo. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/2985/3069>

Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., Esquerre-Ibáñez, B., Silva, F. Z., Bazán-Sernaqué, P., & Rojas-Idrogo, C. (2023). Germinación de semillas, micropropagación y conservación de germoplasma in vitro de *Cedrela odorata* (Meliaceae) en el norte del Perú. *Bosque*, 44(1), 97–109. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002023000100097>

Digilio, P. (2021). Biotecnología, desarrollo y neoliberalismo. *Erasmus. Revista para el diálogo intercultural*, 23. <https://www.icala.org.ar/erasmus/Archivo/2021/erasmus-23-2021-Digilio.pdf>

Ebrahimzadeh, A., Fathollahzadeh, M., Hassanpouraghdam, M. B., & Mavaloo, M. A. (2021). Micropropagation of *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her. Through petioles and leaves. *Revista De La Facultad De Agronomia De La Universidad Del Zulia*. [https://doi.org/10.47280/revfacagron\(luz\).v38.n2.03](https://doi.org/10.47280/revfacagron(luz).v38.n2.03)

Enriquez, P. J., Aguilar, P. B., Espín, L. E. H., Zambrano, A. V., & Vargas, C. C. (2020). Propagación in vitro de Quishuar (*buddleja incana* ruíz&pav). *La Granja: Revista De Ciencias De La Vida*, 31(1), 61–71. <https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>

Escamilla-Hernández, N., Aldrete, A., Vargas-Hernández, J. J., & López-López, M. Á. (2020). propagación vegetativa de *pinus patula* schiede ex schlt. et cham. en diferentes sustratos. *revista fitotecnia mexicana*, 43(2), 215. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.2.215>

Etanol | Asociación Española de Pediatría. (2024). <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/etanol>

Freire Vasconez, P. (2013). Establecimiento de suspensiones celulares de chenopodium ambrosioides para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (tdz) [tesis]. escuela politécnica del ejército.

Guamán Carrasco, D. J. G. (2018). *Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) a partir de meristemos axilares* [Trabajo de Titulación, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27506/1/BQ%20147.pdf>

Homero, V. L. J. (2012). Rescate de plantas en peligro de extinción del sector de la laguna de Pisayambo – Aucacocha del Parque Nacional Llanganates, para su preservación en el banco de germoplasma del jardín botánico Atocha La Liria. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3062>

HVAA Collection search Parameters. (2000, January 9). Herbario Virtual Austral Americano. <https://herbariovaa.org/collections/list.php?Usethes=1&taxa=18474>

Herbario Azuay - Universidad del Azuay. (2023). Herbario Azuay - Universidad Del Azuay. <https://herbario.uazuay.edu.ec/muestras/574-dicotiledonae-asteraceae-baccharis-latifolia-ruiz-pav-pers>

Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental (2015) Compositae “Asterácea”. Universidad de Valencia. <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2076.html>

Indacochea, B. V. Á., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M. A., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>

Instituto de Botánica Darwinion. (2020). <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/floraargentina/detalleespecie.asp?Forma=&variedad=&subespecie=&especie=salicifolia&genero=Baccharis&espcod=16257>

Instituto Nacional De Estadística Y Censos. (2019). Sistema integrado de consultas de clasificaciones y nomenclaturas. https://aplicaciones2.ecuadorencifras.gob.ec/SIN/co_quimico.php?Id=34240.02.03

Jacome, A. (2011). Micropropagación in vitro de la especie endémica: jiguaron (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción. escuela politécnica del ejército.

Joseph, C. R. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba” Swietenia macrophylla King (Meliaceae). www.scielo.org.pe. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>

Judge, C. E., & Hickey, E. (2019). Microbial signalling of Rhizobium bacteria as a method for cereal crop germination enhancement. *Biorxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/788125>

Juan. (2020). Hipoclorito de Sodio – Quimpac. <https://www.quimpac.com.ec/hipoclorito-de-sodio/>

Julieta. (2022, January 19). Hipoclorito de sodio como agente desinfectante. *BIOSEGURIDAD Y BIOCUSTODIA*. <https://seguridadbiologica.blogspot.com/2016/07/hipoclorito-de-sodio-como-agente.html>

Leonor, A. G. M. (2011). Uso del sistema de riego Machángara. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/1968>

López, J. L. P. (2019). Propagación de plantas de cacao mediante injertos. *Kuxulkab'*, 25(51), 33–40. <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a25n51.2923>

Lopez, J. J. L. Z. (2011). Caracterización ecosistémica de la cuenca media del río Paute, con fines de restauración ecológica [Tesis]. Universidad del Azuay.

LUMITOS AG. (2024). Peróxido. *Química*. Es. <https://www.quimica.es/enciclopedia/Per%C3%b3xido.html>

Marino, C. Et al. (2003). Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. Et

Marine Species Traits - *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (2023). <https://marinespecies.org/traits/aphia.php?P=taxdetails&id=1111251#images>

Martínez, C. E. C. (2021). Flora del río Chiquicahua, volcán Carihuayrazo, Tungurahua – Ecuador. <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CINCHONIA/article/view/3748>

Medina, F. M., & Rodríguez, H. O. L. (2018). Establishment of an in vitro micropropagation protocol for *Cantua volcánica* (Polemoniaceae): a potential ornamental plant of Peru. *Idesia*, ahead, 0. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292018005000501>

MORALES MIS, E. D. J., [Morales]. (2011). Propagación in vitro de *bletia purpurea lam* para la producción de semillas sintéticas. [tesis]. centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de jalisco, a.c.

Porto, J. P., & Merino, M. (2021, September 29). Peróxido - Qué es, características, definición y concepto. *Definición.de*. <https://definicion.de/peroxido/>

Polysorbate 20. (2023). <https://www.lesielle.com/int/en/polysorbate-20-in-skincare-what-is-inc-1340>

Polisorbato 20 (Tween® 20) - tckleanlab. (2023, May 3). Tckleanlab. <https://www.tckleanlab.com/polisorbato-20-tween-20/>

Renneberg, R. (2019). *Biotecnología para principiantes*. Reverté.

https://books.google.es/books?Id=wxbedwaaqbaj&lpg=PR6&ots=vpcx2_e5dl&dq=%20biotecnologia&lr&hl=es&pg=PR6#v=onepage&q&f=false

Rivero, A. (2020). Vista de Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador. *Csic.es*. <https://collectaneabotanica.revistas.csic.es/index.php/collectaneabotanica/article/view/283/401>

Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Erler, R., Navarrete, H. 2019. *Baccharis latifolia* En: Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi. Version2019.0 <https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/fichaespecie/Baccharis%20latifolia>

Sandoval Velasco, M. E. (2021). Análisis de las características fitoquímicas, propiedades farmacológicas, usos y aplicaciones más comunes de la chilca (*Baccharis latifolia*) en el Ecuador [tesis]. universidad técnica de ambato facultad de ciencia e ingeniería en alimentos y biotecnología carrera de ingeniería bioquímica.

Tween 20 - Acción química. (2023, May 11). *Acción Química*.

<https://accionquimica.com/producto/tween-20/>

Vitto LP (2009) Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina: Latin American Journal of Natural Resources* 18(2):87-115 (Consultado 18 de Febrero de 2015).

Yáñez, S. L., Valencia, R., Zambrano, H. N., Pitman, N. C. A., Endara, L., & Ulloa, C. U. (2012). Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. In Centro de Publicaciones PUCE ebooks. <https://catalogo.edipuce.edu.ec/libro-rojo-de-las-plantas-endemicas-del-ecuador-ni830.html>

Zurita-Valencia, W. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (*tiliaceae*). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200007.