



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

Producción y viabilidad de semillas sintéticas *in vitro* de *Cannabis sativa* (100% crítica al CBD) en conservación criogénica y refrigeración

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

Autor: Mosquera Gonza Jonathan Martin

Tutor: Ing. Zurita Vásquez José Hernán

Cevallos - Ecuador

2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Trabajo de Titulación sobre el tema: “Producción y viabilidad de semillas sintéticas *in vitro* de *Cannabis sativa* (100% critica al CBD) en conservación criogénica y refrigeración” del alumno Mosquera Gonza Jonathan Martin, estudiante de la carrera de agronomía, expongo que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado en su totalidad, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento para la Titulación de Grado en la Universidad Técnica de Ambato.

Por lo tanto, autorizo la presentación de este ante el organismo pertinente para ser sometido a la evaluación de los profesores calificadores designados por Consejo Directivo de la Facultad.

Cevallos, junio del 2026



Ing. Zurita Vásquez José Hernán

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO

El suscrito, **Mosquera Gonza Jonathan Martin**, portador de cédula de ciudadanía número: 1751904358, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“Producción y viabilidad de semillas sintéticas in vitro de Cannabis sativa (100% critica al CBD) en conservación criogénica y refrigeración”** es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

Cevallos, junio del 2026

Mosquera Gonza Jonathan Martin

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“Producción y viabilidad de semillas sintéticas in vitro de Cannabis sativa (100% crítica al CBD) en conservación criogénica y refrigeración”** como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad. Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial. Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

Cevallos, junio del 2026



.....
Mosquera Gonza Jonathan Martin

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el Trabajo de Titulación, “**Producción y viabilidad de semillas sintéticas in vitro de Cannabis sativa (100% critica al CBD) en conservación criogénica y refrigeración**” de Mosquera Gonza Jonathan Martin, estudiante de la carrera de agronomía, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de conformidad con el Reglamento para la Titulación de Grado para obtener el título terminal de Tercer Nivel de la Universidad Técnica de Ambato, una vez revisado y calificado.

Cevallos, junio del 2026

REVISADO POR:



Ing. Zurita Vásquez José Hernán

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Para constancia firman:



Dr. Vásquez Freytez Carlos Luis

PRESIDENTE



Ing. Espinoza Vaca Jorge Santiago, PhD.



Ing. León Gordón Olguer Alfredo, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

DEDICATORIA

Dedico este logro, en primer lugar, a mis padres Martin Mosquera y Cesilia Gonza quienes han sido el pilar fundamental de mi vida. Gracias por su amor incondicional, sus sacrificios, su apoyo constante y por enseñarme que el esfuerzo y la perseverancia son el camino para alcanzar las metas. Este logro también les pertenece a ustedes, porque cada paso dado durante este proceso estuvo acompañado de su confianza y motivación.

A mi pequeña hermana Scarlet, por estar siempre presente, por sus palabras de aliento, su cariño y por brindarme ánimos en los momentos más difíciles. Gracias por compartir conmigo este camino y por celebrar cada uno de mis avances. A mi compañera Karina Abrajan, que es una persona muy importante para mí, y me apoyado en gran parte de mi proceso de formación.

Hoy culmino una etapa importante de mi vida académica, y este logro es el resultado del amor, la dedicación y el respaldo que he recibido de mi familia. Por ello, les dedico con profundo cariño y gratitud este trabajo, esperando que sea una pequeña muestra del inmenso agradecimiento que siento por todo lo que han hecho por mí.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento al Ing. Bioquímico Bryan Andrés Robalino Moreira, jefe del laboratorio de Andean Food, por su valioso apoyo durante el desarrollo de este proyecto de investigación. Gracias por proporcionar los insumos necesarios, compartir sus conocimientos y brindar la orientación técnica requerida para la ejecución de este trabajo, contribuyendo significativamente al cumplimiento de los objetivos planteados.

Agradezco también a mi tutor, el Ing. Hernán Zurita, por su guía constante, dedicación y asesoramiento académico a lo largo de este proceso. Su experiencia, conocimientos y apoyo con los equipos utilizados que fueron fundamentales para el desarrollo exitoso de la investigación.

De igual manera, expreso mi gratitud a la Ing. Vanesa Frutos, ayudante de laboratorio, por su colaboración, disposición y apoyo durante las actividades experimentales realizadas. Su acompañamiento y asistencia técnica fueron de gran importancia para la correcta ejecución de cada etapa del proyecto.

Finalmente, agradezco a todas las personas y docentes de la facultad que, de una u otra manera, contribuyeron al desarrollo de esta investigación y a la culminación de esta importante etapa de mi formación profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes investigativos	2
1.3 Características generales	3
1.3.1 Taxonomía de Cannabis sativa.....	3
1.3.2 Ciclo vegetativo.....	4
1.3.3 Semillas sintéticas.....	5
1.3.4 Crioconservación.....	5
1.3.5 Composición de los medios de cultivo MS y DKW	6
1.4 Objetivos	7

1.4.1	Objetivo general	7
1.4.2	Objetivos específicos	7
CAPÍTULO II		8
METODOLOGÍA		8
2.1	Ubicación del estudio	8
2.2	Equipos y materiales	8
2.2.1	Material experimental	8
2.2.2	Insumos	8
2.2.3	Materiales.....	9
2.2.4	Equipos.....	9
2.3	Tipo de investigación.....	10
2.4	Hipótesis	10
2.5	Población o muestra	10
2.6	Variables de respuesta	10
2.7	Diseño experimental.....	11
2.7.1	Factores de estudio	11
2.7.2	Factor 1:	11
2.7.3	Factor 2:	11
2.7.4	Factor 3:	11
2.7.5	Tratamientos	12
2.7.6	Características de la unidad experimental	12
2.7.7	Esquema del diseño experimental	12
2.8	Manejo del experimento	13

2.9	Recolección de la información.....	14
2.10	Procesamiento de la información y análisis estadístico	14
CAPITULO III.....		15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		15
3.1	Viabilidad de las semillas sintéticas <i>C. sativa</i> en refrigeración	15
3.2	Viabilidad de las yemas meristemáticas de <i>C. sativa</i> en crioconservación 17	
3.3	Desarrollo de las semillas sintéticas de <i>C. sativa</i> posterior a la conservación en refrigeración	19
3.4	Desarrollo de yemas meristemáticas de <i>C. sativa</i> posterior a la crioconservación.....	21
3.5	Comprobación de la hipótesis	23
CAPÍTULO IV		24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		24
3.6	Conclusiones	24
3.7	Recomendaciones	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		25
ANEXOS.....		28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica de Cannabis sativa</i>	4
Tabla 2. <i>Composición nutricional de Murashige y Skoog; Driver y Kuniyuki.</i>	6
Tabla 3. <i>Tratamientos y repeticiones</i>	12
Tabla 4. <i>Viabilidad de las semillas sintéticas en refrigeración a 7° C de C. sativa.</i> 15	
Tabla 5. <i>Viabilidad de la crioconservación de yemas meristemáticas a -196° C de C. sativa.</i>	17
Tabla 6. <i>Desarrollo posterior a la conservación de las semillas sintéticas de C. sativa en refrigeración, el desarrollo se evaluó en condiciones controladas a una temperatura media aproximada de 25°C.</i>	19
Tabla 7. <i>Desarrollo posterior a la crioconservación de yemas meristemáticas de C. sativa, el desarrollo se evaluó en condiciones controladas a una temperatura media aproximada de 25°C.</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ciclo vegetativo de Cannabis sativa (Andre et al., 2016)</i>	4
Figura 2. <i>Esquema de la distribución de los tratamientos</i>	12

RESUMEN

Cannabis sativa es una especie de gran importancia agrícola por la producción de cannabinoides, terpenos y otros compuestos de interés medicinal e industrial, debido a su alta variabilidad genética se han desarrollado técnicas de cultivo *in vitro* que permiten obtener material vegetal uniforme y conservar genotipos seleccionados, en esta investigación se evaluó la conservación de yemas meristemáticas mediante dos métodos, refrigeración de semillas sintéticas y crioconservación, utilizando los medios de cultivo MS y DKW durante períodos de almacenamiento de 15, 30, 45 y 60 días, el estudio se realizó en el laboratorio de propagación *in vitro* de la empresa Andean Food, las semillas sintéticas fueron elaboradas a partir de yemas meristemáticas encapsuladas en una matriz de agar, mientras que la crioconservación se realizó mediante vitrificación e inmersión en nitrógeno líquido a -196 °C, la evaluación consideró el porcentaje de viabilidad y el desarrollo de los explantes después de la siembra, los resultados mostraron que la refrigeración fue el método más eficiente para conservar la viabilidad del material vegetal, destacándose el medio MS con valores de 80,0 % a los 15 días y 53,3 % a los 60 días, por otro lado la crioconservación presentó porcentajes bajos de recuperación que oscilaron entre 6,7 % y 20,0 %, en cuanto al desarrollo de los explantes el medio DKW mostró mejores resultados iniciales alcanzando 10,48 mm a los 15 días, determinando que el tiempo de almacenamiento afecta la viabilidad y el desarrollo de los explantes de *C. sativa* evaluados durante el estudio realizado.

PALABRAS CLAVE: Semillas sintéticas, crioconservación, yemas meristemáticas, viabilidad, desarrollo.

ABSTRACT

Cannabis sativa is a species of great agricultural importance due to the production of cannabinoids, terpenes, and other compounds of medicinal and industrial interest. Because of its high genetic variability, *in vitro* cultivation techniques have been developed to obtain uniform plant material and preserve selected genotypes. This research evaluated the preservation of meristematic buds using two methods: refrigeration of synthetic seeds and cryopreservation. MS and DKW culture media were used for storage periods of 15, 30, 45, and 60 days. The study was conducted in the *in vitro* propagation laboratory of Andean Food. The synthetic seeds were prepared from meristematic buds encapsulated in an agar matrix, while cryopreservation was carried out by vitrification and immersion in liquid nitrogen at -196 °C. The evaluation considered the percentage of viability and the development of the explants after sowing. The results showed that refrigeration was the most efficient method for preserving the viability of the plant material, with the following standing out: MS medium showed viability values of 80.0% at 15 days and 53.3% at 60 days. Cryopreservation, on the other hand, exhibited low recovery percentages ranging from 6.7% to 20.0%. Regarding explant development, DKW medium showed better initial results, reaching 10.48 mm at 15 days. This indicates that storage time affects the viability and development of the *C. sativa* explants evaluated during this study.

KEYWORDS: Synthetic seeds, cryopreservation, meristematic buds, viability, development.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

Cannabis sativa L. es una especie dioica con polinización alógama perteneciente a la familia Cannabaceae, proveniente de Asia central y cultivada en todo el mundo. Esta planta es de gran interés científico e industrial debido a la presencia de compuestos bioactivos (cannabinoides, terpenos, flavonoides) presentes en mayor cantidad en flores femeninas sin fecundar (**Andre et al., 2016**). La variabilidad genética de la especie es muy elevada, también pueden presentar hermafroditismo. Además, la feminización de semillas no elimina la presencia de plantas macho, lo que ha incrementado su estudio buscando estabilidad sexual y genotípica, siendo viable la reproducción *in vitro* (**Punja & Holmes, 2020**).

La legalización de *C. sativa* en algunos países, como en Ecuador, genera la necesidad de buscar métodos eficaces de propagación y nuevas herramientas biotecnológicas, donde la micropropagación *in vitro* ha permitido desarrollar plantas clonales para estabilizar la variabilidad genética de la especie (**Monthony et al., 2021**). La multiplicación en condiciones *in vitro* mantiene el control de la temperatura y humedad, además de ser un espacio libre del desarrollo de patógenos, la reproducción *in vitro* produce plántulas genéticamente iguales a las plantas madre (**Pacheco Oñate, 2024**).

En los laboratorios de reproducción *in vitro* de plantas de *C. sativa* se pierde gran cantidad de material vegetal en el proceso de introducción del material vegetal a las condiciones *in vitro*, debido que se busca obtener plantas femeninas, lo cual no se puede identificar hasta la floración de la planta donante (La planta donante debe estar en estado vegetativo para la introducción), descartando el material vegetal proveniente de plantas masculinas, generando pérdidas económicas de los insumos utilizados

(medios de cultivo, hormonas, gelificantes, etc.) (Adams et al., 2021; Torres et al., 2022).

Las semillas sintéticas son un método biotecnológico, usado para la propagación *in vitro* y la conservación del material vegetal, tomando embriones, segmentos nodales, yemas apicales y otros órganos vegetales, encapsuladas en una matriz protectora de entre 3 mm a 8 mm de diámetro, facilitando un mayor almacenamiento, siendo una técnica útil a corto y mediano plazo (Rihan et al., 2017). Por otra parte, el método de crioconservación con nitrógeno líquido (-196°C) reduce la actividad celular casi en su totalidad, por lo cual se utiliza crio preservantes para mantener viable el tejido vegetal (Benelli, 2021).

1.2 Antecedentes investigativos

Lata et al. (2012) en su estudio sobre la conservación *in vitro* de segmentos nodales de *C. sativa* en condiciones de lento crecimiento, utilizando semillas sintéticas (SS), encapsulando el fragmento vegetal en un gel protector formado de una solución alginato de sodio con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) y conservándolos a una temperatura de 15°C durante 24 semanas, mostraron un 60 % de supervivencia y capacidad de desarrollarse en el proceso de regeneración.

En la investigación sobre la viabilidad de semillas sintéticas de Zarei et al. (2022) desarrollada *in vitro* mediante la encapsulación de segmentos nodales de *C. sativa* en una solución con medio de cultivo Murashige y Skoog (aplicando el 50% de la dosis), alginato de sodio al 3 %, y 75mM cloruro de calcio para formar las capsulas de gel, conservando las semillas sintéticas en una temperatura de 16 °C, y los resultados mostraron una viabilidad del 70% demostrando que es una técnica viable para la conservación de germoplasma vegetal de *C. sativa*.

Por otro lado, la investigación sobre crioconservación de *C. sativa* hecha por Uchendu et al. (2019) evalúan tres procedimientos de vitrificación por gotas para conservar por un tiempo prolongado en nitrógeno líquido material vegetal *in vitro* tomando ápices de 0,5 mm de subcultivos de 3 a 4 semanas. La vitrificación se realizó con PVS2, PVS3, PVS4 obteniendo como resultados un 63 % y 57 % de viabilidad con PVS2 la cual es significativamente superior a la viabilidad con PVS3 Y PVS4

que es ≤ 25 %, además, un tiempo adecuado para exponer el segmento nodal es de 15 a 20 min en PVS2.

Finalmente, en la investigación **Downey et al. (2021)** desarrollaron un protocolo para la crioconservación de material vegetal de *C. sativa* utilizando segmentos nodales cultivados previamente en condiciones *in vitro*. Se utilizó la técnica de vitrificación, sometiendo inicialmente los segmentos nodales a una solución PCS (0.5 M de sacarosa) durante 17 horas, con una solución de carga (LS) durante 20 min y posteriormente un tratamiento con la solución vitrificante PVS2 en incubación por 60 min antes de introducir el material vegetal en nitrógeno líquido con una temperatura de -196 °C. En la descongelación fueron reactivas en una solución de precultivo con MS (Murasghi skoog) y se obtuvo un 43,3-80 % de supervivencia y un rebrote de los tallos del 26,7-66,7 %, mostrando una variación significativa.

1.3 Características generales

1.3.1 Taxonomía de Cannabis sativa

La planta *C. sativa* es una planta herbácea perteneciente a la familia Cannabaceae, con una altura que oscila entre 1 a 5 m, dependiendo de la variedad y de las condiciones de cultivo. Presenta un tallo erecto, generalmente ramificado, con hojas compuestas palmeadas formadas por 5 a 9 folíolos lanceolados con bordes aserrados. Esta especie es dioica, lo que significa que existen plantas masculinas y femeninas separadas; las plantas masculinas suelen ser más altas y delgadas, mientras que las plantas femeninas presentan mayor ramificación y desarrollan inflorescencias densas, en las que se producen compuestos bioactivos como cannabinoides y terpenos (**Small, 2015**).

Aunque el *C. sativa* es una planta dioica, también suele presentar la aparición de inflorescencias hermafroditas, donde las flores femeninas y las flores masculinas en la misma planta. Estas plantas pueden producir polen viable, lo que permite la autofecundación y formación de semillas en una misma planta (**Zamir et al., 2020**).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Cannabis sativa*

Categoría taxonómica	Clasificación
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Cannabaceae
Género	<i>Cannabis</i> L.
Especie	<i>C. sativa</i> L.

1.3.2 Ciclo vegetativo

El ciclo es diferenciado en dos estadios dependientes del fotoperiodo y factores edafoclimáticos de la zona. La fase vegetativa comienza con la germinación de la semilla que da lugar al desarrollo aéreo y radicular. Durante esta fase la planta se centra en la estructuración de raíces, ramas, sistema foliar y brotes. La fase de floración es el inicio de la etapa reproductiva dada a una determinada edad de la planta a una respuesta de estímulos endógenos y ambientales, disminuye el desarrollo foliar y aumenta la formación de brácteas florales, la fase culmina con la producción de semillas (Small, 2015; Andre et al., 2016).

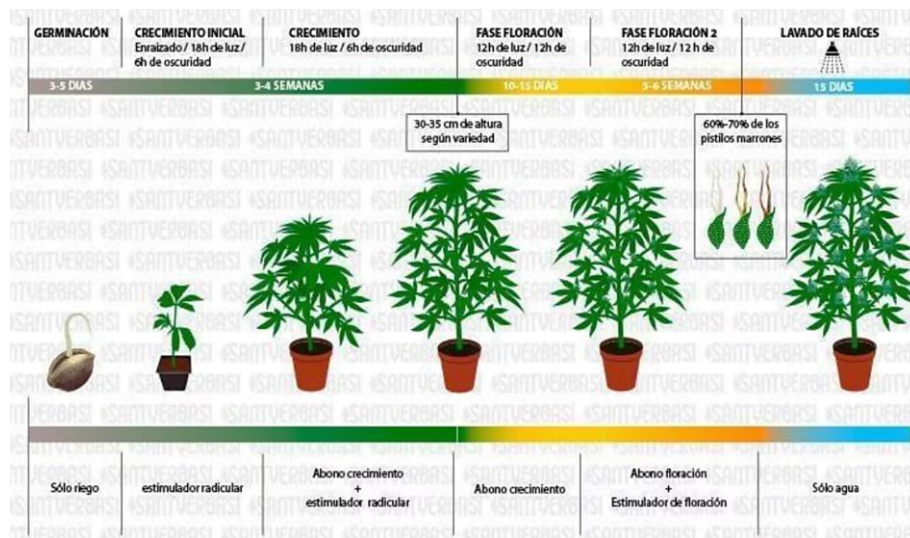


Figura 1. Ciclo vegetativo de *Cannabis sativa* (Andre et al., 2016).

Para el cultivo *in vitro* de *C. sativa* se requiere plantas en la fase vegetativa (aproximadamente) semanas después de la germinación) para obtener las yemas meristemáticas, ya que cuando la planta entra en la fase de floración no se puede obtener material vegetal para la reproducción *in vitro*.

1.3.3 Semillas sintéticas

Las semillas sintéticas son capsulas artificiales formadas mediante la encapsulación de material vegetal, siendo generalmente embriones somáticos, yemas meristemáticas o los segmentos nodales. La capsula es una matriz de hidrogel cuyo objetivo es imitar las funciones que tienen las semillas botánicas, permitiendo la reproducción, almacenamiento, transporte y conservación de germoplasma de especies vegetales de interés comercial e investigativo (Reddy et al., 2012). Las semillas sintéticas son utilizadas en protocolos de conservación *in vitro* debido a que permiten mantener material genético almacenado en espacios reducidos a bajas temperaturas (6°C a 18°C) y un aspecto importante de las semillas sintéticas es que brindan protección física al explante, facilitando la manipulación durante la conservación y su regeneración. Además, la matriz de gel puede contener nutrientes, hormonas, antioxidantes y otras sustancias que favorecen la supervivencia y regeneración del material vegetal después del almacenamiento (Rai et al., 2009).

1.3.4 Crioconservación

La crioconservación de *C. sativa* en nitrógeno líquido (-196 °C) constituye una herramienta nueva para la conservación a largo plazo, además, permite mantener la estabilidad genética y reducir el deterioro fisiológico de los tejidos. También es importante generar vitrificación en los tejidos vegetales para prevenir la formación de cristales de hielo intracelulares, por lo cual se utiliza crioconservantes, que evitan el daño celular por la formación de cristales durante la congelación (Uchendu et al., 2019).

Ademas, el precultivo con sacarosa favorece la deshidratación controlada de los explantes y mejora su tolerancia a las temperaturas bajas, incrementando la recuperación posterior al descongelamiento. Por su parte, la viabilidad de la crioconservación en diferentes materiales vegetales de *C. sativa*, destacando la

importancia de los tratamientos previos para preservar la integridad celular y favorecer la regeneración de los tejidos después del almacenamiento (Lata et al., 2019; Downey et al., 2021).

1.3.5 Composición de los medios de cultivo MS y DKW

La composición nutricional diferente de los medios de cultivo utilizados en la conservación *in vitro* de *C. sativa*, se presenta la composición mineral de los medios MS (Murashige y Skoog) y DKW (Driver y Kuniyuki) (Tabla 2). Ambos medios contienen los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal; sin embargo, difieren en la concentración de algunos macro y micronutrientes, lo que puede influir en la respuesta fisiológica, la viabilidad y el desarrollo de los explantes durante la conservación y regeneración *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962; Driver & Kuniyuki, 1984).

Tabla 2. Composición nutricional de Murashige y Skoog; Driver y Kuniyuki.

COMPONENTES	MS (Murashige y Skoog) (mg/L)	DKW (Driver y Kuniyuki) (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	1416
KNO ₃	1900	1367
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	1120
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	361
KH ₂ PO ₄	170	265
K ₂ SO ₄	—	1559
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	37.3
H ₃ BO ₃	6.2	4.8
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	33.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	17.0
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	—

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el tipo de conservación y el tiempo de viabilidad de semillas sintéticas de *Cannabis sativa* (variedad 100% Critical CBD) producidas en condiciones *in vitro*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de viabilidad y desarrollo de las semillas sintéticas y crioconservación de *Cannabis sativa* (variedad 100% Critical CBD) producidas *in vitro*.
- Comparar el efecto de los medios de cultivo, la crioconservación y la refrigeración sobre la viabilidad de las semillas sintéticas de *Cannabis sativa* (variedad 100% Critical CBD).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del estudio

La investigación experimental se realizó en Laboratorio de Propagación *in vitro* de la empresa Andean Food, ubicada en el caserío Andignato del cantón Cevallos perteneciente a la provincia de Tungurahua. La ubicación geográfica del lugar es 01° 21' 09" S y 78° 35' 49" O, a una altitud 2773 m.s.n.m.

2.2 Equipos y materiales

2.2.1 *Material experimental*

- Plantas en estado vegetativo de *C. sativa* variedad 100 % crítica al CBD

2.2.2 *Insumos*

- Agar Supreme plant tissue culture
- Ácido Ascórbico 99.50%
- Murashige y Skoog (MS)
- Driver-Kuniyuki Walnut (DKW)
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Glicerol ($C_3H_8O_3$)
- Etilenglicol ($C_2H_6O_2$)
- Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- Agua destilada
- Alcohol 70 %
- Alcohol 90 %
- Aceite vegetal

- Nitrógeno líquido
- Jabón líquido
- Cloro industrial
- Fungicida, RIVAL (Ingrediente activo del fungicida: Propamocard Hydrochloride, Aditivos c.s.p)
- 255 tubos de ensayo con 2ml de medio de multiplicación de *C. sativa* (Formulación privada de la empresa Andean Foods).

2.2.3 Materiales

- 1 rollo de papel aluminio
- 1 rollo de papel film
- 2 mangos de bisturí
- 10 bisturís
- 2 pinzas
- 1 cuchara pequeña
- 1 shot de 50 cc
- 1 paquete de jeringas (10 ml)
- 3 frascos de vidrio
- 8 cajas Petri
- 3 paquetes de servilletas
- 2 mecheros
- Puntas de micropipeta de 100 a 1000 μ L
- 48 tubos Eppendorf
- 1 vaso de precipitación de 500 ml
- 1 vaso de precipitación de 200 ml
- 1 probeta de 10 ml
- 1 probeta de 30 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 1 mechero bunsen
- 1 fosforera
- Papel filtro Whatman N. °2: poro de 8 μ m.
- Gradillas de tubos de ensayo
- Caja gradilla de tubos Eppendorf de 2ml

2.2.4 Equipos

- Tanque de nitrógeno líquido
- Autoclave

- Destilador
- Camara de flujo laminar
- Microscopio estereoscopio
- Baño maría
- Micropipeta de 100 a 1000 μ L

2.3 Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental, evaluando la viabilidad de las semillas sintética y criogenización en diferentes tiempos de conservación y dos medios de cultivo, sobre *C. sativa*

2.4 Hipótesis

H₀: La conservación de *C. sativa* en diferentes medios de cultivo y diferentes métodos de conservación de germoplasma, almacenados en cuatro tiempos establecidos, no generan alteraciones en su viabilidad y desarrollo.

H₁: La conservación de *C. sativa* en diferentes medios de cultivo y diferentes métodos de conservación de germoplasma, almacenados en cuatro tiempos establecidos, generan alteraciones en su viabilidad y desarrollo.

2.5 Población o muestra

El material vegetal de *C. sativa* 100% Critical CBD utilizado para la investigación se obtuvo de plantas en estado vegetativo con una altura de 10 a 15 cm, obtenidas del vivero de la empresa Andean Food, con una temperatura media aproximada de 27 °C y una humedad relativa aproximada de 53 %. Se utilizó 65 plantas para obtener las yemas meristemáticas necesarias para todos los tratamientos.

2.6 Variables de respuesta

- Viabilidad de yemas meristemáticas de *C. sativa* almacenadas con dos métodos de conservación y dos medios de cultivo.
- Desarrollo de las yemas meristemáticas almacenadas con dos métodos de conservación y dos medios de cultivo.

- Oxidación y clorosis del material vegetal no viable.

2.7 Diseño experimental

2.7.1 Factores de estudio

Esta investigación evaluó los métodos de conservación, medios de cultivo y diferentes tiempos de conservación sobre la viabilidad de *C. sativa*. El primer factor de estudio es el método de conservación donde se evaluó la refrigeración de semillas sintéticas formadas con yemas meristemáticas y la crioconservación de yemas meristemáticas. El segundo factor de estudio es el medio de cultivo aplicado, donde se evaluó el efecto de dos medios de cultivos en la viabilidad y el desarrollo. El tercer factor es el tiempo de conservación donde se busca evaluar una curva de viabilidad en el tiempo.

2.7.2 Factor 1:

Método de conservación:

- Refrigeración de semillas sintéticas (7°C)
- Crioconservación de yemas meristemáticas (-196°C)

2.7.3 Factor 2:

Medio de cultivo:

- Driver-Kuniyuki Walnut ½ (DKW)
- Murashige y Skoog ½ (MS)

2.7.4 Factor 3:

Tiempo de conservación:

- 15 días
- 30 días
- 45 días
- 60 días

2.7.5 Tratamientos

Tabla 3. Tratamientos y repeticiones

Método	Medio	Tiempo	Nº	Nombre de los tratamientos	Repeticiones
Refrigeración	MS	15 días	1	R-MS-15	3
		30 días	2	R-MS-30	3
		45 días	3	R-MS-45	3
		60 días	4	R-MS-60	3
Refrigeración	DKW	15 días	5	R-DKW-15	3
		30 días	6	R-DKW-30	3
		45 días	7	R-DKW-45	3
		60 días	8	R-DKW-60	3
Criogenización	MS	15 días	9	C-MS-15	3
		30 días	10	C-MS-30	3
		45 días	11	C-MS-45	3
		60 días	12	C-MS-60	3
Criogenización	DKW	15 días	13	C-DKW-15	3
		30 días	14	C-DKW-30	3
		45 días	15	C-DKW-45	3
		60 días	16	C-DKW-60	3
TESTIGO (Sin conservación)		0 días	17	Testigo	3

2.7.6 Características de la unidad experimental

Para cada tratamiento se colocó 5 explantes vegetales (semilla sintética o yema meristemática) en un Tubo Eppendorf de 2 ml, y cada tratamiento tubo 3 repeticiones.

2.7.7 Esquema del diseño experimental

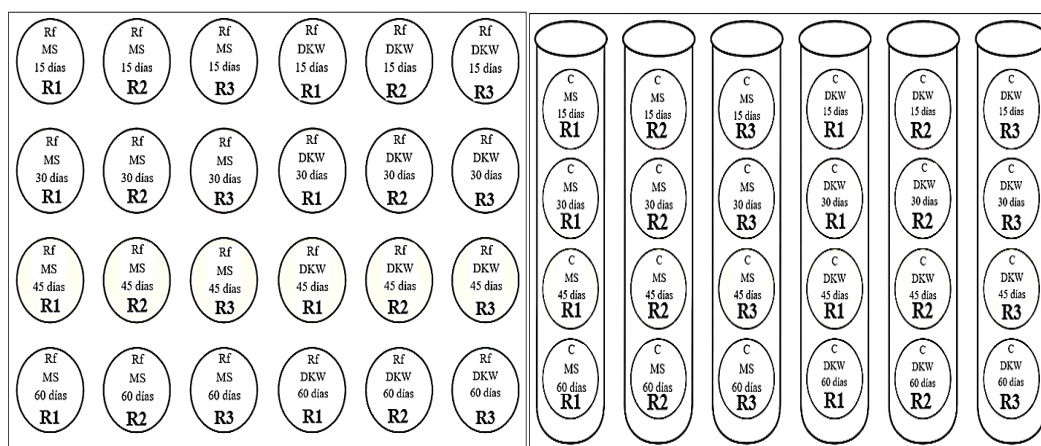


Figura 2. Esquema de la distribución de los tratamientos

2.8 Manejo del experimento

Para la obtención del material vegetal, se seleccionaron tallos de *C. sativa* de aproximadamente 15 cm de longitud. Los tallos fueron sometidos a un proceso de desinfección con jabón líquido, fungicida RIVAL, con una solución de cloro al 1.23 %, se introdujo el material en la cámara de flujo laminar, donde se desinfecto con alcohol al 70 %, y se mantuvo el material vegetal en una solución antioxidante estéril hasta el momento de la siembra (**Anexo 1**).

Para la elaboración de las semillas sintéticas se prepararon medios de cultivo basales con MS / DKW, complementado con sacarosa 2,5%, ácido ascórbico 0.02% y agar 9%, ajustando el pH a 6,0. Los medios basales preparados fueron esterilizados y mantenidos a 45 °C mediante baño maría para conservar su estado líquido y a su vez no dañe los tejidos vegetales. En condiciones estériles, se extrajeron las yemas meristemáticas utilizando un microscopio estereoscopio y mediante una micropipeta, se tomó el medio junto con la yema meristemática para gotearla en aceite esterilizado formando la semilla sintética. Se colocó las semillas sintéticas en tubos Eppendorf, colocando cinco semillas por tubo. Finalmente, los tratamientos fueron etiquetados y almacenados en refrigeración a 7 °C durante los períodos experimentales establecidos (**Anexo 2**).

Para la crioconservación se obtuvo yemas meristemáticas de tallos desinfectados. Las yemas fueron sometidas a un proceso de preparación, colocadas en una solución de precultivo MS / DKW durante 5 h. Posteriormente, se transfirió a una solución de carga (LS) durante 15 min y luego a una solución vitrificante PVS2 durante 10 min. Después de retirar parcialmente la solución vitrificante, las muestras fueron selladas en tubos Eppendorf e introducidas rápidamente en nitrógeno líquido a -196 °C para su conservación (**Anexo 3**).

Cumplidos los tiempos de almacenamiento, las semillas sintéticas fueron sembradas individualmente en tubos de ensayo que contenían 2 ml de medio de multiplicación de *C. sativa*, sellados con papel film y mantenidos en un cuarto de crecimiento a 25 °C (**Anexo 4**). En el caso de las muestras crioconservadas, los tubos fueron retirados del nitrógeno líquido y descongelados rápidamente en agua destilada

estéril a 45 °C. Las yemas meristemáticas fueron lavadas con agua destilada estéril, colocadas durante 24 h en una solución de precultivo sin exposición a la luz y posteriormente sembradas en tubos de ensayo con medio de multiplicación para evaluar su viabilidad y desarrollo (**Anexo 5**).

2.9 Recolección de la información

La recolección de información y registro de datos se realizó a los 21 días posteriores a la siembra para determinar la viabilidad de las semillas sintéticas, y se registró su desarrollo a los 36 días posteriores a la siembra.

2.10 Procesamiento de la información y análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA de la información obtenidos en esta investigación para evaluar los resultados de cada tratamiento generados por la combinación de métodos de conservación, medios de cultivo, y tiempo de conservación sobre la viabilidad y el desarrollo de *C. sativa*. Se empleó el programa InfoStat para realizar la prueba de tukey al 5% con desviación estándar.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Viabilidad de las semillas sintéticas *C. sativa* en refrigeración

En la **Tabla 4** se representa el porcentaje de viabilidad de las semillas sintéticas obtenido en cada tratamiento, incluyendo el tratamiento testigo sin conservación.

Tabla 4. Viabilidad de las semillas sintéticas en refrigeración a 7° C de *C. sativa*.

Tratamientos	Viabilidad (%)
R-MS-15	80,0 ± 0,0 ab
R-MS-30	73,3 ± 11,6 abc
R-MS-45	66,7 ± 11,6 abc
R-MS-60	53,3 ± 11,6 bcd
R-DKW-15	66,7 ± 11,6 abc
R-DKW-30	46,7 ± 11,6 bcdef
R-DKW-45	40 ± 0,0 cdef
R-DKW-60	20 ± 0,0 def
Testigo (sin conservación)	93,3 ± 11,6 a

Valores de media representados con la misma letra son tratamientos que no presentan una diferencia significativa, según lo obtenido en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados de los tratamientos de semillas sintéticas con medio MS fueron inferiores al testigo (93.3%), mostrando una mayor efectividad en el tratamiento R-MS-15 con una viabilidad del 80,0%, seguido por el tratamiento de R-MS-30 y R-MS-

45 con valores estadísticamente similares de 73,3% y 66,7%, respectivamente y en el tratamiento R-MS-60 la viabilidad fue del 53,3%, evidenciando un efecto negativo sobre la viabilidad en tiempos más largos de conservación. Se observó que la viabilidad se redujo progresivamente a mayor tiempo de conservación.

Las semillas sintéticas en medio DKW presentaron una viabilidad inferior a las semillas sintéticas de MS en cada tratamiento con el mismo tiempo de conservación, siendo igualmente inferiores al testigo (93,3%). El valor con mayor viabilidad fue el del tratamiento R-DKW-15 con un 66,7%, seguidos de 46,7% y 40,0% en los tratamientos de R-DKW-30 y R-DKW-45 respectivamente, los cuales no muestran diferencias significativas, continuando con el valor de menor viabilidad del tratamiento R-DKW-60 con un 20,0%, mostrando una diferencia significativamente negativa con los demás tratamientos de MS y DKW.

La reducción de la viabilidad a mayor tiempo de conservación coincide con lo reportado por **Engelmann (2011)**, quien señala que las bajas temperaturas permiten extender la supervivencia del material vegetal mediante la reducción de la actividad metabólica, pero no detienen completamente los procesos de deterioro celular. **Benelli et al. (2022)** menciona que la oscuridad limita la fotosíntesis generando un consumo de las reservas energéticas disponibles sin reponerlas, lo que repercute en la viabilidad de los explantes, en consecuencia, el almacenamiento prolongado puede reducir la capacidad de regeneración de los explantes.

Por otro lado, la mejor respuesta obtenida en el medio MS podría estar relacionado con las diferencias en la composición nutricional, caracterizada por mayores concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio, elementos que pueden contribuir a su capacidad para sostener la supervivencia de los tejidos bajo condiciones a la supervivencia de los tejidos cultivados in vitro (**Murashige y Skoog, 1962**). Aunque, según **Driver y Kuniyuki. (1984)** la composición nutricional del medio DKW es más adecuado para el desarrollo de especies semileñosas, en las condiciones de este estudio el medio MS resultó más adecuado para conservar una mayor viabilidad de *C. sativa* durante 60 días de refrigeración de las semillas sintéticas.

3.2 Viabilidad de las yemas meristemáticas de *C. sativa* en crioconservación

En la **Tabla 5** se representa el porcentaje de viabilidad de las yemas meristemáticas obtenido en cada tratamiento, incluyendo el tratamiento testigo sin conservación.

Tabla 5. Viabilidad de la crioconservación de yemas meristemáticas a -196°C de *C. sativa*.

Tratamientos	Viabilidad (%)
C-MS-15	$13,3 \pm 11,6$ ef
C-MS-30	$13,3 \pm 11,6$ ef
C-MS-45	$13,3 \pm 11,6$ f
C-MS-60	$6,7 \pm 11,6$ f
C-DKW-15	$20,0 \pm 20,0$ def
C-DKW-30	$20,0 \pm 0$, def
C-DKW-45	$20 \pm 20,0$ def
C-DKW-60	$13 \pm 11,6$ ef
Testigo (sin conservación)	$93,3 \pm 11,6$ a

Valores de media representados con la misma letra son tratamientos que no presentan una diferencia significativa, según lo obtenido en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados de la crioconservación de yemas meristemáticas mostraron porcentajes de viabilidad significativamente inferiores tratamiento testigo (93,3%). La crioconservación con medio MS, mostró una viabilidad semejante en los tratamientos C-MS-15, C-MS-30 y C-MS-45 con valores del 13,3%, mientras que el tratamiento C-MS-60 presentó una viabilidad menor de 6,7%. Aunque se observó una ligera disminución de la viabilidad en el tratamiento con mayor tiempo de conservación,

estadísticamente no existieron diferencias significativas, aunque no son tratamientos efectivos debido a su baja viabilidad.

Las yemas meristemáticas en medio DKW presentaron valores de viabilidad ligeramente superiores a los obtenidos en medio MS pero sin diferencias significativas estadísticamente. Los tratamientos C-DKW-15, C-DKW-30 y C-DKW-45 alcanzaron una viabilidad de 20,0%, mientras que en el tratamiento C-DKW-60 se registró un valor de 13,3%, siendo ligeramente inferior a los demás tratamientos, pero sin diferencias significativas, además, esta reducción en la viabilidad es similar a la obtenida en los tratamientos con MS. Aunque se observó una ligera disminución de la viabilidad en el tratamiento con mayor tiempo de conservación, estadísticamente no existieron diferencias significativas, aunque no son tratamientos efectivos debido a su baja viabilidad.

Estos resultados sugieren que una proporción importante de las yemas meristemáticas no logró regenerarse después del proceso de crioconservación. Al respecto, **Uchendu et al. (2019)** señalan que el tiempo de exposición a los crioprotectores es un factor crítico para alcanzar una vitrificación adecuada y evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales pueden causar alteraciones estructurales en membranas y orgánulos celulares. Según **(Downey et al., 2021)**, una protección insuficiente de los tejidos frente a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido puede explicar la limitada capacidad de recuperación observada en las yemas meristemáticas de *C. sativa*.

Asimismo, **Lata et al. (2019)** indican que la recuperación vegetal posterior a la crioconservación depende de la tolerancia de los tejidos a la deshidratación y al estrés osmótico generado por los crioprotectores, por lo que los tiempos manejados en el protocolo pueden no ser los más adecuados. Aunque la criogenización constituye una herramienta eficaz para la conservación a largo plazo, los bajos porcentajes de viabilidad obtenidos evidencian que las yemas meristemáticas de *C. sativa* presentaron una capacidad limitada de recuperación bajo las condiciones empleadas en este estudio.

3.3 Desarrollo de las semillas sintéticas de *C. sativa* posterior a la conservación en refrigeración

En la **Tabla 6** se representa el desarrollo de las semillas sintéticas obtenido en cada tratamiento, incluyendo el desarrollo del tratamiento testigo sin conservación.

Tabla 6. Desarrollo a los 36 días posteriores a la conservación de las semillas sintéticas de *C. sativa* en refrigeración, el desarrollo se evaluó en condiciones controladas a una temperatura media aproximada de 25°C.

Tratamiento	Desarrollo (mm)
R-MS-15	7,12 ± 0,24 c
R-MS-30	5,15 ± 0,36 cdefg
R-MS-45	3,57 ± 0,12 gh
R-MS-60	1,49 ± 0,22 i
R-DKW-15	10,48 ± 0,57 b
R-DKW-30	6,53 ± 0,20 cd
R-DKW-45	4,08 ± 0,39 efgh
R-DKW-60	2,83 ± 0,25 hi
Testigo (sin conservación)	15,04 ± 1,28 a

Valores de media representados con la misma letra son tratamientos que no presentan una diferencia significativa, según lo obtenido en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados del desarrollo de las semillas sintéticas en refrigeración utilizando medio MS fueron inferiores al testigo sin conservación (15,04 mm). El mayor desarrollo dentro de este medio se observó en el tratamiento R-MS-15 con 7,12 mm, seguido por R-MS-30 con 5,15 mm. Posteriormente, los tratamientos R-MS-45 y R-MS-60 registraron valores de 3,57 mm y 1,49 mm, respectivamente. Se evidenció una disminución progresiva del desarrollo a mayor tiempo de conservación, siendo R-

MS-60 el tratamiento con el menor crecimiento. El tratamiento R-MS-15 fue más efectivo respecto a los tratamientos almacenados por periodos de tiempo más prolongados.

Los tratamientos conservados en medio DKW también presentaron valores de desarrollo inferiores al testigo, aunque mostraron un mejor desempeño que los tratamientos con medio MS en todos los tiempos de conservación evaluados. El tratamiento R-DKW-15 alcanzó el mayor desarrollo con 10,48 mm, seguido por R-DKW-30 con 6,53 mm, mientras que R-DKW-45 y R-DKW-60 registraron 4,08 mm y 2,83 mm, respectivamente. Al igual que en el medio MS, se observó una reducción gradual del desarrollo a medida que el tiempo de almacenamiento era mayor. Los resultados indican que el medio DKW favoreció a un mayor desarrollo de *C. sativa* durante la conservación en refrigeración, aunque ninguno de los tratamientos logró alcanzar el desarrollo observado en el testigo sin conservación.

La reducción del desarrollo durante el almacenamiento es similar con lo señalado por **Engelmann (2011)**, quien menciona que las estrategias de crecimiento lento disminuyen la actividad fisiológica de los tejidos para prolongar su supervivencia, aunque también reducen su capacidad de regeneración. El mejor desempeño observado en el medio DKW sugiere que la composición del medio MS no es adecuada para el desarrollo de *C. sativa*, que, aunque es ampliamente utilizado para la propagación in vitro de diversas especies, las concentraciones elevadas de nitrógeno y potasio en comparación con el medio DKW pueden afectar su desarrollo (**Murashige y Skoog, 1962**).

Driver y Kuniyuki (1984) desarrollaron el medio DKW para especies leñosas, caracterizándose por presentar mayores concentraciones de calcio, azufre y concentraciones menores de nitrógeno y potasio en comparación con el medio MS, lo cual puede favorecer al desarrollo de *C. sativa*. De acuerdo con **Page et al. (2021)**, las características nutricionales de DKW favorecer el crecimiento vegetativo de plantas leñosas y semileñosas, lo que podría explicar el mayor desarrollo registrado en los explantes conservados en este medio.

3.4 Desarrollo de yemas meristemáticas de *C. sativa* posterior a la crioconservación.

En la **Tabla 7** se representa el desarrollo de las semillas sintéticas obtenido en cada tratamiento, incluyendo el desarrollo del tratamiento testigo sin conservación.

Tabla 7. Desarrollo a los 36 días posteriores a la crioconservación de yemas meristemáticas de *C. sativa*, el desarrollo se evaluó en condiciones controladas a una temperatura media aproximada de 25°C.

Tratamiento	Desarrollo (mm)
C-MS-15	6,05 ± 0,49 cde
C-MS-30	5,50 ± 0,57 cdefg
C-MS-45	5,85 ± 0,21 cde
C-MS-60	4,20 ± 0,00 efgh
C-DKW-15	5,63 ± 0,03 cdef
C-DKW-30	4,63 ± 0,06 defgh
C-DKW-45	3,83 ± 0,04 fgh
C-DKW-60	2,80 ± 0,05 hi
Testigo (sin conservación)	15,04 ± 1,28 a

Valores de media representados con la misma letra son tratamientos que no presentan una diferencia significativa, según lo obtenido en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados del desarrollo de las yemas meristemáticas después de la crioconservación fueron inferiores al testigo sin conservación (15,04 mm), evidenciando que la exposición al nitrógeno líquido afecta significativamente la capacidad de recrecimiento de las yemas meristemáticas. En los tratamientos con medio MS, el mayor desarrollo se registró en C-MS-15 con 6,05 mm, seguido por C-MS-45 y C-MS-30 con valores de 5,85 mm y 5,50 mm, respectivamente, los cuales compartieron grupos estadísticos similares. El tratamiento C-MS-60 presentó el menor

desarrollo dentro de este medio con 4,20 mm, evidenciando una disminución del crecimiento a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, aunque, las diferencias entre los tratamientos son significativamente bajas.

Las yemas meristemáticas encapsuladas en medio DKW también presentaron valores de desarrollo inferiores al testigo. El tratamiento C-DKW-15 alcanzó el mayor desarrollo con 5,63 mm, seguido por C-DKW-30 y C-DKW-45 con valores de 4,63 mm y 3,83 mm, respectivamente. El menor desarrollo se observó en C-DKW-60 con 2,80 mm, evidenciando de igual forma una reducción progresiva del crecimiento conforme aumentó el tiempo de conservación. La mayoría de los tratamientos son semejantes, indicando que no existieron diferencias significativas entre varios de ellos. Los resultados muestran que la crioconservación redujo considerablemente el desarrollo de las yemas meristemáticas de *C. sativa*, independientemente del medio de encapsulación utilizado.

Los resultados indican que, aunque la crioconservación redujo considerablemente la capacidad de crecimiento de los explantes en comparación con el testigo, los tejidos que lograron sobrevivir al proceso conservaron una capacidad de regeneración relativamente estable. **Engelmann (2011)** señala que la exposición a temperaturas extremadamente bajas induce un estado de suspensión metabólica que permite la conservación a largo plazo del material vegetal. Sin embargo, las etapas necesarias para la crioconservación pueden generar alteraciones fisiológicas que limitan el crecimiento posterior de los explantes, lo que podría explicar los menores valores de desarrollo observados en los tratamientos de crioconservación.

Por otra parte, **Uchendu et al. (2019)** indican que los procesos de deshidratación, exposición a crioprotectores, congelación y descongelación constituyen factores de estrés celular que pueden afectar la recuperación de los tejidos vegetales después de la crioconservación. Estos daños pueden comprometer la integridad de las membranas y reducir la capacidad de crecimiento de los explantes sobrevivientes. En consecuencia, aunque algunas yemas meristemáticas lograron regenerarse tras la exposición al nitrógeno líquido, su desarrollo fue considerablemente menor en comparación con el material no conservado.

3.5 Comprobación de la hipótesis

La conservación de *C. sativa* en diferentes medios de cultivo y diferentes métodos de conservación de germoplasma, almacenados en cuatro tiempos establecidos, generan alteraciones en su viabilidad y desarrollo.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.6 Conclusiones

Se determinó que tanto la viabilidad como el desarrollo de *C. sativa* disminuyeron progresivamente conforme el tiempo de conservación aumento, independientemente del método y medio utilizado. La mayor viabilidad se dio en las semillas sintéticas conservadas en refrigeración con medio MS, alcanzando 80,0 % y 73,3 % en los tratamientos R-MS-15 Y R-MS-30. La crioconservación presentó una viabilidad inferior, entre 20,0 % y 6,7 % siendo valores no efectivos. El desarrollo con mayor crecimiento se registró en el tratamiento R-DKW-15 con 10,48 mm, mientras que los tratamientos en crioconservación mostraron valores inferiores, variando entre 6,05 y 4,20 mm en MS y entre 5,63 y 2,80 mm en DKW.

La evaluación de los dos métodos de conservación evidenció que la refrigeración fue significativamente más efectiva que la crioconservación para mantener la viabilidad, además, los tratamientos con MS más efectivos para mantener la viabilidad. Por otro lado, en el desarrollo el medio DKW promovió un mayor crecimiento de los explantes después de la conservación en los tratamientos R-DKW-15 R-DKW-30 y R-DKW-45. Por lo tanto, la combinación de refrigeración y medio MS constituye la mejor alternativa para conservar el material vegetal de *C. sativa*.

3.7 Recomendaciones

- Evaluar otras concentraciones de los medios MS y DKW sobre la viabilidad de las semillas sintéticas
- Evaluar tiempos más prologados de conservación.
- Analizar diferentes tiempos en los protocolos de la crioconservación.
- Evaluar la viabilidad de las semillas sintéticas directamente en el medio de multiplicación, retirando previamente la matriz de gel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Adams, T. K., Masondo, N. A., Malatsi, P., & Makunga, N. P. (2021). Cannabis sativa: From therapeutic uses to micropropagation and beyond. *Plants*, 10(10), 2078. <https://doi.org/10.3390/plants10102078>
- Benelli, C. (2021). Plant cryopreservation: A look at the present and the future. *Plants*, 10(12), 2744. <https://doi.org/10.3390/plants10122744>
- Benelli, C., De Carlo, A., Engelmann, F., & Lambardi, M. (2022). In vitro conservation through slow growth storage technique of fruit species: An overview of the last 10 years. *Plants*, 11(22), 3188. <https://doi.org/10.3390/plants11223188>
- Downey, C. D., Golenia, G., Boudko, E. A., & Jones, A. M. P. (2021). Cryopreservation of 13 commercial Cannabis sativa genotypes using in vitro nodal explants. *Plants*, 10(9), 1794. <https://doi.org/10.3390/plants10091794>
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507–509.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Monthony, A. S., Page, S. R., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). The past, present and future of Cannabis sativa tissue culture. *Plants*, 10(1), 185. <https://doi.org/10.3390/plants10010185>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Lata, H., Chandra, S., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2012). In vitro germplasm conservation of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding elite clones of *Cannabis sativa* L. under slow growth conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2), 743–750. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0874-x>
- Lata, H., Chandra, S., Tehen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2019). *Cryopreservation of axillary buds of Cannabis sativa L. by V-cryoplate droplet-vitrification: The critical role of sucrose preculture*. *CryoLetters*, 40(5), 291–298.
- Pacheco Oñate, E. V. (2024). *Evaluación de un protocolo de multiplicación in vitro de Cannabis sativa L. en condiciones controladas en el cantón Latacunga* [Proyecto de investigación, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Institucional UTC. <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/12138>
- Page, S. R. G., Monthony, A. S., Jones, A. M. P., & Zheng, Y. (2021). Variables affecting shoot growth and plantlet recovery in *Cannabis sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 12, 732344. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.732344>
- Punja, Z. K., & Holmes, J. E. (2020). Hermaphroditism in marijuana (*Cannabis sativa* L.) inflorescences: Impact on floral morphology, seed formation, progeny sex ratios, and genetic variation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 718. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00718/full>
- Rihan, H. Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M. E., & Fuller, M. P. (2017). *Artificial seeds (principle, aspects and applications)*. *Agronomy*, 7(4), 71. <https://doi.org/10.3390/agronomy7040071>
- Rai, M. K., Asthana, P., Singh, S. K., Jaiswal, V. S., & Jaiswal, U. (2009). The encapsulation technology in fruit plants—A review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.025>

- Reddy, M. C., Murthy, K. S. R., & Pullaiah, T. (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14254–14275.
https://www.researchgate.net/publication/262182448_Synthetic_seeds_A_review_in_agriculture_and_forestry
- Small, E. (2015). Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *The Botanical Review*, 81(3), 189–294.
<https://doi.org/10.1007/s12229-015-9157-3>
- Torres, A., Pauli, C., Givens, R., Argyris, J., Allen, K., Monfort, A., & Gaudino, R. J. (2022). High-throughput methods for identifying male *Cannabis sativa* using genotyping approaches. *Journal of Cannabis Research*, 4(57).
<https://doi.org/10.1186/s42238-022-00164-7>
- Uchendu, E. E., Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2019). Cryopreservation of shoot tips of elite cultivars of *Cannabis sativa* L. by droplet vitrification. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 2(1), 29–34.
<https://doi.org/10.1159/000496869>
- Zamir, K., Holmes, J. E., & Punja, Z. K. (2020). Hermaphroditism in marijuana (*Cannabis sativa* L.) inflorescences: Impact on floral morphology, seed formation, progeny sex ratios, and genetic variation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 718. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00718>
- Zarei, A., Feyissa, B. A., Davis, B., & Tavakouli Dinani, E. (2022). *Cannabis synthetic seeds: An alternative approach for commercial scale of clonal propagation and germplasm conservation*. *Plants*, 11(23), 3186.
<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/23/3186>

ANEXOS

ANEXO 1. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE C. SATIVA

1. Lavar los tallos en 100 ml de agua destilada + 1 ml de jabón líquido por 20 min.
2. Enjuagar 4 veces con agua destilada (1 minuto cada enjuague).
3. Lavar los tallos con 100 ml de agua y 20 microlitros de fungicida RIVAL por 12 min (Ingrediente activo del fungicida: Propamocard Hydrochloride, Aditivos c.s.p).
4. Enjuagar con agua destilada durante 1 minuto.
5. Lavar los tallos en una solución con el 1,23 % de cloro por 12 min.
6. Llevar los explantes a la cámara de flujo laminar (Desinfectar el frasco por fuera antes de ingresar a cámara).
7. Lavar en cámara con alcohol estéril al 70 % por 1 min.
8. Enjuagar con agua destilada estéril 2 veces por 2 min.
9. Pasar los explantes a un frasco con antioxidante estéril.
10. Tiempo de siembra 6 h.

ANEXO 2. PROCEDIMIENTO DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS

Preparación de medios	
Medio Agar + MS	Medio Agar + DKW
Con ayuda del agitador magnético, en 100 ml de agua destilada disolver: • Sacarosa = 2,5 gr * 1min • Medio MS = 0,2165 gr * 1 min • Ácido ascórbico = 20 mg * 1min • Regular el pH a 6 con HCl para bajar el pH y NaOH para subir el pH. • Agregar 0,9 gr de agar y clarificar por 1 minuto en el microondas y disolver por un minuto en el agitador magnético.	Con ayuda del agitador magnético, en 100 ml de agua destilada disolver: • Sacarosa = 2,5 gr * 1min • Medio DKW = 0,266 gr * 1min • Ácido ascórbico = 20 mg * 1min • Regular el pH a 6 con HCl para bajar el pH y NaOH para subir el pH. • Agregar 0,9 gr de agar y clarificar por 1 minuto en el microondas y disolver por un minuto en el agitador magnético.

Materiales y equipos	
Equipos (desinfección con alcohol al 70 %).	Materiales (Autoclavar)
• Micropipeta • Microscopio estereoscopio • Baño maría	• 2 mangos de bisturí • 2 bisturís • 2 pinzas • 1 cuchara pequeña • 1 Shot de 50 cc • 2 frascos de vidrio • 1 frasco grande de vidrio • 5 cajas Petri • ½ paquete de servilletas • 1 mechero bunsen • 12 puntas de micropipeta (con las puntas cortadas) • 12 tubos Eppendorf
Soluciones requeridas	
• ½ litro Alcohol al 96 % • 100 ml de Medio de Agar + MS o Agar + DKW (Autoclavado) • 50 ml de aceite esterilizado (Autoclavado)	
Material vegetal	
15 tallos desinfectados de 10 cm de <i>C. sativa</i> = 60 yemas meristemáticas. Dato: De cada tallo se obtuvo un aproximado de 4 yemas meristemáticas.	

1. Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 %, e introducir los materiales estériles y equipos desinfectados con alcohol al 70 % (El baño maría debe estar calibrado a 45°C).

2. Prender la luz UV durante 10 min para generar un ambiente estéril.

3. Introducir a la cámara de flujo laminar los tallos desinfectados de *C. sativa*.

4. Colocar el medio de agar (MS / DKW) en el baño maría para mantener una temperatura de 45 °C (temperatura óptima para mantener en estado líquido el medio y evitar quemar las yemas meristemáticas).

5. Colocar el aceite en el Shot de 50 cc.

6. Extraer los meristemas apicales en el microscopio estereoscopio con la ayuda de los bisturís y las pinzas (flamear las pinzas y los bisturís antes de manipular).

7. Con la micropipeta tomamos medio y la yema meristemática, goteando en el aceite para formar la semilla sintética.

8. Retirar las semillas sintéticas del aceite con la cuchara pequeña colocando 5 muestras en cada tubo Eppendorf.
9. Etiquetar los tratamientos y almacenar en refrigeración a 7 °C.

ANEXO 3. MANEJO DE LA CRIOCONSERVACIÓN

Preparación de soluciones		
Precultivo liquido MS (Autoclavar)	LS + MS	PVS2 + MS
En 100 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 40 gr * 3min - MS = 13.6 gr * 1 min	En 200 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 27.4 gr * 2 min - MS = 0.433 gr * 1 min - Glicerol = 29 ml * 5 min - Filtrar la solución dentro de cámara de flujo con papel filtro Whatman N. °2: poro de aproximadamente 8 µm.	En 200 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 27.4 gr * 2 min - MS = 0.433 gr * 1 min - Glicerol = 58 ml * 5 min - Etilenglicol = 30 ml * - Dimetilsulfito (DMSO) 30 ml Filtrar la solución dentro de cámara de flujo con papel filtro Whatman N. °2: poro de aproximadamente 8 µm.
Precultivo liquido DKW (Autoclavar)	LS + DKW	PVS2 + DKW
En 100 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 40 gr * 3min - DKW = 16.71 gr * 1 min	En 200 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 27.4 gr * 2 min - MS = 0.532 gr * 1 min - Glicerol = 29 ml * 5 min - Filtrar la solución con papel filtro Whatman N. °2: poro de aproximadamente 8 µm.	En 200 ml de agua destilada estéril disolver: - Sacarosa = 27.4 gr * 2 min - DKW = 0.532 gr * 1 min - Glicerol = 58 ml * 5 min - Etilenglicol = 30 ml * 5 min - Dimetilsulfito (DMSO) 30 ml * 5 min Filtrar la solución dentro de cámara de flujo con papel filtro Whatman N. °2: poro de aproximadamente 8 µm.

Materiales y equipos	
Equipos en cámara (desinfección con alcohol al 70 %).	Materiales (Autoclavar)
• Micropipeta • Microscopio estereoscopio • Baño maría Equipo fuera de cámara: • Tanque de nitrógeno	• 2 mangos de bisturí • 2 bisturís • 2 pinzas • 3 jeringas • 2 frascos de vidrio • 5 cajas Petri • ½ paquete de servilletas • 1 mechero bunsen • 12 tubos Eppendorf • Cuadros de aluminio
Soluciones requeridas	
• ½ litro Alcohol al 96 % • Solución de Precultivo MS / DKW (temperatura 7°) • Solución LS MS / DKW (temperatura 7°) • Solución PVS MS / DKW (temperatura 7°)	
Material vegetal	
15 tallos desinfectados de 10 cm de <i>C. sativa</i> = 60 yemas meristemáticas. Dato: De cada tallo se obtuvo un aproximado de 4 yemas meristemáticas.	

1. Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % e introducir los materiales estériles y equipos desinfectados con alcohol al 70 %.
2. Prender la luz UV por 10 min para generar un ambiente estéril.
3. Introducir el material vegetal desinfectado de *C. sativa*.
4. Extraer las yemas meristemáticas con ayuda del microscopio estereoscopio.
5. Colocar las yemas meristemáticas en un tubo Eppendorf con la solución de precultivo MS / DKW durante 5 horas, en una temperatura de 7°C (dentro de la refrigeradora).
6. Cambiar las yemas meristemáticas a la solución LS MS / DKW por 15 min, en una temperatura de 7°C (dentro de la refrigeradora).
7. Cambiar las yemas meristemáticas a la solución PVS2 MS / DKW por 10 min, en una temperatura de 7°C (dentro de la refrigeradora).
8. Retirar parte de la solución PVS2 MS / DKW, manteniendo un nivel que solamente recubra las yemas meristemáticas.
9. Sellar e introducir rápidamente al tanque de nitrógeno líquido.

ANEXO 4. SIEMBRA DE SEMILLAS SINTÉTICAS

Materiales e insumos (Autoclavados)	Material vegetal
- 1 Mechero bunsen - 1 Pinza - 1 Caja Petri - Tubos de ensayo con 2ml de medio de multiplicación de <i>C. sativa</i> (Cantidad necesaria). - Papel film	- Semillas sintéticas

1. Prepara la cámara de flujo laminar con los materiales estériles y el material vegetal.
2. Con la pinza tomar las semillas sintéticas y colocarlas en los tubos de ensayo con 2ml de medio de multiplicación de *C. sativa*, sellando con papel film.
3. Colocar los tratamientos en el cuarto de crecimiento a una temperatura aproximada de 25°C.

ANEXO 5. SIEMBRA DE YEMAS MERISTEMÁTICAS CRIOCONSERVADAS

Materiales e insumos (Autoclavados)	Material vegetal
- 1 Mechero bunsen - 1 Pinza - 3 Cajas Petri - ½ litro de agua destilada - Tubos de ensayo con 2ml de medio de multiplicación de <i>C. sativa</i> (Cantidad necesaria). - Papel aluminio - Solución de precultivo MS / DKW	- Yemas meristemáticas crioconservadas

1. Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % e introducir los materiales estériles.
2. Retirar la muestra del tanque de nitrógeno e introducirla rápidamente en agua destilada estéril a 45 °C de temperatura para descongelar rápidamente.
3. Introducir rápidamente el material vegetal a cámara de flujo laminar.
4. Lavar las yemas meristemáticas con agua destilada estéril 2 veces durante 3 min cada lavado.
5. Colocar las yemas meristemáticas en la solución de precultivo MS / DKW durante 24 horas sin exposición a la luz.

6. Colocar las yemas meristemáticas en los tubos de ensayo con 2ml de medio de multiplicación de *C. sativa*.

ANEXO 6. DATOS REGISTRADOS Y ESTADÍSTICA.

VIABILIDAD																	
Método	Medio	Tiempo	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Refrigeración	Agar + MS	15 días	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
		30 días	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
		45 días	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
		60 días	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
Refrigeración	Agar + DKW	15 días	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
		30 días	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
		45 días	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
		60 días	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Criogenización	MS	15 días	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		30 días	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
		45 días	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		60 días	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Criogenización	DKW	15 días	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		30 días	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		45 días	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		60 días	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TESTIGO (Sin conservación)		0 días	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Desarrollo a los 36 días				
Tratamientos	R1	R2	R3	Promedio
R-MS-15	7,375	7,075	6,900	7,12
R-MS-30	5,375	5,350	4,733	5,19
R-MS-45	3,433	3,633	3,650	3,58
R-MS-60	1,450	1,300	1,733	1,50
R-DKW-15	9,800	10,533	10,933	10,42
R-DKW-30	6,750	6,350	6,500	6,53
R-DKW-45	4,533	3,850	3,850	4,14
R-DKW-60	2,800	2,600	3,100	2,83
C-MS-15	6,400	5,700	0,000	6,05
C-MS-30	0,000	5,100	5,900	5,50
C-MS-45	5,700	0,000	6,000	5,85
C-MS-60	4,200	0,000	0,000	4,20
C-DKW-15	5,650	0,000	5,600	5,63
C-DKW-30	3,500	4,800	5,600	4,63
C-DKW-45	3,500	4,000	0,000	3,83
C-DKW-60	0,000	3,100	2,500	2,80
TESTIGO	14,140	14,475	16,500	15,08

Nota: Viabilidad de los tratamientos

Desarrollo a los 36 días															
Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T1	0,76	0,83		0,67	0,69		0,68	0,62	0,79	0,74	0,82		0,66	0,55	0,73
T2		0,46	0,63	0,51	0,55	0,57	0,64	0,55	0,38			0,52	0,56	0,34	
T3		0,32		0,34	0,37	0,31	0,37	0,41			0,33	0,41	0,35		0,37
T4		0,18	0,11			0,13		0,15		0,11	0,2	0,17			0,15
T5	1,12	0,98	0,84		0,1,05		0,96		0,99	1,21	1,36		0,95	0,97	
T6	0,64	0,71				0,69			0,58			0,7		0,67	0,58
T7		0,33		0,55	0,48	0,36		0,41					0,35		0,42
T8		0,28							0,26					0,31	
T9					0,64	0,57									
T10								0,51					0,59		
T11	0,57													0,6	
T12			0,42												
T13	0,53		0,6									0,56			
T14				0,35		0,48							0,56		
T15		0,35					0,38	0,42							
T16						0,31								0,25	
TESTIGO	1,43	1,84	0,98	1,38	1,44	1,28		1,52	1,43	1,56	1,62	1,6	1,63	1,81	1,59

% DE VIABILIDAD				
Tratamientos	R1	R2	R3	PROMEDIO
R-MS-15	80	80	80	80,0
R-MS-30	80	80	60	73,3
R-MS-45	60	60	80	66,7
R-MS-60	40	60	60	53,3
R-DKW-15	80	60	60	66,7
R-DKW-30	40	40	60	46,7
R-DKW-45	40	40	40	40,0
R-DKW-60	20	20	20	20,0
C-MS-15	20	20	0	13,3
C-MS-30	0	20	20	13,3
C-MS-45	20	0	20	13,3
C-MS-60	20	0	0	6,7
C-DKW-15	40	0	20	20,0
C-DKW-30	20	20	20	20,0
C-DKW-45	20	40	0	20,0
C-DKW-60	0	20	20	13,3
TESTIGO	100	100	80	93,3

Nota: Registro de desarrollo de los explantes vegetales viables.

Medidas resumen										
TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	Min	Máx				
C-DKW-15	Desarrollo (mm)	2	5,63	0,04	5,60	5,65				
C-DKW-30	Desarrollo (mm)	3	4,63	1,06	3,50	5,60				
C-DKW-45	Desarrollo (mm)	2	3,75	0,35	3,50	4,00				
C-DKW-60	Desarrollo (mm)	2	2,80	0,42	2,50	3,10				
C-MS-15	Desarrollo (mm)	2	6,05	0,49	5,70	6,40				
C-MS-30	Desarrollo (mm)	2	5,50	0,57	5,10	5,90				
C-MS-45	Desarrollo (mm)	2	5,85	0,21	5,70	6,00				
C-MS-60	Desarrollo (mm)	1	4,20	0,00	4,20	4,20				
R-DKW-15	Desarrollo (mm)	3	10,42	0,57	9,80	10,93				
R-DKW-30	Desarrollo (mm)	3	6,53	0,20	6,35	6,75				
R-DKW-45	Desarrollo (mm)	3	4,08	0,39	3,85	4,53				
R-DKW-60	Desarrollo (mm)	3	2,83	0,25	2,60	3,10				
R-MS-15	Desarrollo (mm)	3	7,12	0,24	6,90	7,38				
R-MS-30	Desarrollo (mm)	3	5,15	0,36	4,73	5,38				
R-MS-45	Desarrollo (mm)	3	3,57	0,12	3,43	3,65				
R-MS-60	Desarrollo (mm)	3	1,49	0,22	1,30	1,73				
TESTIGO	Desarrollo (mm)	3	15,04	1,28	14,14	16,50				
Análisis de la varianza										
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV						
Desarrollo (mm)	43	0,98	0,97	9,76						
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)										
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor					
Modelo	467,16	16	29,20	93,61	<0,0001					
TRATAMIENTOS	467,16	16	29,20	93,61	<0,0001					
Error	8,11	26	0,31							
Total	475,27	42								
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,97930										
Error: 0,3119 gl: 26										
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.							
TESTIGO	15,04	3	0,32	A						
R-DKW-15	10,42	3	0,32	B						
R-MS-15	7,12	3	0,32	C						
R-DKW-30	6,53	3	0,32	C	D					
C-MS-15	6,05	2	0,39	C	D	E				
C-MS-45	5,85	2	0,39	C	D	E				
C-DKW-15	5,63	2	0,39	C	D	E	F			
C-MS-30	5,50	2	0,39	C	D	E	F	G		
R-MS-30	5,15	3	0,32	C	D	E	F	G		
C-DKW-30	4,63	3	0,32		D	E	F	G	H	
C-MS-60	4,20	1	0,56			E	F	G	H	
R-DKW-45	4,08	3	0,32			E	F	G	H	
C-DKW-45	3,75	2	0,39				F	G	H	
R-MS-45	3,57	3	0,32					G	H	
R-DKW-60	2,83	3	0,32						H	I
C-DKW-60	2,80	2	0,39						H	I
R-MS-60	1,49	3	0,32							I
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)										

Nota: Estadística del % de Viabilidad.

Medidas resumen						
TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
R-DKW-15	% DE VIAVILIDAD	3	66,67	11,55	60,00	80,00
R-DKW-30	% DE VIAVILIDAD	3	46,67	11,55	40,00	60,00
R-DKW-45	% DE VIAVILIDAD	3	40,00	0,00	40,00	40,00
R-DKW-60	% DE VIAVILIDAD	3	20,00	0,00	20,00	20,00
R-MS-15	% DE VIAVILIDAD	3	80,00	0,00	80,00	80,00
R-MS-30	% DE VIAVILIDAD	3	73,33	11,55	60,00	80,00
R-MS-45	% DE VIAVILIDAD	3	66,67	11,55	60,00	80,00
R-MS-60	% DE VIAVILIDAD	3	53,33	11,55	40,00	60,00
C-DKW-15	% DE VIAVILIDAD	3	20,00	20,00	0,00	40,00
C-DKW-30	% DE VIAVILIDAD	3	20,00	0,00	20,00	20,00
C-DKW-45	% DE VIAVILIDAD	3	20,00	20,00	0,00	40,00
C-DKW-60	% DE VIAVILIDAD	3	13,33	11,55	0,00	20,00
C-MS-15	% DE VIAVILIDAD	3	13,33	11,55	0,00	20,00
C-MS-30	% DE VIAVILIDAD	3	13,33	11,55	0,00	20,00
C-MS-45	% DE VIAVILIDAD	3	13,33	11,55	0,00	20,00
C-MS-60	% DE VIAVILIDAD	3	6,67	11,55	0,00	20,00
TESTIGO	% DE VIAVILIDAD	3	93,33	11,55	80,00	100,00
Análisis de la varianza						
	Variable	N	R²	R² Aj	CV	
	% DE VIAVILIDAD	54	0,91	0,87	27,21	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
	Modelo	46614,81	16	2913,43	22,46	<0,0001
	TRATAMIENTOS	46614,81	16	2913,43	22,46	<0,0001
	Error	4800,00	37	129,73		
	Total	51414,81	53			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=33,96741						
Error: 129,7297 gl: 37						
TRATAMIENTOS Medias n E.E.						
	TESTIGO	93,33	6	4,65	A	
	R-MS-15	80,00	3	6,58	A B	
	R-MS-30	73,33	3	6,58	A B C	
	R-MS-45	66,67	3	6,58	A B C	
	R-DKW-15	66,67	3	6,58	A B C	
	R-MS-60	53,33	3	6,58	B C D	
	R-DKW-30	46,67	3	6,58	B C D E	
	R-DKW-45	40,00	3	6,58	C D E F	
	C-DKW-30	20,00	3	6,58	D E F	
	C-DKW-45	20,00	3	6,58	D E F	
	C-DKW-15	20,00	3	6,58	D E F	
	R-DKW-60	20,00	3	6,58	D E F	
	C-MS-15	13,33	3	6,58	E F	
	C-MS-45	13,33	3	6,58	E F	
	C-MS-30	13,33	3	6,58	E F	
	C-DKW-60	13,33	3	6,58	E F	
	C-MS-60	6,67	3	6,58	F	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

Nota: Estadística del desarrollo.

ANEXO 7. EVIDENCIAS DE LO APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS



Nota: Tratamientos de semillas sintéticas



Nota: Tratamientos de semillas sintéticas



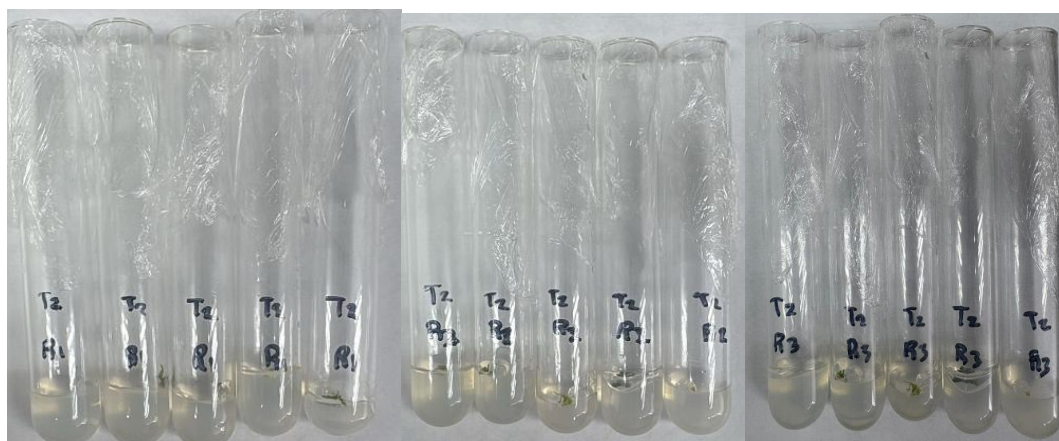
Nota: Tratamientos de yemas meristemáticas en crioconservación



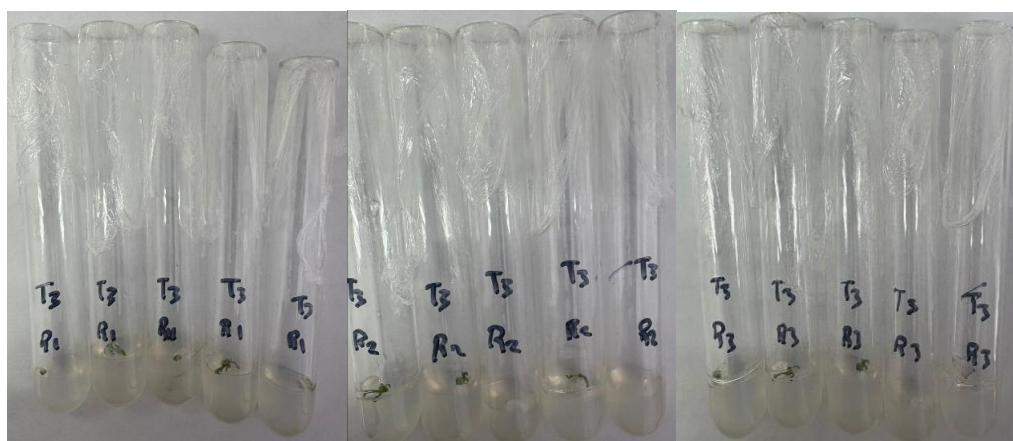
Nota: Parcelas de desarrollo



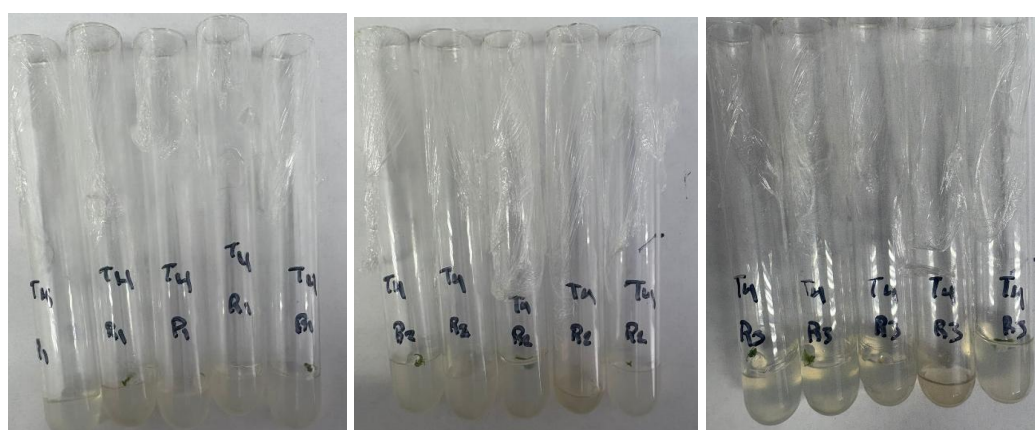
Nota: Tratamiento AGAR+MS+15 DÍAS (45 días de desarrollo)



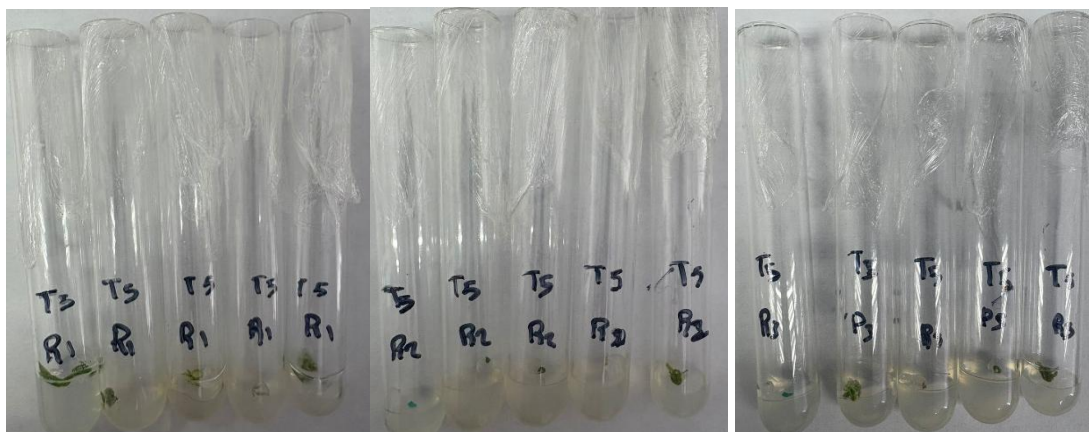
Nota: Tratamiento AGAR+MS+30 DÍAS



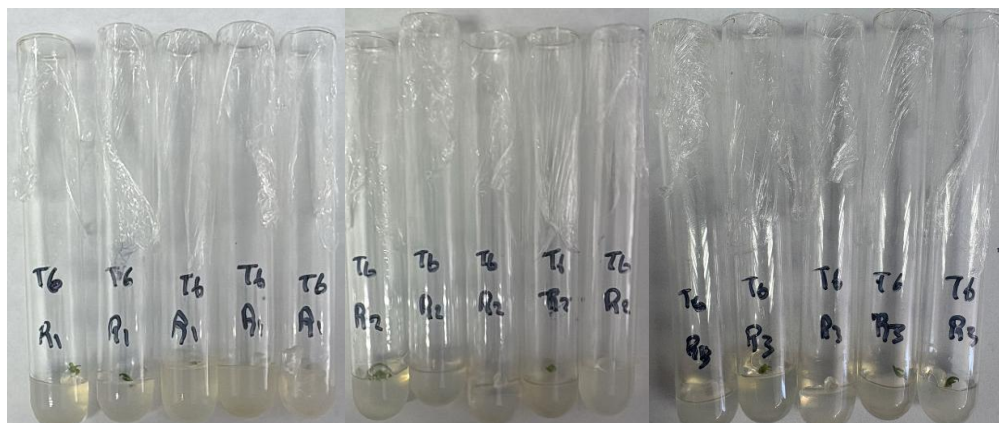
Nota: Tratamiento AGAR+MS+45 DÍAS



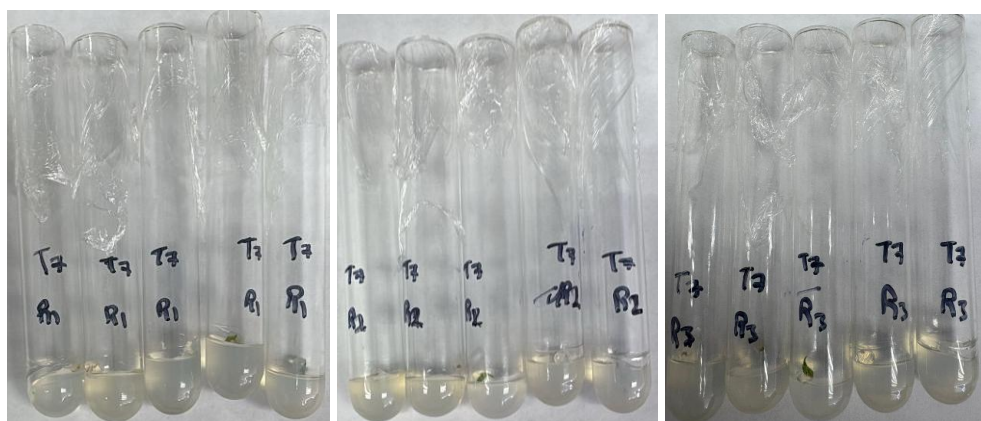
Nota: Tratamiento AGAR+MS+60 DÍAS



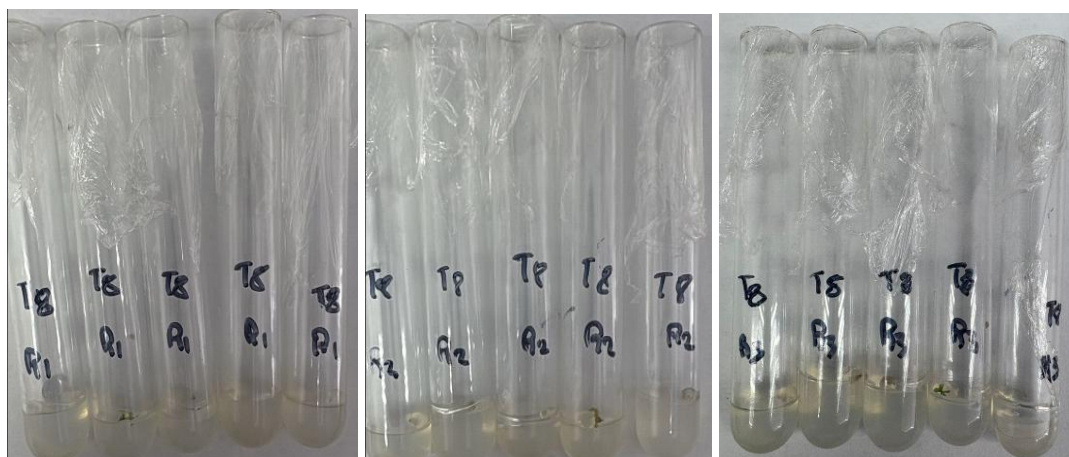
Nota: Tratamiento AGAR+DKW+15 DÍAS



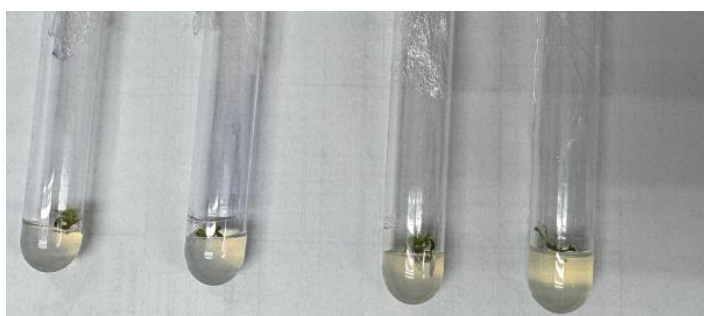
Nota: Tratamiento AGAR+DKW+30 DÍAS



Nota: Tratamiento AGAR+DKW+45 DÍAS



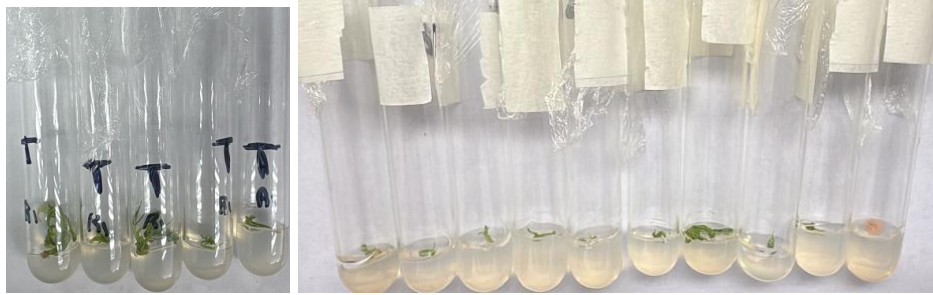
Nota: Tratamiento AGAR+DKW+60 DÍAS



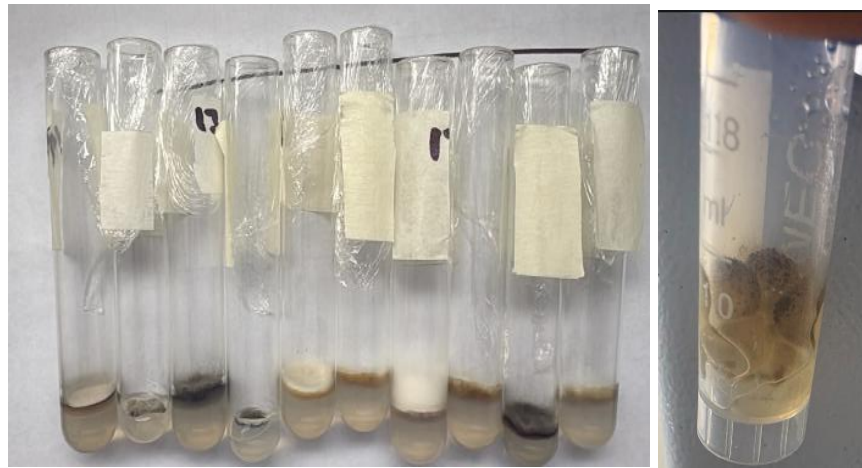
Nota: Comparación Crioconservación+MS – 15, 30, 45, 60 DÍAS



Nota: Comparación Crioconservación+DKW – 15, 30, 45, 60 DÍAS



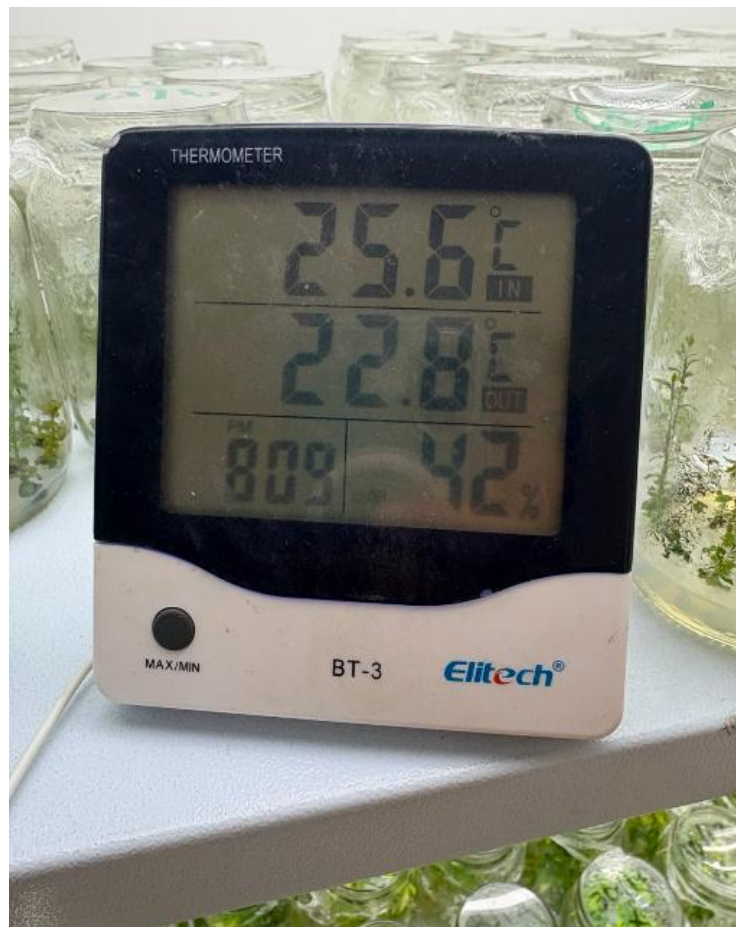
Nota: Tratamiento TESTIGO 0 DÍAS



Nota: Contaminaciones



Nota: Preparación de soluciones



Nota: Temperatura del cuarto de desarrollo



Nota: Plantas de *C. sativa* 100% critical CBD





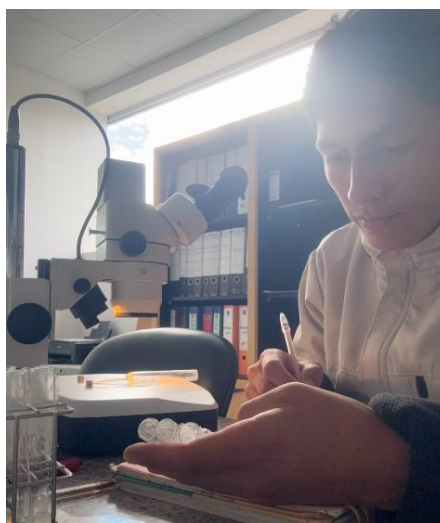
Nota: Equipos usados



Nota: Area de trabajo



Nota: Criopreservante (vitrificante)



Nota: Evidencias de trabajo