

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**TEMA:**  
**“Micropropagación *in vitro* de la especie vegetal *Desmodium molliculum*.”**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO EN  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR:**

**MARIO PAUL COBO ENRÍQUEZ**

**DIRECTOR:**

**Ing. MARÍA CRISTINA HECHEVERRÍA DE LABASTIDA. PhD**

**Ibarra – Ecuador  
2025**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	1005048887		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Cobo Enríquez Mario Paul		
<b>DIRECCIÓN:</b>	El Retorno - Ibarra		
<b>EMAIL:</b>	mopcoboe@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>		<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0979470765

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	“Micropropagación <i>in vitro</i> de la especie vegetal <i>Desmodium molliculum</i> .”
<b>AUTOR (ES):</b>	Mario Paul Cobo Enríquez
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	05/08/2025
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniera en Biotecnología
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Echeverría De Labastida María Cristina

## 1. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 05 días del mes de Agosto del 2025

EL AUTOR



MARIO PAUL COBO ENRÍQUEZ

C.C.: 1005048887

## CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 04 de Agosto de 2025.

Ing. MARÍA CRISTINA ECHEVERRÍA DE LABASTIDA. PhD

DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, elmismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



*(f)* .....

Ing. ECHEVERRÍA DE LABASTIDA MARÍA CRISTINA. PhD

*C.C.: 1717917189*

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular  
“Micropropagación *in vitro* de la especie vegetal *Desmodium molliculum*.”  
elaborado por Mario Paul Cobo Enríquez, previo a la obtención del título de  
Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación  
en nombre de la Universidad Técnica del Norte



(f): .....

Ing. ECHEVERRÍA DE  
LABASTIDA MARÍA  
CRISTINA. PhD

C.C.: 1717917189



(f): .....

Ing. CHIMBO  
YÉPEZ GABRIEL  
ALEJANDRO. MSc

C.C.: 1721444196

## PRESENTACIÓN

Yo, Mario Paul Cobo Enríquez como autor de la Tesis Titulada “**Micropropagación *in vitro* de la especie vegetal *Desmodium molliculum*.**”, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a quienes han sido guía y compañía en este proceso académico y personal.

A mis maestros, y en especial a mi director de tesis y tutor, gracias por ser faros de conocimiento, por su acompañamiento paciente y por sembrar en mí la pasión por la ciencia. Su orientación ha sido clave en este camino.

A Mary Cevallos, gracias por tu confianza, tu apoyo constante y tu infinita paciencia. Creíste en mí incluso cuando dudé, y eso hizo toda la diferencia.

A mi compañera de vida, Yuli Rodríguez, gracias por estar a mi lado en cada dificultad, por escucharme, calmarme y darme fuerza en los momentos más turbulentos. Tu presencia ha sido un refugio imprescindible.

A mi familia, por ser mi motor. A mi mamita, gracias por tu comprensión y por aligerar mi carga con tu paciencia. A mis hermanos Eve, Oli y Pau, por estar presentes y ser apoyo en silencio.

A mis amigos Karen, Jhostin, Dani, Jorge y Danjhely, gracias por los años compartidos, por hacer más llevaderos los días difíciles, por las risas y los trabajos en equipo que hoy se convierten en valiosos recuerdos.

A todos ustedes, gracias por ser parte de este logro. Este trabajo lleva mucho más que mi nombre: lleva el eco de su apoyo y su amor.

## LISTA DE SIGLAS.

**BAP:** 6-bencilaminopurina

**ANA:** ácido 1-naftalenacético

**IAA:** ácido indol-3-acético

**2.4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**KIN:** Kinetina

**ZEA:** Zeatina

**IBA:** ácido indol-3-butírico

**MS:** Murashige y Skoog

**MSB:** Murashige y Skoog Basal

**GA3:** ácido giberélico

**PD:** Protocolo de Desinfección

**PM:** Protocolo de Multiplicación

**EC:** Ecuación

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA.....	2
2. CONSTANCIAS.....	3
CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DEINTERGRACIÓN CURRICULAR .....	4
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR .....	V
PRESENTACIÓN .....	VI
AGRADECIMIENTO .....	VII
LISTA DE SIGLAS.....	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE ANEXOS .....	13
RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	15
CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1 Planteamiento del problema .....	16
1.2 Justificación.....	17
1.3 Objetivos.....	18
1.3.1 Objetivo general. ....	18
1.3.2 Objetivos específicos.....	18
1.4 Pregunta de investigación.....	18
CAPÍTULO II.....	19
2. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1 <i>Desmodium molliculum</i> .....	19
2.1.1 Generalidades .....	19
2.1.2 Morfología y descripción botánica .....	20
2.1.3 Importancia medicinal y propiedades bioactivas.....	21
2.2 Introducción <i>in vitro</i> de fabáceas.....	22
2.3 Escarificación de semillas .....	23
2.4 Importancia del proceso de desinfección de semillas.....	23
2.5 Importancia del equilibrio entre reguladores de crecimiento .....	23
2.5.1 Sinergias y antagonismos entre fitohormonas .....	24

2.6	Importancia del enraizamiento en cultivo <i>in vitro</i> .....	24
CAPÍTULO III .....		26
3.	METODOLOGÍA .....	26
3.1	Descripción del área de estudio .....	26
3.2	Recolección del material vegetal.....	26
3.3	Formulación del medio de cultivo para germinación de semillas .....	27
3.4	Desinfección de las semillas.....	28
3.5	Escarificación <i>in vitro</i> de las semillas .....	28
3.6	Siembra <i>in vitro</i> de semillas .....	29
3.7	Formulación del medio de cultivo para multiplicación de explantes (nodos) 30	
3.8	Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de nodos.....	30
3.9	Resiembras de enraizamiento y mantenimiento .....	31
3.10	Análisis estadístico .....	31
CAPÍTULO IV .....		32
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1.	Desinfección de semillas de <i>D. molliculum</i> .....	32
4.1	Germinación <i>in vitro</i> de <i>D. molliculum</i> .....	34
4.2	Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de <i>D. molliculum</i> .....	36
4.3	Enraizamiento.....	39
CAPÍTULO V.....		40
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
5.1	Conclusiones.....	40
5.2	Recomendaciones .....	41
REFERENCIAS .....		42
ANEXOS .....		47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Distribución geográfica de <b>Desmodium molliculum</b></i> .....	19
Figura 2. <i>Morfología de <b>Desmodium molliculum</b></i> .....	21
Figura 3. <i>Punto de muestreo en la parroquia “La Esperanza”</i> .....	27
Figura 4. <i>Escarificación de semillas de <b>D. molliculum</b></i> .....	29
Figura 5. <i>Porcentaje de desinfección de semillas de <b>D. molliculum</b> según tratamiento</i> .....	33
Figura 6. <i>Porcentaje de germinación de semillas de <b>D. molliculum</b> por tratamiento</i> .....	34
Figura 7. <i>Periodos de germinación y crecimiento de las plántulas in vitro de <b>D. molliculum</b></i> .....	36
Figura 8. <i>Comparación del número promedio de brotes por tratamiento hormonal en <b>D. molliculum</b></i> .....	38
Figura 9. <i>Número medio de brotes por tratamiento</i> .....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Sinergia y antagonismo entre auxinas y citoquininas</i> .....	24
Tabla 2. <i>Modificación del medio basal Murashige y Skoog (MS) para la germinación de semillas</i> .....	28
Tabla 3. <i>Tratamientos de desinfección de semillas</i> .....	28
Tabla 4. <i>Tratamientos del efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de nodos</i> .....	30
Tabla 5. <i>Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de brotes</i> .....	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación morfológica de la especie vegetal.....	47
Anexo 2. Formulación del medio Murashige y Skoog Basal (MSB).....	48
Anexo 3. Análisis de varianza Kruskal - Wallis de la tasa de desinfección de las semillas .....	48
Anexo 4. Análisis de varianza ANOVA del número de brotes.....	49
Anexo 5. Análisis Tukey post-hoc por fitohormonas.....	49
Anexo 6. Comparación de tratamientos con BAP frente al C-.....	50

## RESUMEN

*Desmodium molliculum* es una especie medicinal de alto valor etnobotánico, ampliamente utilizada en comunidades indígenas del Ecuador. Sin embargo, su aprovechamiento depende exclusivamente de la recolección silvestre, lo que limita su disponibilidad, conservación y potencial aprovechamiento biotecnológico. En este contexto, el presente estudio planteó el establecimiento de un protocolo de micropropagación *in vitro* como estrategia para su domesticación y uso sostenible. Se evaluaron nueve tratamientos de desinfección de semillas, obteniéndose un 100 % de germinación sin contaminación utilizando hipoclorito de sodio al 4 % durante 2 minutos. Para la fase de multiplicación, se compararon diferentes citoquininas (BAP, KIN y 2IP), determinando que BAP a 0.1 mg/L promovió la mayor proliferación de brotes. Además, se observó enraizamiento espontáneo en medio MS a media concentración, sin necesidad de aplicar auxinas exógenas. Los resultados obtenidos evidencian el potencial de *D. molliculum* para su propagación masiva mediante técnicas de cultivo *in vitro* y sientan las bases para futuras investigaciones orientadas a la aclimatación, caracterización fitoquímica y evaluación bioactiva de esta especie nativa.

**Palabras clave:** *Desmodium molliculum*, Micropropagación, Citoquininas, germinación de semillas *in vitro*, cultivo de tejidos vegetales.

## ABSTRACT

*Desmodium molliculum* is a medicinal species of high ethnobotanical value, widely used by Andean communities in Ecuador. However, its utilization relies exclusively on wild collection, which limits its availability, conservation, and potential for biotechnological applications. In this context, the present study aimed to establish an *in vitro* micropropagation protocol as a strategy for the domestication and sustainable use of the species. Nine seed disinfection treatments were evaluated, with the most effective (4% sodium hypochlorite for 2 minutes) achieving 100% germination without contamination. For the shoot multiplication phase, different cytokinins (BAP, KIN, and 2IP) were compared, with 0.1 mg/L BAP promoting the highest shoot proliferation. Additionally, spontaneous rooting was observed on half-strength MS medium without the need for exogenous auxins. These findings highlight the potential of *D. molliculum* for mass propagation through plant tissue culture techniques and provide a foundation for future studies focused on acclimatization, phytochemical profiling, and bioactivity evaluation of this native species.

**Keywords:** *Desmodium molliculum*, *in vitro* micropropagation, cytokinins, *in vitro* seed germination, plant tissue culture.

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Planteamiento del problema

En la mayoría de las comunidades rurales del Ecuador, el uso de plantas medicinales ancestrales constituye una base fundamental de sus prácticas de salud, siendo uno de los principales métodos de tratamiento y curación de enfermedades (Gallegos, 2017). Sin embargo, la presión de los nuevos conocimientos de medicina convencional y su desfamiliarización con las prácticas ancestrales ha ocasionado que se cuestione la eficiencia y seguridad de este método (Paz & Marcela, 2015).

Del mismo modo la ausencia de estudios científicos rigurosos acerca de las propiedades medicinales de las plantas ha contribuido a este cuestionamiento (Herrera López et al., 2018), subestimando el enorme potencial medicinal y económico de muchas especies de plantas consideradas maleza (Olascuaga-Castillo et al., 2020). Muchas plantas no reconocidas como especies medicinales han sido utilizadas durante miles de años por nuestros antepasados y en la actualidad solo el 16% de las plantas que se cree que tienen valor terapéutico han sido estudiadas a fondo para comprobar su actividad biológica (Davis & Choisy, 2024). Esta situación puede resultar contraproducente para la salud de las personas cuando el conocimiento de los principios activos de las plantas que consumen es limitado (Gallegos, 2017).

Muchas plantas como *Desmodium molliculum* comúnmente desestimada como una mala hierba, posee un amplio potencial medicinal que ha sido infravalorado en la actualidad (Olascuaga-Castillo et al., 2020). Por otra parte, a medida que aumenta la demanda global de productos naturales, el garantizar un suministro sostenible constante de materia prima vegetal de alta calidad se vuelve un desafío cada vez mayor (Thandar, 2022).

## 1.2 Justificación

A nivel mundial el biodescubrimiento de recursos nacionales tales como plantas medicinales y el conocimiento biocultural indígena se ha vuelto cada vez más notorio por su enorme contribución en el reconocimiento al valor de la biodiversidad (Turpin et al., 2022).

Las plantas medicinales seguirán siendo una de las principales fuentes de medicamentos, sin embargo, la mayor parte de estas se obtienen de manera silvestre, amenazando la diversidad de estas plantas (Moraes et al., 2021), y la especie vegetal *D. molliculum* no es la excepción, por ello el desarrollo de biomasa cultivada en laboratorio se vuelve una necesidad primordial para la producción continua de medicamentos sin vulnerar la biodiversidad (Olascuaga Castillo et al., 2023).

La micropropagación *in vitro* se considera uno de los métodos más eficientes y aplicables para la producción a gran escala de plantas en menor tiempo y con bajos costos (Moraes et al., 2021). La domesticación de *D. molliculum* permitirá el fácil acceso a la materia prima de la planta en condiciones óptimas para el mantenimiento del germoplasma y el estudio posterior de sus componentes y bioactividades (Sharma et al., 2021), mejorando la eficacia, seguridad y accesibilidad de las propiedades benéficas de esta especie y así mejorar la calidad de vida de las personas.

El presente estudio plantea la micropropagación *in vitro* como una solución por parte de la biotecnología vegetal para domesticar plantas medicinales ancestrales como *D. molliculum*, y de esta manera aprovechar sus propiedades bioactivas para ofrecer una alternativa más segura y sostenible a las comunidades rurales. Esta iniciativa busca no solo revalorizar y rescatar el conocimiento ancestral, sino también brindar una opción viable y científicamente validada para los tratamientos de salud en estas comunidades.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general.**

Realizar micropropagación *in vitro* para *Desmodium molliculum* a partir de semillas.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Estandarizar un protocolo de desinfección para explantes de *D. molliculum*.

Multiplicar de manera *in vitro* la especie vegetal *D. molliculum*.

### **1.4 Pregunta de investigación**

¿El crecimiento de *Desmodium molliculum* en condiciones *in vitro* es viable?

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

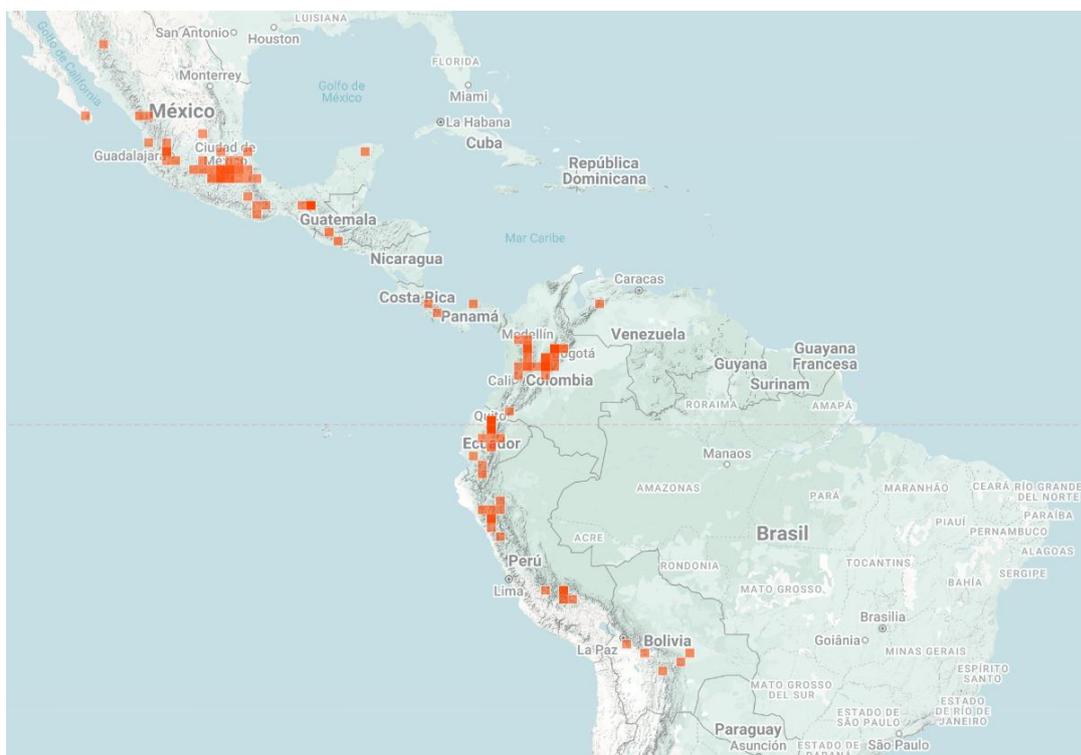
#### 2.1 *Desmodium molliculum*

##### 2.1.1 Generalidades

*Desmodium molliculum* es una importante especie del género *Desmodium* que ha sido ampliamente utilizada como medicina ancestral (Olascuaga-Castillo et al., 2020), valorada por sus propiedades curativas para enfermedades renales, hepáticas y digestivas (Paniagua-Zambrana et al., 2020).

Aunque es una especie originaria de Perú, se distribuye por toda América desde México hasta Bolivia (Paniagua-Zambrana et al., 2020). **Figura 1.** Es considerada maleza y habita en pastizales andinos y pie montanos (Mendoza et al., 2019). En Ecuador se puede encontrar en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, y Tungurahua (G. Aguirre et al., 2019)

**Figura 1.**  
*Distribución geográfica de **Desmodium molliculum**.*



Nota: Obtenida de “Plants of the World Online, (iNaturalist, 2016)”

Es conocida por varios nombres como: “amor seco”, “pie de perro”, “pata de perro”, “Manayupa”, “hierva de infante”, “muña”, entre otras y es una planta andina que

crece entre los 1000 y 3500 m de altura (Bussmann & Sharon, 2018). Su nombre científico deriva de la palabra griega *desmos* que significa “liga o banda” y el epíteto *molliculum* que significa “suavemente peludo” refiriéndose a las enredaderas con pequeños pelillos que la conforman (Olascuaga-Castillo et al., 2020).

*Desmodium molliculum* fue clasificada taxonómicamente por Karl Sigismund Kunth en 1825, de acuerdo con Schoch et al., (2020) aún mantiene la siguiente clasificación:

Reino: *Plantae*

Filo: *Tracheophyta* (Plantas Vasculares)

Subfilo: *Angiospermae* (Plantas con Flores)

Clase: *Magnoliopsida* (Magnolias, Margaritas y parientes dicotiledóneas)

Orden: *Fabales* (Leguminosas, Hierbas Lecheras y Afines)

Familia: *Fabaceae* (Leguminosas)

Subfamilia: *Faboideae* (Habas, Frijoles, Tréboles y Parientes)

Tribu: *Desmodieae*

Subtribu: *Desmodiinae*

Género: *Desmodium* (Pegapegas o Amores Secos)

Especie: *Desmodium molliculum* (Amor Seco)

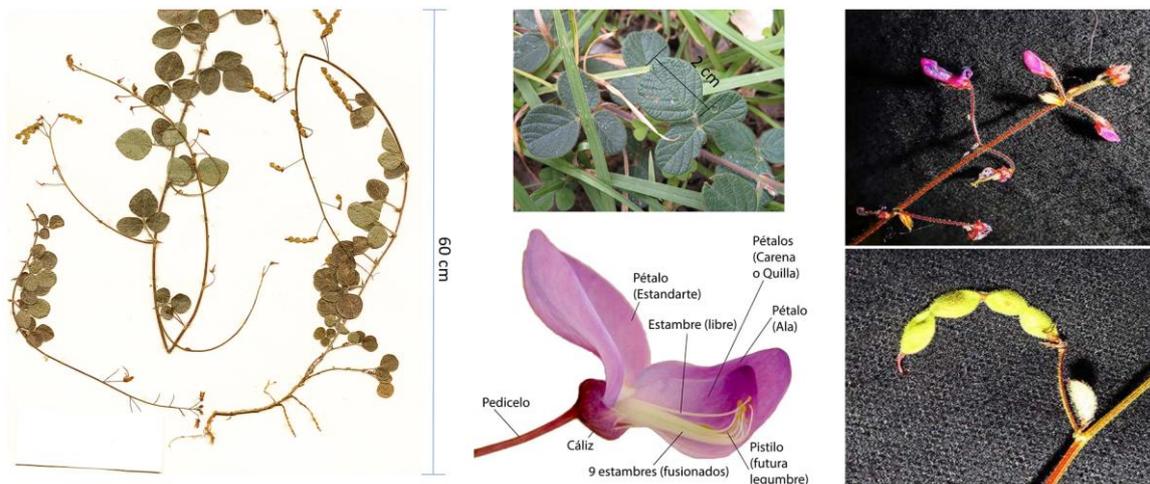
### **2.1.2 Morfología y descripción botánica**

Planta perenne rastrera que crece hasta los 60 cm de alto, cuenta con un sistema radicular pivotante con una raíz primaria gruesa que penetra el suelo (Quiróz, 2019). Tiene un tallo erecto ramificado recostado en el suelo con pelillos en forma de gancho (Z. Aguirre, 2015). Sus hojas son compuestas, cuentan con 3 folíolos ligeramente curvados hacia atrás (Paniagua-Zambrana et al., 2020) cuya hoja central es más grande que las laterales, estípula en la base y forma acorazonada con textura aterciopelada (Olascuaga-Castillo et al., 2020).

Las flores son pequeñas de color blanco o rosado agrupadas en racimos axilares o terminales (Mendoza et al., 2019), cuentan con un cáliz dentado zigomorfo con 5 sépalos

(Quiróz, 2019), una corola formada por un estandarte o pétalo principal y alas oblicuas rectangulares que recubren la quilla, forma 10 estambres con un ovario súpero de un solo estilo (Olascuaga-Castillo et al., 2020). El fruto es una legumbre lineal articulada de 4 o 5 piezas, cada artículo contiene una semilla arriñonada de color café oscuro (Z. Aguirre, 2015). **Figura 2.**

**Figura 2.**  
*Morfología de **Desmodium molliculum**.*



### 2.1.3 Importancia medicinal y propiedades bioactivas

*D. molliculum* es una de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana (Bussmann & Sharon, 2018), esta planta se bebe en infusión o en decocción para desinflamar y limpiar los riñones, el hígado, el sistema urinario, el estómago y los ovarios (Monigatti et al., 2013) ha sido utilizada como especie sedativa que alivia inflamaciones respiratorias, dolor del vientre (Aguirre, 2015; Bussmann & Sharon, 2018), infecciones persistentes de la piel tales como micosis y acné, mejorar las funciones de los riñones, tradicionalmente se utiliza para desinfectar las heridas y para regular el sangrado excesivo de las menstruaciones (Mendoza et al., 2019; Paniagua-Zambrana et al., 2020).

Además, de acuerdo con la investigación realizada por Leiva, (2012) la especie *D. molliculum* como leguminosa constituye un componente muy importante del forrajeo de ganado joven ya que cubre sus requerimientos energéticos y favorece una mayor producción de leche.

El género *Desmodium* presenta una amplia gama de flavonoides, alcaloides, terpenoides, esteroides, fenoles, fenilpropanoides, glicósidos y aceites volátiles, a raíz de

estos compuestos se han fabricado diversos hepatoprotectores derivados de este género (George et al., 2024).

*D. molliculum* también conocida como amor seco o pega-pega es una medicina tradicional que posee propiedades bioactivas de tipo antiinflamatorias, cicatrizantes, antivirales, inmunoestimulantes y antitumorales (Olascuaga-Castillo et al., 2020), diurética, calmante, antibacteriana, analgésica, antianémica y emenagoga, características que la convierte en un importante recurso medicinal en Ecuador (Gordillo, 2019; Barreto, 2018).

## **2.2 Introducción *in vitro* de fabáceas**

La familia Fabaceae, comúnmente conocida como leguminosas o legumbres, comprende un grupo de plantas de gran relevancia a nivel alimenticio, agrícola, económico y medicinal. Estas especies juegan un papel fundamental en la fijación biológica de nitrógeno, lo que las convierte en cultivos clave para sistemas agrícolas sostenibles (Rao & Northup, 2009; Munees et al., 2023).

La micropropagación *in vitro* de fabáceas se ha posicionado como una herramienta eficiente para conservar y multiplicar especies de alto valor, ya sean de interés nutricional o farmacológico, especialmente en contextos donde las semillas viables son escasas o de difícil acceso (Sharma et al., 2021).

El cultivo *in vitro* constituye una herramienta biotecnológica fundamental para la conservación y propagación de especies vegetales con potencial medicinal, especialmente dentro de la familia Fabaceae. Este grupo taxonómico incluye numerosas especies subutilizadas que presentan compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, los cuales han sido ampliamente documentados en estudios fitoquímicos (Ali et al., 2020; Prasad, 2017).

La técnica de micropropagación facilita la reproducción clonal de estas especies bajo condiciones asépticas, lo que permite la generación de material vegetal homogéneo y libre de contaminantes, así como el establecimiento de bancos de germoplasma con fines de conservación y producción (Ríos-Iribe et al., 2011).

### **2.3 Escarificación de semillas**

La escarificación de semillas es un método que permite aumentar el porcentaje de germinación de semillas al infligir un daño intencional en la cubierta impermeable de la semilla (Nawrot-Chorabik et al., 2021)

Entre los métodos de escarificación más importante se incluyen la escarificación química, escarificación con calor, y la escarificación mecánica (Kimura, 2012) que se destaca por ser el método más eficiente en cuanto a eliminar la latencia de las semillas (Illescas-Gallegos et al., 2021).

En cultivos *in vitro* la escarificación forma parte de un tratamiento previo en semillas con bajos índices de germinación ya que aumenta la velocidad y frecuencia de germinación de las semillas al romper la dormancia a la fuerza (Pepe et al., 2021; Jarrar et al., 2023).

### **2.4 Importancia del proceso de desinfección de semillas**

Entre los desinfectantes más frecuentes para desinfectar semillas se encuentra el hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones que varían desde 1% a 15%, también se puede utilizar hipoclorito de calcio (CaOCl<sub>2</sub>), Cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) e incluso ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Chawla, 2009; Srivastava et al., 2013).

Al reducir los efectos de factores externos como patógenos y condiciones climáticas adversas, la propagación *in vitro* de semillas se convierte en una herramienta efectiva para la conservación de las características genéticas de especies en peligro (Hesami et al., 2021).

### **2.5 Importancia del equilibrio entre reguladores de crecimiento**

Las fitohormonas juegan un papel crucial en la multiplicación de brotes la adición de auxinas el ácido 1 naftalenacético (ANA), favorece la formación de raíces adventicias, mientras que las citoquininas, como la 6-bencilaminopurina (BAP) o la Kinetina, promueven la proliferación de brotes y la multiplicación de nodos (Srivastava et al., 2013). El equilibrio entre estas fitohormonas es clave para regular la organogénesis,

permitiendo que se controlen los procesos de diferenciación y crecimiento (Sharma et al., 2021).

### 2.5.1 Sinergias y antagonismos entre fitohormonas

Las interacciones entre las auxinas y citoquininas determinan procesos clave como la formación de raíces y brotes, el ciclo celular, y la adaptación a condiciones de estrés como se indica en la **Tabla 1**, estas interacciones pueden actuar de manera opuesta o complementaria, modulando de manera precisa las respuestas fisiológicas de las plantas (Naseem & Dandekar, 2012).

En muchas especies vegetales, el equilibrio adecuado entre BAP y ANA es crucial para mantener un desarrollo equilibrado entre la formación de brotes y la iniciación de raíces, permitiendo una propagación eficiente y homogénea (Cabello Moreno, 2016). Mientras que el BAP incentiva la proliferación de yemas, el ANA ayuda a asegurar que los brotes formados tengan un desarrollo adecuado y puedan enraizarse con éxito (López et al., 2022).

**Tabla 1.**  
*Sinergia y antagonismo entre auxinas y citoquininas.*

Característica	Auxina	Citoquinina	Interacción	Ejemplos
<b>Promoción de raíces</b>	Promueve	Inhibe	Antagonismo	ANA, IAA – BAP, ZEA
<b>Formación de brotes</b>	Inhibe	Promueve	Antagonismo	ANA, 2.4-D – BAP, KIN
<b>Crecimiento de callos</b>	Promueve	Promueve	Sinergismo	ANA, IBA – BAP, ZEA
<b>Organogénesis <i>in vitro</i></b>	Promueve	Promueve	Antagonismo y Sinergismo	ANA, IAA – BAP, KIN
<b>Respuesta a estrés</b>	Inhibe	Promueve	Antagonismo	ANA, IAA – BAP, ZEA
<b>Ciclo celular</b>	Promueve	Promueve	Sinergismo	ANA, IBA – BAP, KIN
<b>Inmunidad</b>	Inhibe	Promueve	Antagonismo	ANA, IAA – BAP, KIN

### 2.6 Importancia del enraizamiento en cultivo *in vitro*

El enraizamiento es un proceso crucial en el cultivo *in vitro*, ya que representa una etapa determinante para el éxito de la micropropagación de plantas (De Klerk, 2002). Durante esta fase, la formación de raíces adventicias es esencial para la absorción de nutrientes y agua, asegurando la supervivencia y el crecimiento de las plántulas tras la transferencia *ex vitro* (Carloni et al., 2024).

La aplicación de auxinas, como el ácido indol 3 butírico (IBA), ha sido un método clásico para inducir el enraizamiento, sin embargo, investigaciones recientes han revelado que las condiciones del cultivo *in vitro*, como la acumulación de etileno y la resiembra en medio con baja cantidad de nutrientes, pueden influir significativamente en la eficacia del enraizamiento y la posterior aclimatación de las plantas (Haygert-Lencina et al., 2017; Ramos Reyes, 2017).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Descripción del área de estudio

La fase de campo o muestreo se realizó en la parroquia “La Esperanza” ubicada en el cantón de Ibarra, provincia de Imbabura (Coordenadas geográficas: 0°16′03″N 78°06′20″W; Coordenadas UTM: 17N 820262,90 33723,80). La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte.

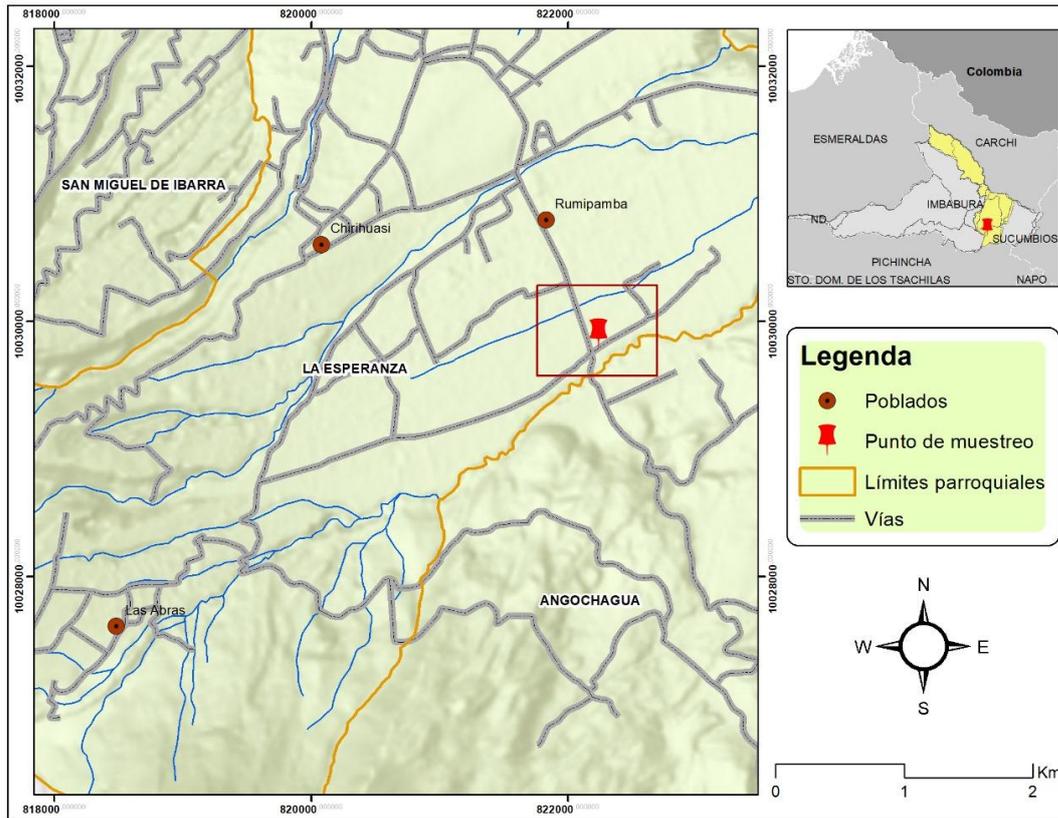
#### 3.2 Recolección del material vegetal

Se recolectaron ejemplares completos de *Desmodium molliculum* a una altitud de 2300 m s. n. m., mediante un muestreo aleatorio dentro del área parroquial delimitada en la **Figura 3**. Posteriormente, las plantas fueron cultivadas in vivo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte que sirvieron como planta madre para la recolección de semillas.

De las plantas recolectadas, una muestra fue entregada en el Herbario perteneciente a la carrera de Ingeniería forestal ubicado en el Campus Yuyucocha de la Universidad Técnica del Norte para su correspondiente identificación y corroboración de la especie **Anexo 1**.

Posteriormente, se recolectaron 300 semillas secas provenientes de plantas maduras con aproximadamente un mes de desarrollo. De este conjunto, se seleccionaron aquellas con mejores características morfológicas, con el fin de garantizar una alta viabilidad en el proceso de germinación.

**Figura 3.**  
*Punto de muestreo en la parroquia “La Esperanza”.*



### 3.3 Formulación del medio de cultivo para germinación de semillas

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó como base el protocolo de medio basal, (Murashige & Skoog, 1962) además, se agregó ácido giberélico (GA3), caseína hidrolizada y carbón activado (Shah et al., 2023), esto se realizó de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 2**.

Posteriormente se dispensó 30 mL del medio en frascos de vidrio de 250 mL y se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 20 minutos a 15 psi de presión.

**Tabla 2.**

*Modificación del medio basal Murashige y Skoog (MS) para la germinación de semillas.*

<b>Componente</b>	<b>Concentración en MS (mg/L)</b>
Ácido giberélico	0.2
Caseína hidrolizada	200
Carbón activado	100

Fuente: Shah et al., (2023); Murashige & Skoog, (1962)

### **3.4 Desinfección de las semillas**

Siguiendo el protocolo descrito por Silva et al., (2015), las semillas se lavaron en agua corriente y después se sumergieron en alcohol al 70% durante 1 minuto con agitación constante. Posteriormente las semillas fueron expuestas a diferentes tratamientos con hipoclorito de sodio por tiempos determinados **Tabla 3**. Transcurrido ese tiempo, se desechó el hipoclorito de sodio y las semillas se sumergieron en agua destilada estéril durante 1 minuto.

**Tabla 3.**

*Tratamientos de desinfección de semillas.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Tween 20 (gotas)</b>	<b>Concentración de NaClO (%)</b>	<b>Tiempos de exposición (min)</b>
<b>PD1</b>	2	2	2
<b>PD2</b>	2	2	4
<b>PD3</b>	2	2	6
<b>PD4</b>	2	3	2
<b>PD5</b>	2	3	4
<b>PD6</b>	2	3	6
<b>PD7</b>	2	4	2
<b>PD8</b>	2	4	4
<b>PD9</b>	2	4	6

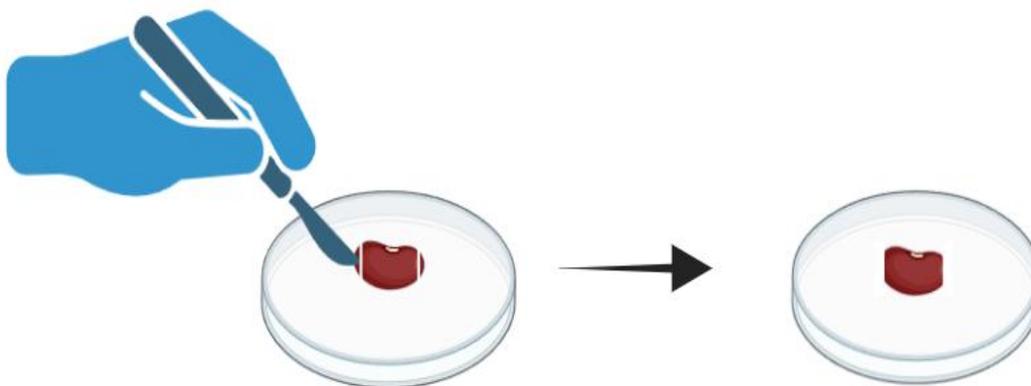
### **3.5 Escarificación in vitro de las semillas**

Para este proceso se utilizó la metodología descrita por Alane et al., (2020). Las semillas desinfectadas se colocaron en placas petri estériles y mediante el uso de un

bisturí, se cortó los extremos del tegumento de cada semilla sin dañar el endospermo ni el embrión como se muestra en la **Figura 4**.

**Figura 4.**

*Escarificación de semillas de *D. molliculum*.*



**3.6 Siembra in vitro de semillas**

Se colocaron 3 semillas en cada frasco permitiendo que la porción nutritiva de la semilla se encuentre en contacto con el medio de cultivo. Se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento en 3 bloques diferentes. Los enayos se realizaron en diferentes semanas.

Las semillas se mantuvieron a 25 °C, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, y una humedad relativa del 80 %, de acuerdo con las condiciones recomendadas por Sharma et al. (2021).

Finalmente, se realizó un seguimiento cualitativo de la presencia o ausencia de germinación y contaminación de las semillas, con evaluaciones cada 7 días durante un período de 30 días. Adicionalmente, se determinaron el porcentaje de germinación (EC1) y el porcentaje de desinfección (EC2) correspondientes a cada tratamiento, conforme a la metodología descrita por Alane et al. (2020).

$$\% G = \frac{\# \text{ Semillas germinadas}}{\# \text{ Total semillas sembradas}} \times 100 \quad \text{EC1}$$

$$\% D = \frac{\# \text{ Semillas desinfectadas}}{\# \text{ Total semillas sembradas}} \times 100$$

EC2

### 3.7 Formulación del medio de cultivo para multiplicación de explantes (nodos)

El medio de cultivo utilizado para la fase de multiplicación el medio basal Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), al cual se añadieron los reguladores de crecimiento específicos para cada tratamiento. Se distribuyeron 30 mL del medio en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad y se esterilizaron en autoclave a 121 °C, durante 15–20 minutos a una presión de 15 psi.

### 3.8 Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de nodos

Para determinar el efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de nodos se añadió las fitohormonas en concentraciones desde 0,1 mg/L hasta 0.2 mg/L siguiendo los tratamientos establecidos en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.**

*Tratamientos del efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de nodos.*

Tratamientos	Citoquininas	Concentración (mg/L)
PM02	BAP	0.1
PM18	BAP	0.15
PM19	BAP	0.2
PM20	KIN	0.1
PM21	KIN	0.15
PM22	KIN	0.2
PM23	2IP	0.1
PM24	2IP	0.15
PM25	2IP	0.2
C-	-	0

Para la siembra en los medios de cultivo de multiplicación de nodos se utilizaron las plántulas *in vitro* de *D. molliculum*, de las cuales se obtuvieron nodos axilares de 0,5 cm a 1 cm de largo.

Posteriormente se sembró 5 nodos axilares en cada frasco de medio de cultivo. Este procedimiento se repitió 3 veces en 3 bloques realizados en diferentes semanas.

Finalmente se evaluó el número de brotes obtenidos por nodo y tamaño de cada brote transcurridos 40 días de crecimiento de acuerdo con lo sugerido por Somkuwar, (2016).

### **3.9 Resiembras de enraizamiento y mantenimiento**

Tras la observación de crecimiento en los explantes, estos fueron transferidos a medio MS (Murashige y Skoog) a media concentración de sales y sin reguladores de crecimiento, con el objetivo de favorecer el desarrollo radicular. Se realizaron subcultivos periódicos en medios frescos para mantener la viabilidad y propagar las plántulas *in vitro* durante su fase de crecimiento.

### **3.10 Análisis estadístico**

Para evaluar la eficacia de los protocolos de desinfección, se realizó un análisis cualitativo basado en la observación de la presencia o ausencia de germinación y de contaminación en las semillas tratadas. Con el objetivo de determinar la influencia de los diferentes tratamientos en la efectividad de la desinfección, se aplicó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Adicionalmente, se calcularon los porcentajes de germinación y de desinfección, permitiendo analizar la relación proporcional entre ambas variables.

Para la evaluación de los protocolos de multiplicación, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) del número promedio de brotes por nodo, tras 40 días de cultivo, con el fin de identificar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar la significancia estadística entre tratamientos y establecer la citoquinina y concentración más eficaces para la inducción de brotes.

El procesamiento y análisis de los datos se realizó utilizando el software estadístico InfoStat y Microsoft Excel.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo detalla los principales hallazgos experimentales relacionados con el establecimiento aséptico, la multiplicación de brotes y la inducción de raíces en cultivos *in vitro* de *Desmodium molliculum*.

#### 4.1. Desinfección de semillas de *D. molliculum*

El análisis estadístico mediante la prueba de chi cuadrado sugiere una relación estadísticamente significativa entre los tratamientos aplicados y el porcentaje de desinfección de las semillas ( $\chi^2 = 25.25$ ;  $p < 0.01$ ). Este resultado indica que la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición influyen en la eficacia de la desinfección. Sin embargo, el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $H = 1.99$ ;  $p > 0.05$ ) (véase Anexo 2) no detectó diferencias significativas en las medianas entre los tratamientos, lo que sugiere que, los tratamientos influyen en la ocurrencia de desinfección, pero no existen diferencias significativas en la magnitud del efecto entre ellos, al menos no detectables con el tamaño de muestra y la variabilidad observada.

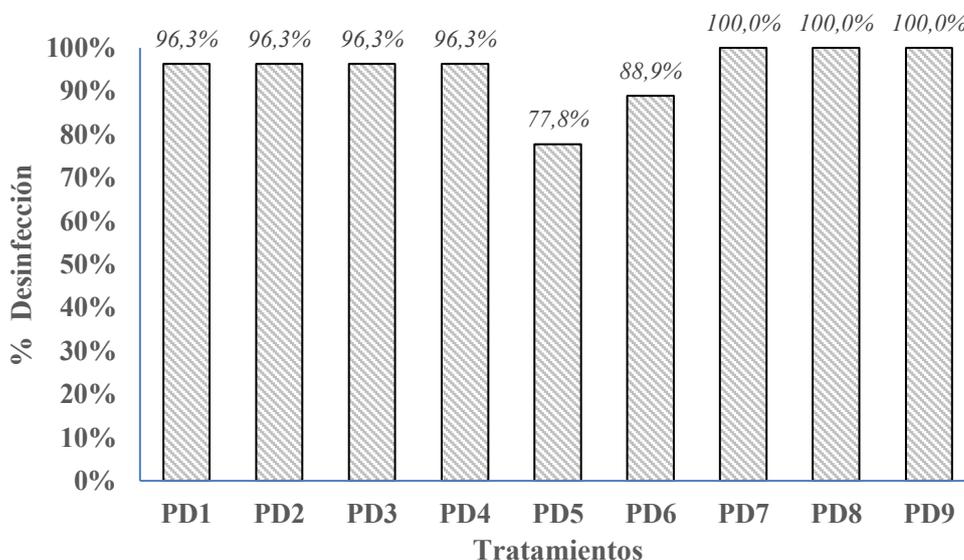
Como se muestra en la **Figura 5**, los tratamientos PD7 (Etanol al 70 % durante 1 minuto + NaClO al 4 % durante 2 minutos), PD8 (Etanol al 70 % durante 1 minuto + NaClO al 4 % durante 4 minutos) y PD9 (Etanol al 70 % durante 1 minuto + NaClO al 4 % durante 6 minutos) lograron una desinfección del 100 %, evidenciando una alta efectividad en el proceso de desinfección. Dado que el tratamiento PD7 fue el de menor duración y presentó la misma eficacia que los tratamientos con mayor tiempo de exposición, se plantea que una exposición de 2 minutos a NaClO al 4 % es suficiente para garantizar una desinfección completa de las semillas de *Desmodium molliculum*, favoreciendo así el establecimiento *in vitro* sin comprometer su viabilidad germinativa.

Asimismo, considerando que no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento PD7 y el tratamiento PD1 (Etanol al 70 % durante 1 minuto + NaClO al 2 % durante 2 minutos), se sugiere que concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio, como el 2 %, también podrían ser eficaces para la desinfección de las semillas, siempre que se mantenga un adecuado tiempo de exposición. No obstante, se recomienda validar esta hipótesis mediante ensayos adicionales con mayor replicación y control de

variables, a fin de confirmar la eficacia del tratamiento con NaClO al 2 % y su posible implementación como una alternativa aún más segura y eficiente.

**Figura 5.**

*Porcentaje de desinfección de semillas de **D. molliculum** según tratamiento.*



A diferencia de lo reportado por Bonilla Sánchez y Mesa López (2018), quienes obtuvieron una tasa de desinfección del 86 % en *Erythrina edulis* (Fabaceae) utilizando alcohol al 70 %, Tween 80 % y HgCl<sub>2</sub> durante 20 minutos, en el presente estudio se lograron porcentajes superiores mediante un protocolo más simple y de menor duración. Esta diferencia destaca la importancia de adaptar cuidadosamente el tipo y la concentración de desinfectantes, así como el tiempo de exposición, según la especie vegetal y el tipo de explante, con el fin de maximizar la eficacia sin generar toxicidad.

A diferencia del protocolo empleado por Thandar et al. (2022), quienes utilizaron hojas de *Desmodium triquetrum* y aplicaron múltiples agentes desinfectantes —incluidos ciprofloxacina y HgCl<sub>2</sub>— con tiempos prolongados, en el presente estudio se trabajó con semillas de *D. molliculum* como material inicial, dadas su facilidad de manipulación, menor carga microbiana y mayor viabilidad fisiológica. Esta elección fue especialmente pertinente considerando que se trata de una especie silvestre no domesticada, cuya recolección se realiza en zonas de difícil acceso, por lo que el uso de semillas representó una estrategia práctica y segura para una primera introducción *in vitro*. Aunque las semillas pueden implicar cierta variabilidad genética y una disponibilidad limitada por

factores estacionales, su uso permitió establecer cultivos asépticos sin recurrir a desinfectantes altamente tóxicos como el HgCl<sub>2</sub>, sentando así una base sólida para etapas posteriores de multiplicación clonal de plántulas seleccionadas.

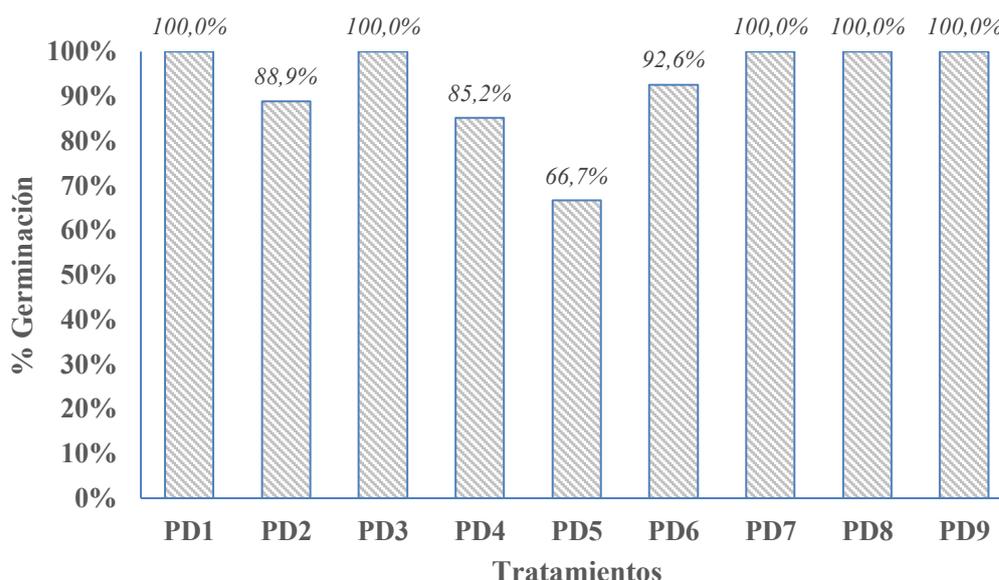
Cabe señalar que, si bien el HgCl<sub>2</sub> es un agente desinfectante eficaz, presenta una alta toxicidad tanto para el material vegetal como para el ambiente, lo que implica riesgos durante su manejo en laboratorio. En contraste, el protocolo aplicado en este estudio (etanol al 70 % seguido de NaClO al 4 % durante 2 minutos) resultó más seguro, sencillo y efectivo, logrando una desinfección del 100 % sin afectar la viabilidad de las semillas. Esta comparación subraya la necesidad de priorizar protocolos específicos por especie, utilizando alternativas menos tóxicas que preserven la integridad fisiológica del material vegetal.

#### **4.1 Germinación *in vitro* de *D. molliculum*.**

Del total de semillas sometidas a los distintos tratamientos de desinfección, se registró una tasa global de germinación del 92,59 %. El análisis por tratamiento mostró que las semillas tratadas con PD1, PD3, PD7, PD8 y PD9 alcanzaron una germinación del 100 % **Figura 6**, evidenciando una alta viabilidad fisiológica y compatibilidad con las condiciones de cultivo *in vitro*. La emergencia radicular y el inicio de la elongación del hipocótilo se observaron entre los días 3 y 5 posteriores a la siembra, mientras que el desarrollo morfológico completo de las plántulas se logró a los 30 días de cultivo **Figura 7**.

**Figura 6.**

Porcentaje de germinación de semillas de *D. molliculum* por tratamiento.



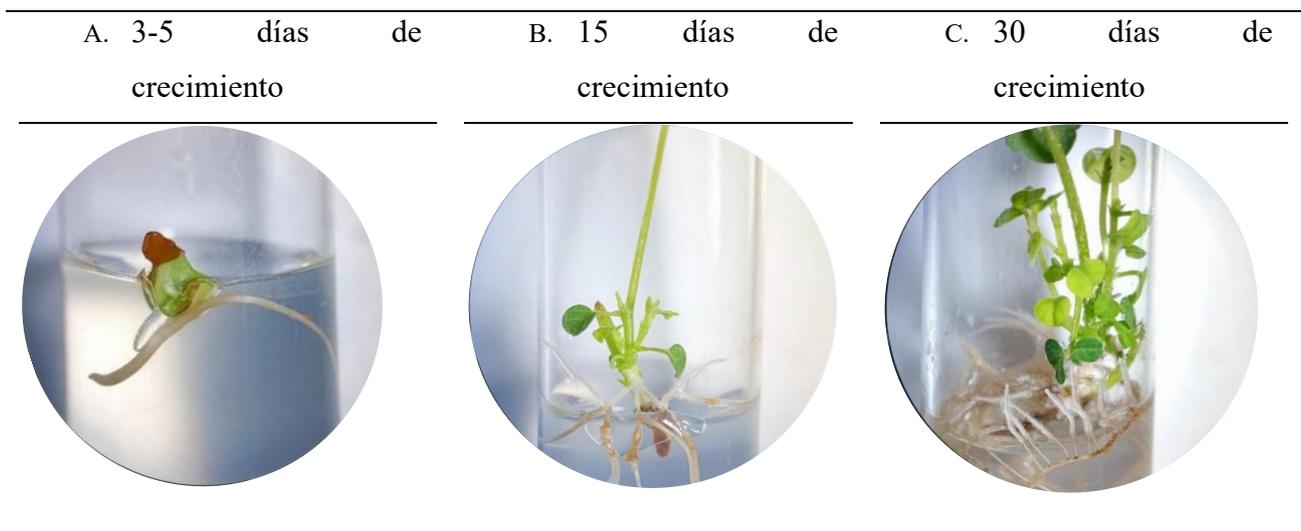
De acuerdo con el estudio realizado por Sharma et al. (2021), en *Desmodium gangeticum* se obtuvo una tasa máxima de supervivencia del 75 % bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Los autores también reportan que la concentración del medio de cultivo influyó significativamente en la germinación, observándose porcentajes más altos en medios con concentración completa de sales. En el presente estudio, se logró una tasa de germinación superior al 90 % en *Desmodium molliculum* a partir de semillas desinfectadas, lo que evidencia una alta viabilidad y adaptación de esta especie a condiciones *in vitro*, y refuerza su potencial para programas de propagación y conservación.

Mientras que Thandar et al. (2022) reportaron una tasa de germinación del 100 % en *Desmodium triquetrum* tras la aplicación de tratamientos de desinfección intensivos, incluyendo el uso de  $\text{HgCl}_2$ , el presente estudio enfatiza la necesidad de equilibrar la eficacia del protocolo de desinfección con la preservación de la viabilidad fisiológica del material vegetal. En este contexto, Shah et al. (2023) demostraron que la aplicación exógena de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) puede mejorar significativamente la tasa de germinación en especies del género *Desmodium*, incluyendo *D. molliculum*, lo que resalta el papel de los reguladores de crecimiento en la optimización del establecimiento *in vitro*. En concordancia con estos hallazgos, en el presente estudio se utilizó un medio MS suplementado con caseína hidrolizada,  $\text{GA}_3$  y carbón activado, lo que contribuyó a obtener tasas de germinación superiores al 90 %. La caseína hidrolizada, como fuente

orgánica de nitrógeno, favoreció el desarrollo inicial de las plántulas, mientras que el  $\text{GA}_3$  actuó en la activación fisiológica de la germinación. Por su parte, el carbón activado permitió adsorber compuestos fenólicos potencialmente inhibitorios y mejorar las condiciones físicas del medio. La combinación de estos aditivos demostró ser efectiva para potenciar la respuesta germinativa y el desarrollo morfológico de *D. molliculum*, evidenciando la importancia de ajustar no solo los protocolos de desinfección, sino también la formulación del medio de cultivo según las necesidades fisiológicas específicas de cada especie.

**Figura 7.**

*Periodos de germinación y crecimiento de las plántulas in vitro de D. molliculum.*

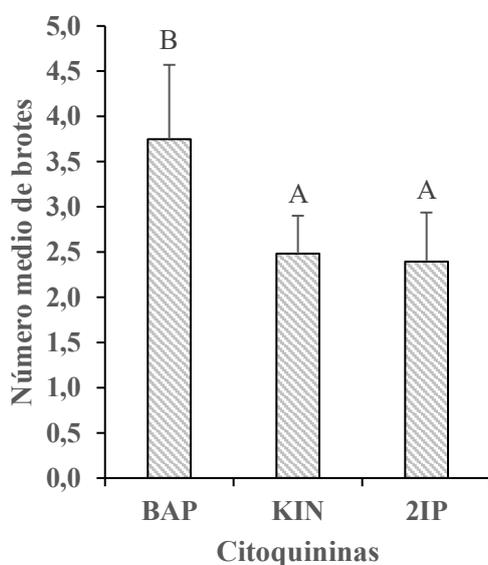


**4.2 Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. molliculum***

Para el análisis de varianza (ANOVA), los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Ahrens et al., 1990), lo que permitió una interpretación estadística más robusta. El análisis reveló diferencias significativas entre las citoquininas evaluadas ( $F = 45,46$ ;  $p < 0.01$ ) (Anexo 3). La prueba post hoc de Tukey confirmó diferencias estadísticamente significativas en la variable “fitohormona” entre los tratamientos **Figura 8**.

**Figura 8.**

*Comparación del número promedio de brotes por tratamiento hormonal en **D. molliculum**.*



Entre las tres citoquininas evaluadas, BAP (6-bencilaminopurina) demostró un rendimiento superior, produciendo el mayor número de brotes en todas las concentraciones probadas. El número promedio de brotes por explante fue notablemente mayor en el tratamiento PM02 (BAP 0,1 mg/L), produciendo  $3.89 \pm 1.35$  brotes en comparación con el control (C-), que produjo  $2.56 \pm 0,92$  brotes, tal como se muestra en la **Tabla 5**. Esto resalta el papel significativo de BAP en la promoción de la proliferación de brotes en las condiciones probadas.

**Tabla 5.**

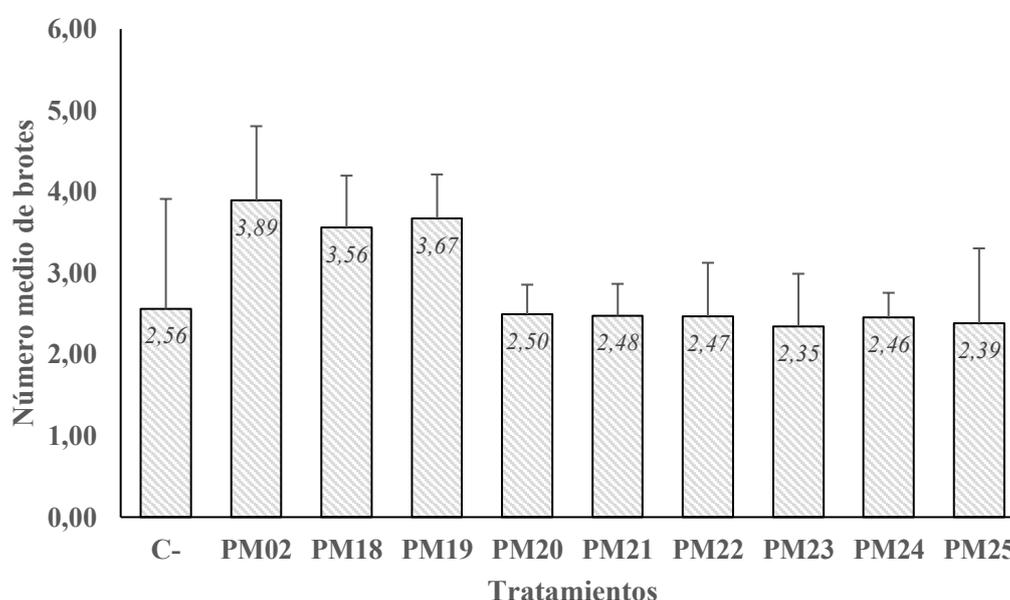
*Efecto de diferentes citoquininas en la multiplicación de brotes.*

Tratamientos	Fitohormona	Concentración (mg/L)	Número de brotes promedio
PM02	BAP	0.1	$3.89 \pm 1,35$
PM18	BAP	0.15	$3.56 \pm 0,91$
PM19	BAP	0.2	$3.67 \pm 0,64$
PM20	KIN	0.1	$2.50 \pm 0,54$
PM21	KIN	0.15	$2.48 \pm 0,36$
PM22	KIN	0.2	$2.47 \pm 0,39$

<b>PM23</b>	2IP	0.1	2.35 ± 0,66
<b>PM24</b>	2IP	0.15	2.46 ± 0,65
<b>PM25</b>	2IP	0.2	2.39 ± 0,30
<b>C-</b>	-	0	2.56 ± 0,92

En general, los tratamientos que contenían BAP (6-bencilaminopurina) en las tres concentraciones exhibieron consistentemente un número relativamente mayor de brotes por explante en comparación con otros tratamientos como se observa en la **Figura 9**. Esto subraya la eficacia de BAP como un regulador clave del crecimiento para mejorar la proliferación de brotes axilares.

**Figura 9.**  
Número medio de brotes por tratamiento.



La multiplicación de brotes de *Desmodium molliculum* en la presente investigación mostró una tasa de proliferación inferior en comparación con estudios previos en especies afines. Según Somkuwar (2016), *Desmodium gangeticum* alcanzó hasta 84 brotes por nodo utilizando 0.5 mg/L de BAP, mientras que en este estudio, la mayor proliferación en *D. molliculum* se obtuvo con 0.1 mg/L de BAP, con un promedio de  $3.89 \pm 1.35$  brotes por explante. Este rendimiento considerablemente menor podría atribuirse a diferencias fisiológicas entre especies, a la etapa juvenil del material vegetal utilizado (derivado de semilla), o a las condiciones específicas del cultivo. En contraste,

aunque la respuesta proliferativa de *D. molliculum* fue modesta, su sensibilidad a bajas concentraciones de BAP representa un punto de partida favorable para la optimización de su protocolo de micropropagación y el estudio de su potencial fitoquímico.

De manera similar, Srivastava et al. (2013) reportaron una proliferación de hasta 12 brotes por explante en *Desmodium gangeticum* utilizando distintas concentraciones de BAP, lo cual también supera la respuesta observada en *D. molliculum* en el presente estudio. Asimismo, Thandar (2022) demostró en *Desmodium triquetrum* que concentraciones más elevadas de BAP (4–5 mg/L) en combinación con ANA favorecieron significativamente la formación de brotes múltiples. Estos antecedentes refuerzan la necesidad de optimizar las condiciones hormonales en *D. molliculum*, tanto ajustando las concentraciones de BAP como explorando sinergias con auxinas, con el fin de mejorar la tasa de multiplicación *in vitro* y avanzar hacia un protocolo más eficiente de propagación clonal.

### **4.3 Enraizamiento**

El enraizamiento ocurrió de forma espontánea en todos los explantes tras su resiembra en medio MS a media concentración de sales, sin necesidad de añadir reguladores de crecimiento. Las raíces formadas presentaron morfología saludable, con número y longitud adecuados para soportar la aclimatación a condiciones *ex vitro*.

Estos hallazgos coinciden parcialmente con los reportados por Thandar (2022) en *D. triquetrum*, donde se obtuvo enraizamiento exitoso en medio MS a media fuerza suplementado con ANA (0.1–1.0 mg/L), alcanzando raíces de hasta 3.5 cm. En contraste, los resultados del presente estudio indican que *D. molliculum* puede enraizar eficientemente sin auxinas exógenas, lo que sugiere una mayor capacidad intrínseca para el desarrollo radicular.

La eficacia del medio MS a media concentración no solo permitió el enraizamiento espontáneo, sino que también se perfila como una opción versátil para futuras etapas de multiplicación y aclimatación. No obstante, se recomienda explorar en investigaciones futuras el efecto de auxinas en distintas concentraciones para determinar si su inclusión podría mejorar aún más la eficiencia en la transición de plántulas a condiciones de campo.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

**1. Establecimiento aséptico eficiente:** El protocolo de desinfección que combinó etanol al 70 % durante 1 minuto seguido de NaClO al 4 % durante 2 minutos resultó altamente efectivo, logrando una desinfección del 100 % sin comprometer la viabilidad germinativa. Esta estrategia, más segura y menos tóxica que otras reportadas en la literatura, representa una alternativa viable para la introducción in vitro de especies silvestres como *Desmodium molliculum*.

**2. Alta tasa de germinación in vitro:** Se alcanzó una germinación global del 92,59 %, destacando la viabilidad fisiológica de las semillas recolectadas en campo y la efectividad del medio MS complementado con GA3, caseína hidrolizada y carbón activado. Este resultado sienta una base sólida para el desarrollo de protocolos de propagación masiva.

**3. Multiplicación de brotes moderada pero prometedora:** El tratamiento con BAP a 0,1 mg/L fue el más efectivo en la inducción de brotes, con una media de 3.89 brotes por explante. Aunque la tasa es inferior a la reportada en otras especies del mismo género, la sensibilidad de *D. molliculum* a bajas concentraciones de BAP ofrece una ventaja para el ajuste progresivo de un protocolo de micropropagación clonal.

**4. Enraizamiento espontáneo sin auxinas:** Las plántulas mostraron una capacidad intrínseca de enraizamiento en medio MS a media concentración, sin necesidad de auxinas exógenas. Esto simplifica el protocolo y reduce los costos y riesgos relacionados con el uso de reguladores de crecimiento.

## 5.2 Recomendaciones

**1. Validar el uso de NaClO al 2 %:** Se sugiere realizar ensayos adicionales para confirmar si una concentración de hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 minutos podría mantener la eficacia observada con el 4 %, reduciendo aún más la toxicidad del protocolo.

**2. Optimizar la combinación de fitohormonas:** Se recomienda evaluar concentraciones superiores de BAP, así como su combinación con auxinas como ANA o AIA, para mejorar la tasa de multiplicación de brotes.

**3. Evaluar variabilidad genética:** Dado que se trabajó con semillas, sería pertinente realizar análisis moleculares para evaluar la variabilidad genética entre plántulas y seleccionar líneas con mayor potencial regenerativo o fitoquímico.

**4. Escalar la aclimatación:** Desarrollar y validar protocolos de aclimatación ex vitro utilizando sustratos estandarizados permitirá evaluar la supervivencia y adaptación de las plántulas micropropagadas a condiciones de vivero o campo.

**5. Explorar fases avanzadas del protocolo:** A partir del establecimiento exitoso, se sugiere avanzar hacia la conservación in vitro, criopreservación, o el estudio de compuestos bioactivos producidos en condiciones controladas.

## REFERENCIAS

- Aguirre, G., Pierre, J., & Leigue, L. (2019). APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS (1.a ed.). MAWIL. <https://doi.org/10.26820/978-9942-787-98-9>
- Aguirre, Z. (2015). Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja (Primera Edición).
- Alane, F., Rabeha, C., & Abdelguerfi, A. (2020). EFFECT OF DIFFERENT SCARIFICATION TECHNIQUES ON THE GERMINATION OF SOME ENDEMIC MEDICAGO SPECIES IN ALGERIA. 62. <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2020.8.5>
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2018). Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía—La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobotany Research and Applications*, 15. <https://doi.org/10.32859/era.15.1.001-293>
- Cabello Moreno, B. (2016). Micropropagación y conservación in vitro de variedades españolas de olivo [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Málaga]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=210102>
- Carloni, E. J., Rodriguez, M. N., Verga, A., & Grunberg, K. (2024). Efecto de ácido naftalenacético, ácido indol-3-butírico y ácido indol-3-acético en la respuesta rizogénica in vitro de *Neltuma alba*. *Revista FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 23. <https://portal.amelica.org/ameli/journal/586/5864885010/html/>
- Davis, C. C., & Choisy, P. (2024). Medicinal plants meet modern biodiversity science. *Current Biology*, 34(4), R158-R173. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.12.038>
- De Klerk, G.-J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(5), 415-422. <https://doi.org/10.1079/IVP2002335>
- Gallegos, M. (2017). Las plantas medicinales: Usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo – Ecuador – 2015 [TESIS Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud]. [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880037/las-plantas-medicinales-usos-y-efectos-en-el-estado-de-salud-de\\_iHP5e7s.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880037/las-plantas-medicinales-usos-y-efectos-en-el-estado-de-salud-de_iHP5e7s.pdf)

- Haygert-Lencina, K., Antônio-Bisognin, D., Kielse, P., Pimentel, N., Haygert-Lencina, K., Antônio-Bisognin, D., Kielse, P., & Pimentel, N. (2017). Enraizamiento y aclimatación de plantas de *Apuleia leiocarpa*. *Agrociencia*, 51(8), 909-920.
- Herrera López, J. L., Avila Larreal, A. G., López Chamorro, P. M., Guerrero Vargas, L. J., & Eugenio Proaño, F. E. (2018). Percepción de la medicina ancestral y convencional en comunidades indígenas de la ciudad de Ambato. *Enfermería Investiga: Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión*, 3(4, Dic), 180-185. <https://doi.org/10.29033/ei.v3n4.2018.04>
- Hesami, M., Pepe, M., Monthony, A. S., Baiton, A., & Phineas Jones, A. M. (2021). Modelado y optimización de la germinación in vitro de semillas de cáñamo industrial ( *Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 170, 113753. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113753>
- Illescas-Gallegos, E., Rodríguez-Trejo, D. A., Villanueva-Morales, A., Borja-de La Rosa, M. A., Ordóñez-Candelaria, V. R., Ortega-Aragón, L. A., Illescas-Gallegos, E., Rodríguez-Trejo, D. A., Villanueva-Morales, A., Borja-de La Rosa, M. A., Ordóñez-Candelaria, V. R., & Ortega-Aragón, L. A. (2021). Factors influencing physical dormancy and its elimination in two legumes genus. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 27(3), 413-429. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.06.041>
- iNaturalist. (2016). Observaciones. iNaturalist Ecuador. [https://ecuador.inaturalist.org/observations?taxon\\_id=280671](https://ecuador.inaturalist.org/observations?taxon_id=280671)
- Kimura, E. (2012). Métodos de escarificación de semillas y su uso en leguminosas forrajeras. *Revista de Investigación Sobre la Ciencia de las Semillas*, 5(2), 38–50.
- Leiva, D. B. (2012). *Evaluación de las relaciones biológicas y económicas entre la producción de las pasturas y la producción lechera del rebaño lactante “Cadet”* [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador].
- López, C. E. M., García, L. M. G., Litardo, R. C. M., & Vivas, L. V. (2022). Efecto de reguladores de crecimiento para la propagación vegetativa de guayusa (*Ilex guayusa* L.). *ECOAgropecuaria. Revista Científica Ecológica Agropecuaria*, 1(2). <https://doi.org/10.53591/recoa.v1i2.347>
- Mendoza, Z. A., Díaz, N. J., & Coronel, W. Q. (2019). *Arvenses asociadas a cultivos y pastizales del Ecuador*. EDILOJA Cía. Ltda.

- Monigatti, M., Bussmann, R. W., & Weckerle, C. S. (2013). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066>
- Moraes, R. M., Cerdeira, A. L., & Lourenço, M. V. (2021). Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. *Molecules*, 26(6), 1752. <https://doi.org/10.3390/molecules26061752>
- 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>
- Naseem, M., & Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003026. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Nawrot-Chorabik, K., Osmenda, M., Słowiński, K., Latowski, D., Tabor, S., & Woodward, S. (2021). Stratification, scarification and application of phytohormones promote dormancy breaking and germination of pelleted Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds. *Forests*, 12(5), 621. <https://doi.org/10.3390/fl2050621>
- Olascuaga Castillo, K., Castillo Medina, O., Villacorta Zavaleta, M., Lopez, D., Altamirano Sarmiento, D., Caceres Andonaire, E., Llontop, M., Malca, F., Noe, S., & Blanco Olano, C. (2023). Phytochemical screening and antiinflammatory activity of the extract from the leaves of *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae) in rats with acute inflammation. *Pharmacognosy Journal*, 15(5), 786–790. <https://doi.org/10.5530/pj.2023.15.153>
- Olascuaga-Castillo, K., Rubio-Guevara, S., Valdiviezo-Campos, J. E., & Blanco-Olano, C. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological profile of a Peruvian Andean plant. *Ethnobotany Research and Applications*, 19, 1–13.
- Paniagua-Zambrana, N. Y., Bussmann, R. W., & Romero, C. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. *Desmodium triflorum* (L.) DC. Fabaceae. En N. Y. Paniagua-Zambrana & R. W. Bussmann (Eds.), *Ethnobotany of the Andes* (pp. 1–8). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2\\_97-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_97-1)
- Paz, H., & Marcela, D. (2015). *La magia de las plantas que curan en el centro del Ecuador: Mujeres, tierra y conocimiento tradicional en la provincia de*

Chimborazo [Tesis de maestría, FLACSO Ecuador].  
<http://repositorio.flacsoandes.edu.ec/handle/10469/9443>

- Pepe, M., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). Machine learning-mediated development and optimization of disinfection protocol and scarification method for improved *in vitro* germination of cannabis seeds. *Plants*, 10(11), 2397. <https://doi.org/10.3390/plants10112397>
- Pratap, A., Prajapati, U., Singh, C. M., Gupta, S., Rathore, M., Malviya, N., Tomar, R., Gupta, A. K., Tripathi, S., & Singh, N. P. (2018). Potential, constraints and applications of *in vitro* methods in improving grain legumes. *Plant Breeding*, 137(3), 235–249. <https://doi.org/10.1111/pbr.12590>
- Quiróz, C. (2019). *Morfología de leguminosas*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/187341394/1-MORFOLOGIA-LEGUMINOSAS>
- Ramos Reyes, A. O. (2017). *Efecto del ácido indolbutírico y 6-bencilaminopurina en el establecimiento in vitro de Persea americana var. Zutano* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <https://hdl.handle.net/20.500.14414/10822>
- Shah, S. H., Islam, S., Mohammad, F., & Siddiqui, M. H. (2023). Gibberellic acid: A versatile regulator of plant growth, development and stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(12), 7352–7373. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11035-7>
- Sharma, S., Sharma, S., & Sharma, V. (2021). Exploring in-vitro micropropagation and secondary metabolite production in *Desmodium gangeticum*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*.
- Silva, J. A. T. da, Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Shoot tip culture: An overview of plant regeneration, limitations, and relevance. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14. <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0009>
- Somkuwar, S. (2016). High frequency of multiple shoot induction and genistein and daidzein in *Desmodium gangeticum* (L.) DC. by using different concentrations of BAP. *International Journal of Life Sciences*, 4(3), 363–367.
- Srivastava, P., Singh, B., & Tiwari, K. (2013). High frequency *in vitro* multiplication of an endangered medicinal plant *Desmodium gangeticum* L. (DC). *Research Journal of Biotechnology*, 8(3), 3–10.

- Thandar, S. (2022). *In vitro* micropropagation of *Desmodium triquetrum* DC., Myanmar medicinal plant. *International Journal of Technical Research and Applications*, 10(3), 133–138.
- Turpin, G., Ritmejerystè, E., Jamie, J., Crayn, D., & Wangchuk, P. (2022). Aboriginal medicinal plants of Queensland: Ethnopharmacological uses, species diversity, and biodiscovery pathways. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 18, 54. <https://doi.org/10.1186/s13002-022-00552-6>

## ANEXOS

### Anexo 1.

*Identificación morfológica de la especie vegetal.*

### HERBARIO UTN

Ibarra, 30/01/2024

#### MUESTRA 1    **Origen:** Ibarra

<b>NOMBRE ENVIADO</b>	Desmodium molliculum	<b>SIMILITUD TOTAL</b>	100
<b>NOMBRE COINCIDENTE</b>	Desmodium molliculum	<b>GUI CNOB</b>	ec.bio.spp.18261
<b>RANGO</b>	Especie	<b>AUTOR</b>	(Kunth) DC.
<b>AÑO DE PUBLICACIÓN</b>		<b>ES NOMBRE ACEPTADO</b>	true
<b>ESTATUS TAXONÓMICO</b>	Aceptado	<b>NOMBRE CORRECTO</b>	
<b>LISTA ROJA NACIONAL</b>		<b>CITES</b>	
<b>ENDÉMICA</b>	false	<b>EXÓTICA</b>	false
<b>DOMÉSTICA</b>	false	<b>NATIVA</b>	false
<b>MIGRATORIA</b>	false	<b>INVASORA</b>	false
<b>REINO</b>	Plantae	<b>PHYLUM</b>	Tracheophyta
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida	<b>ORDEN</b>	Fabales
<b>FAMILIA</b>	Fabaceae	<b>GÉNERO</b>	Desmodium
<b>EPÍTETO ESPECÍFICO/INFRAESPECÍFICO</b>	molliculum		

#### MUESTRA 2    **Origen:** Cuenca

<b>NOMBRE ENVIADO</b>	Desmodium molliculum	<b>SIMILITUD TOTAL</b>	100
<b>NOMBRE COINCIDENTE</b>	Desmodium molliculum	<b>GUI CNOB</b>	ec.bio.spp.18261
<b>RANGO</b>	Especie	<b>AUTOR</b>	(Kunth) DC.
<b>AÑO DE PUBLICACIÓN</b>		<b>ES NOMBRE ACEPTADO</b>	true
<b>ESTATUS TAXONÓMICO</b>	Aceptado	<b>NOMBRE CORRECTO</b>	
<b>LISTA ROJA NACIONAL</b>		<b>CITES</b>	
<b>ENDÉMICA</b>	false	<b>EXÓTICA</b>	false
<b>DOMÉSTICA</b>	false	<b>NATIVA</b>	false
<b>MIGRATORIA</b>	false	<b>INVASORA</b>	false
<b>REINO</b>	Plantae	<b>PHYLUM</b>	Tracheophyta
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida	<b>ORDEN</b>	Fabales
<b>FAMILIA</b>	Fabaceae	<b>GÉNERO</b>	Desmodium
<b>EPÍTETO ESPECÍFICO/INFRAESPECÍFICO</b>	molliculum		

**Conclusión:** Las muestras presentadas corresponden a la misma especie.

**Anexo 2.***Formulación del medio Murashige y Skoog Basal (MSB).*

<b>Componente</b>	<b>Concentración en MS (mg/L)</b>	<b>Concentración en la solución stock (mg/L)</b>	<b>Volumen para 1L de medio (mL)</b>
<b>MACRONUTRIENTES (10x)</b>			10
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	165000	
KNO <sub>3</sub>	1900	190000	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	37000	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	44000	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	17000	
<b>MICRONUTRIENTES (100x)</b>			10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	2230	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	860	
KI	0.83	83	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	25	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
<b>HIERRO</b>			
Fe·EDTA	0.40	40	10
<b>VITAMINAS</b>			
Ácido nicotínico	0.5	0.5	1
Tiamina HCl	0.1	0.5	0.2
Piridoxina HCl	0.5	0.5	1
Mio-inositol	100	Directo	
<b>OTROS</b>			
Caseína hidrolizada	200	Directo	
Ácido giberélico	0.2	1	0.2
Carbón activado	100	Directo	
Sacarosa	25000	Directo	
Gelzan	2500	Directo	
<b>pH 5.7 – 5.8</b>			

**Anexo 3.***Análisis de varianza Kruskal - Wallis de la tasa de desinfección de las semillas.*

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E.</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
PD 1	3	1.91	0.27	2.07	1.99	0.87
PD 2	3	1.91	0.27	2.07		
PD 3	3	1.91	0.27	2.07		
PD 4	3	1.91	0.27	2.07		
PD 5	3	1.66	0.71	2.07		
PD 6	3	1.79	0.41	2.07		
PD 7	3	2.07	0.0	2.07		

PD 8	3	2.07	0.0	2.07
PD 9	3	2.07	0.0	2.07

#### Anexo 4.

*Análisis de varianza ANOVA del número de brotes.*

<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Modelo</b>	36.36	8	4.55	12.49	< 0.0001
<b>Fitohormonas</b>	33.10	2	16.55	45.46	< 0.0001
<b>Concentraciones</b>	0.95	2	0.48	1.31	0.2753
<b>Fitohormonas * Concentraciones</b>	2.54	4	0.64	1.74	0.1485
<b>Error</b>	28.76	79	0.36		
<b>Total</b>	65.12	87			

#### Anexo 5.

*Análisis Tukey post-hoc por fitohormonas.*

<b>Fitohormonas * Concentraciones</b>	<b>Average</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
<b>2IP</b>	2.40	30	0.11	A
<b>KIN</b>	2.48	30	0.11	A
<b>BAP</b>	3.75	28	0.11	B

<b>Fitohormonas</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estandar</b>
<b>BAP</b>	3,75	0,825827578
<b>KIN</b>	2,48	0,423324751
<b>2IP</b>	2,40	0,541134698

**Anexo 6.**

*Comparación de tratamientos con BAP frente al C-.*

