



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE**  
**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN  
BIOTECNOLOGÍA

**“Establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador”**

**Autor:** Taipe Unapucha, Mateo Sebastián

**Director:** Proaño Tuma, Karina Isabel Ph. D.

Sangolquí, 31 de agosto de 2022



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



**1. Introducción**

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

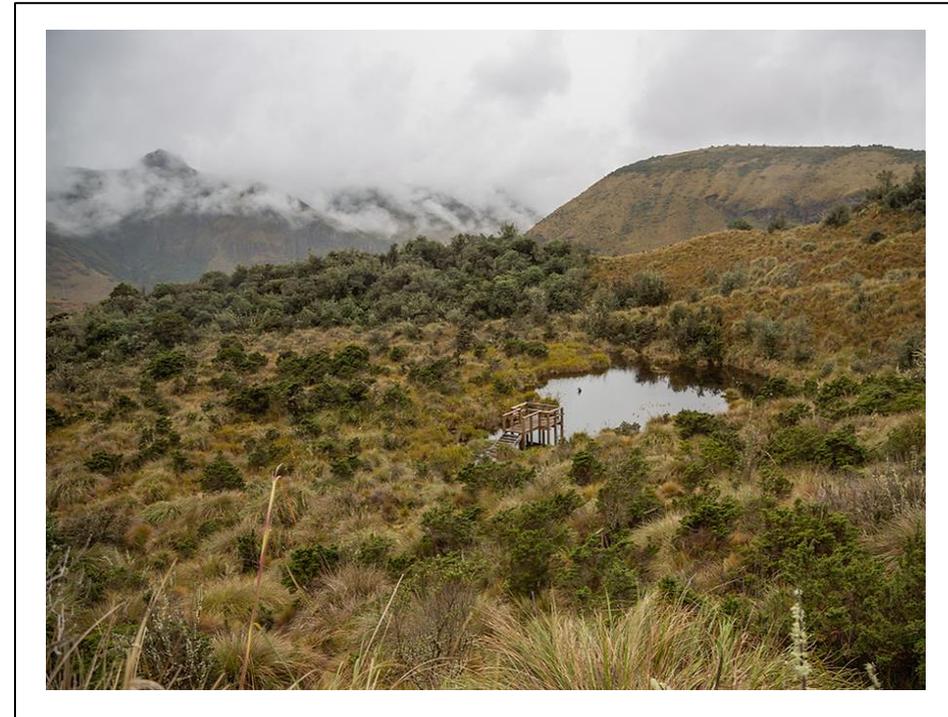
5. Conclusiones y Recomendaciones



## Los Páramos de los Andes



Distribución de los páramos en la región andina



Características de los páramos

## Importancia de los páramos



Parque Nacional Cayambe-Coca

Proveen del 67% de agua al país

Biodiversidad

Sumideros de carbono

## Amenazas de los páramos

Cambio climático



Ganadería



Agricultura



## Familia Asteraceae

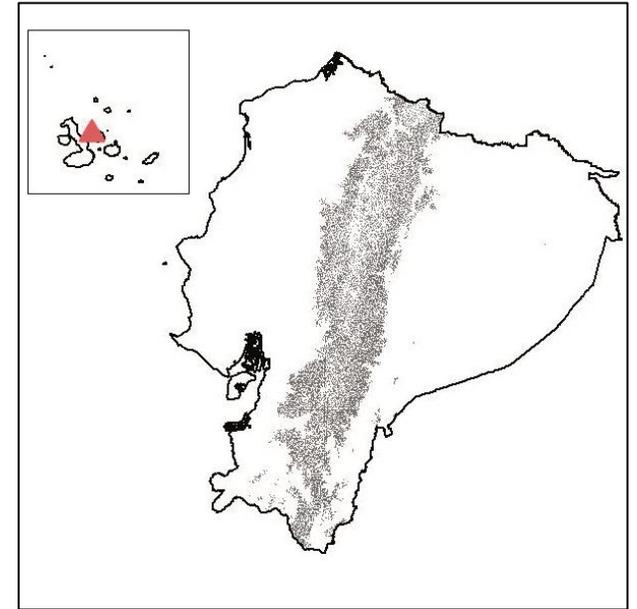


*Espeletia pycnophylla*

Árboles, arbustos o  
hierbas perennes

Cosmopolita

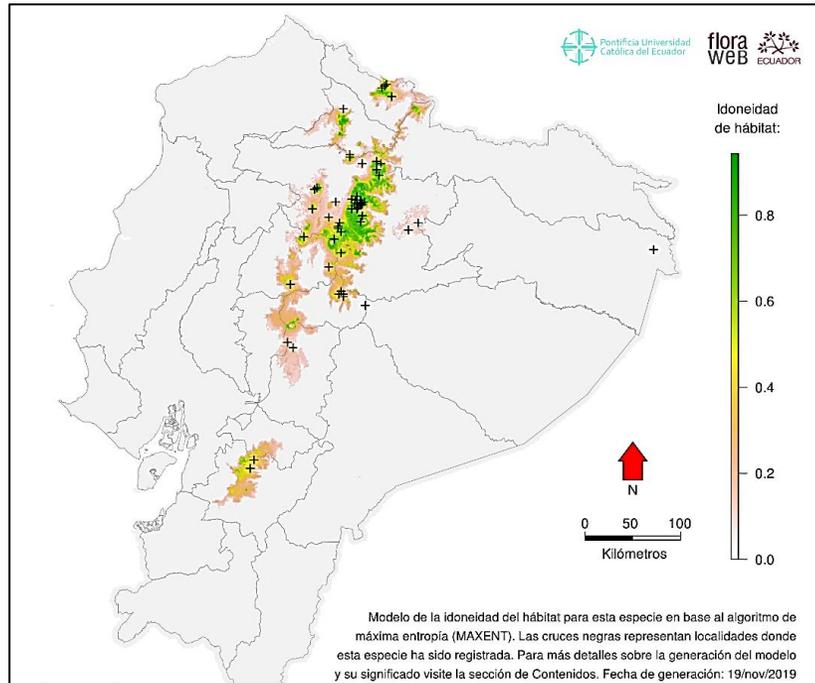
Planes de conservación



Distribución de la familia Asteraceae  
en el Ecuador

# *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

## Distribución



Distribución geográfica de *Diplostephium rupestre* (Kunt) Wedd.

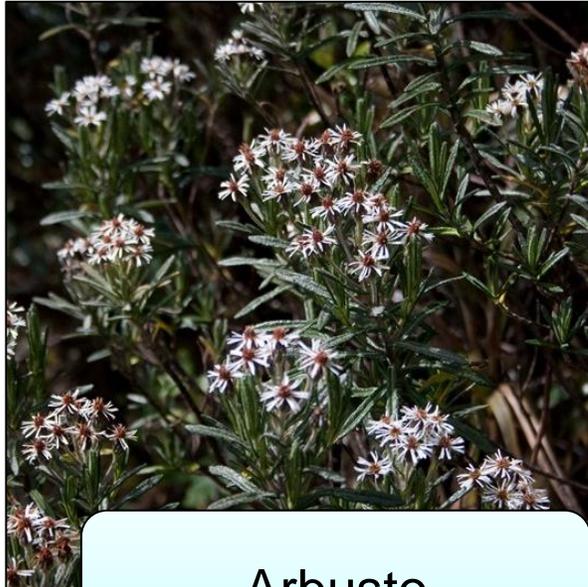
Nativa

Bosques de *Polylepis*

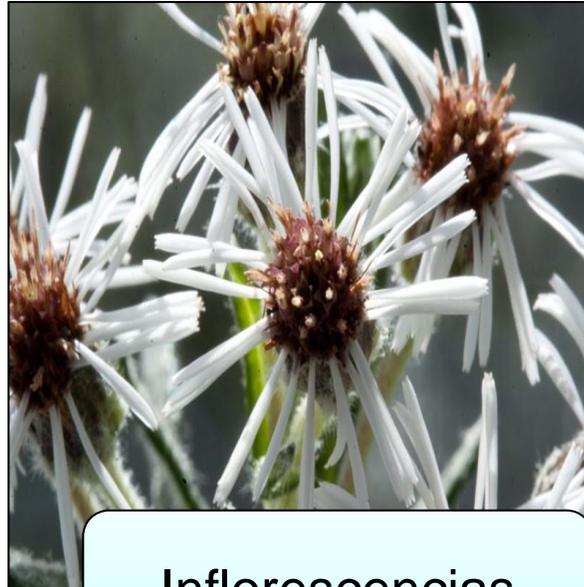
3000 a 4500 m.s.n.m

## *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

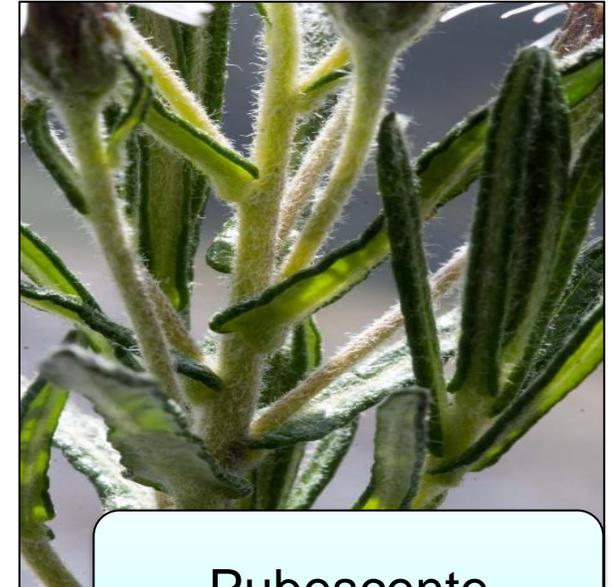
### Características



Arbusto

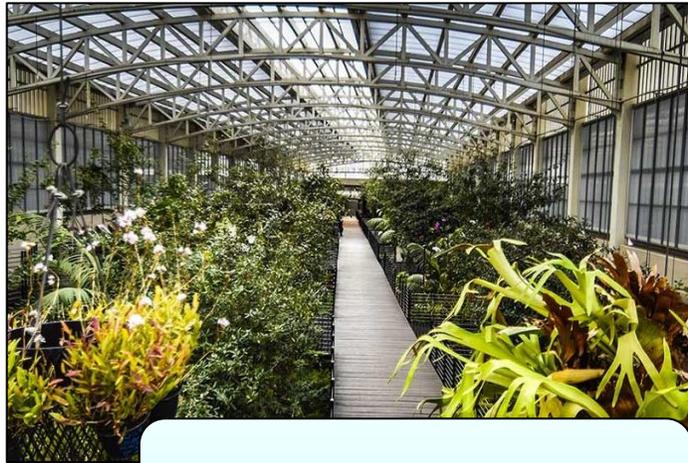


Inflorescencias



Pubescente

## Iniciativas de conservación



Jardines botánicos

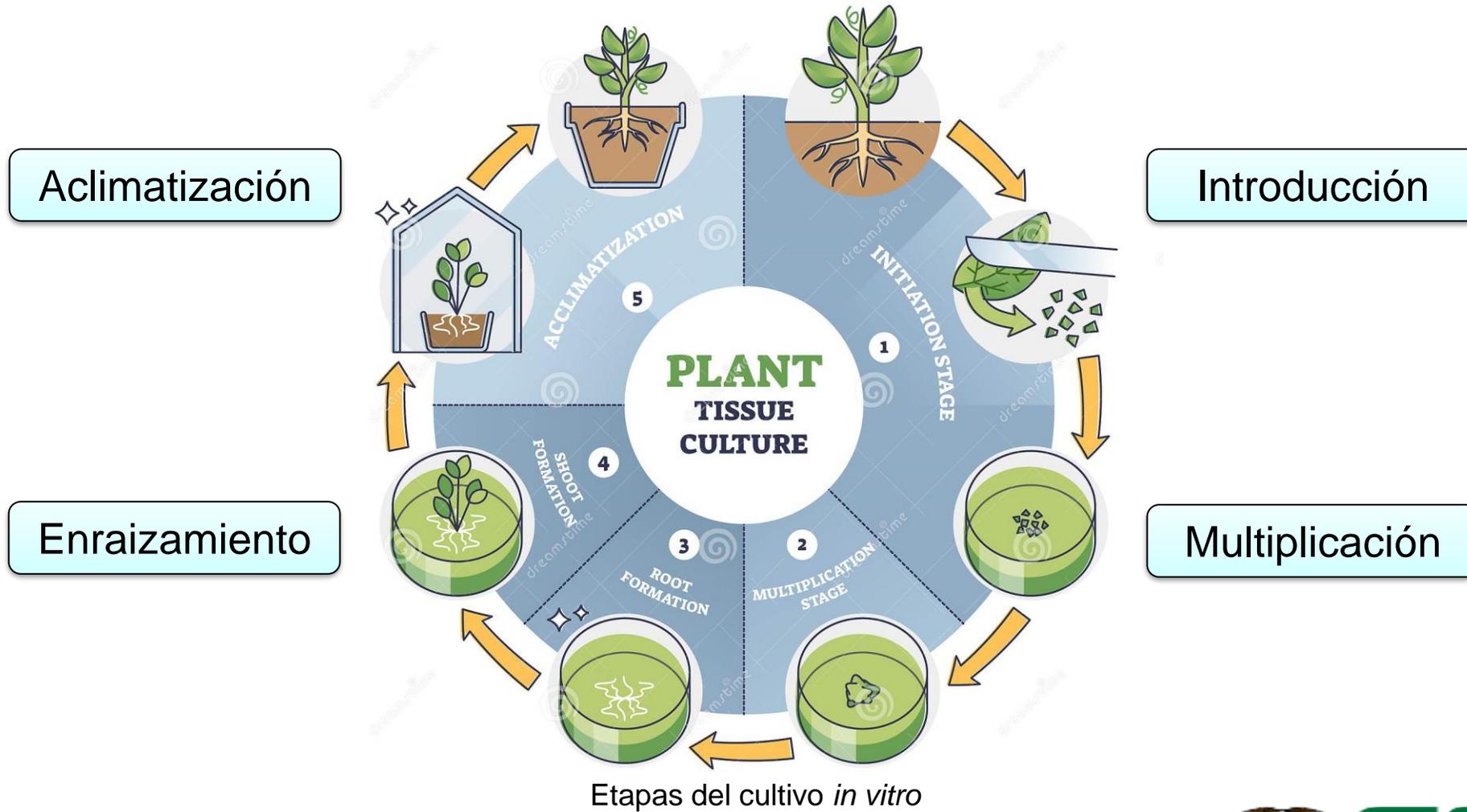


Herbarios



Banco de  
germoplasma

## Cultivo *in vitro*



1. Introducción

**2. Objetivos**

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



## Objetivo General

Establecer un protocolo de desinfección e introducción de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador.



## Objetivos Específicos

- Determinar el método de desinfección de semillas de especies de la familia Asteraceae.
- Estandarizar el método de desinfección en yemas apicales/laterales de especies de la familia Asteraceae.
- Determinar los mejores medios nutritivos y hormonales para el establecimiento e inducción de brotes de especies de la familia Asteraceae.



## Hipótesis

El protocolo de desinfección e introducción permite el establecimiento *in vitro* de especies de la familia Asteraceae en Bosques Andinos del Ecuador.



1. Introducción

2. Objetivos

**3. Metodología**

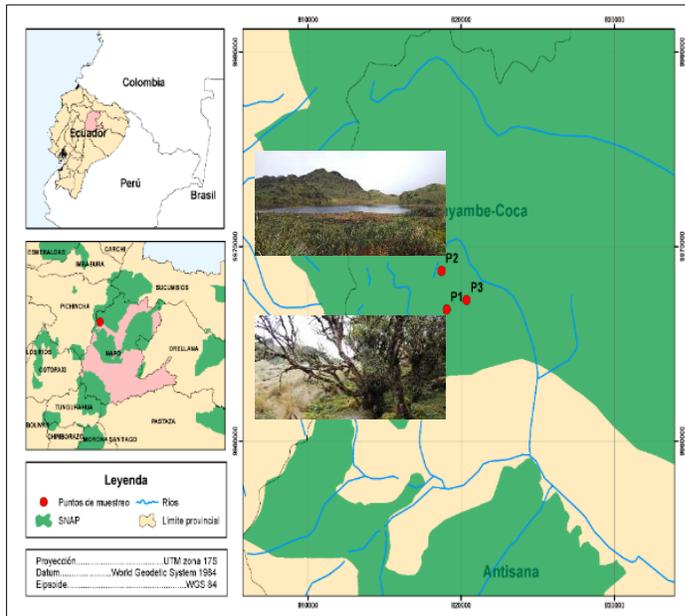
4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



## Fase de campo

### Obtención del material vegetal



Áreas de recolección de material vegetal en el Parque Nacional Cayambe-Coca



Semillas y yemas apicales y laterales de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

## Fase de laboratorio

Desinfección de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Wedd.



Detergente 2%

Alcohol 70%

NaClO

Tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio

Tratamiento	Concentración de NaClO (% v/v)	Tiempo de inmersión (minutos)
TD0	0	0
TD1	1	
TD2	3	5
TD3	5	

## Fase de laboratorio

Introducción de semillas de *D. rupestre* (Kunth) Wedd.

*Medio de cultivo usado para el establecimiento in vitro de semillas de la familia Asteraceae*

Componentes	TI1	TI2	TI3
MS (g/L)	4,43	4,43	4,43
Sacarosa (g/L)	30	30	30
Agar-Agar (g/L)	7	7	7
Ácido giberélico (mg/L)	0	1	2
pH	5,8	5,8	5,8

### Variables de respuesta

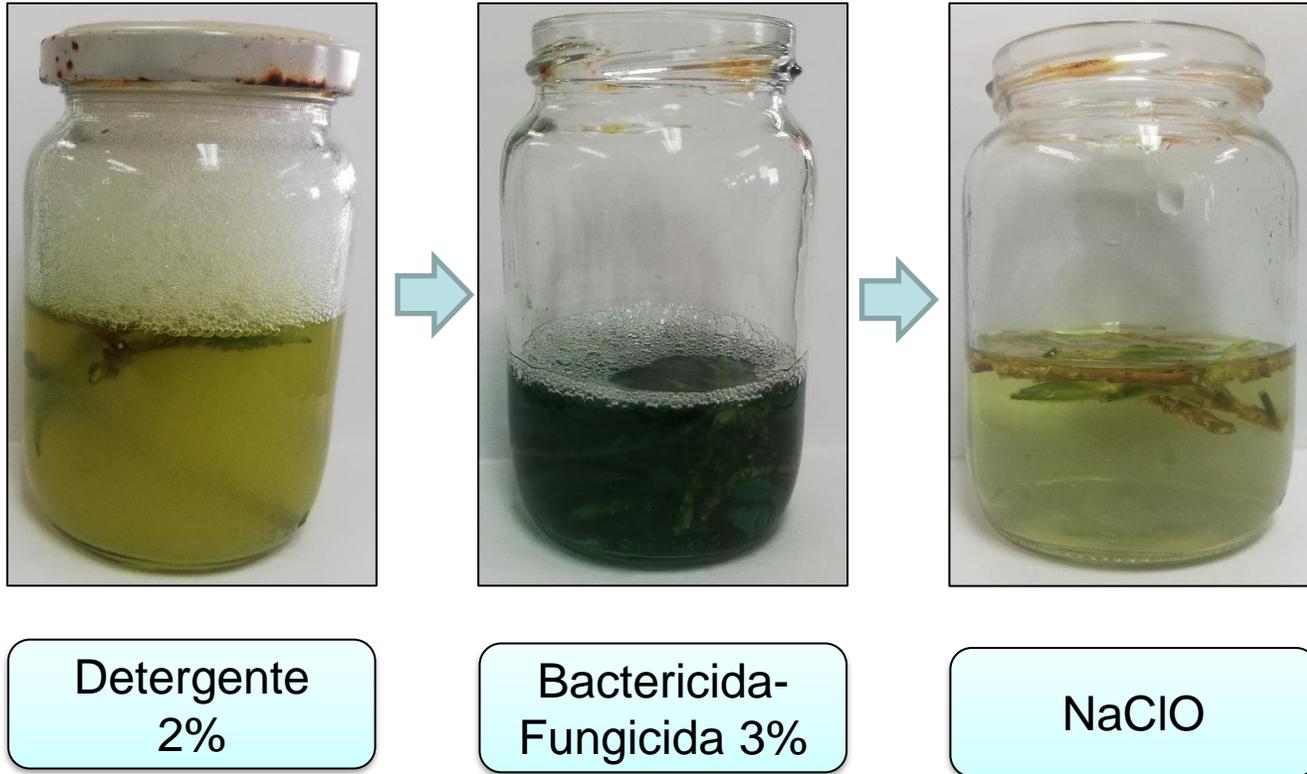
Germinación

Formación de brote



## Fase de laboratorio

Desinfección de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Wedd.



*Tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio*

Tratamiento	Concentración de NaClO (% v/v)	Tiempo de inmersión (minutos)
TD0	0	0
TD1	1	
TD2	2	5
TD3	3	

## Fase de laboratorio

Introducción de yemas de *D. rupestre* (Kunth) Wedd.

*Antioxidantes utilizados para el protocolo de introducción de yemas de D. rupestre* (Kunth) Weed.

Tratamiento	Carbón activado (mg/L)	Ácido cítrico (mg/L)
TY1	3	0
TY2	0	100
TY3	3	100

### Variables de respuesta

Formación de brote

Oxidación

1. Introducción

2. Objetivos

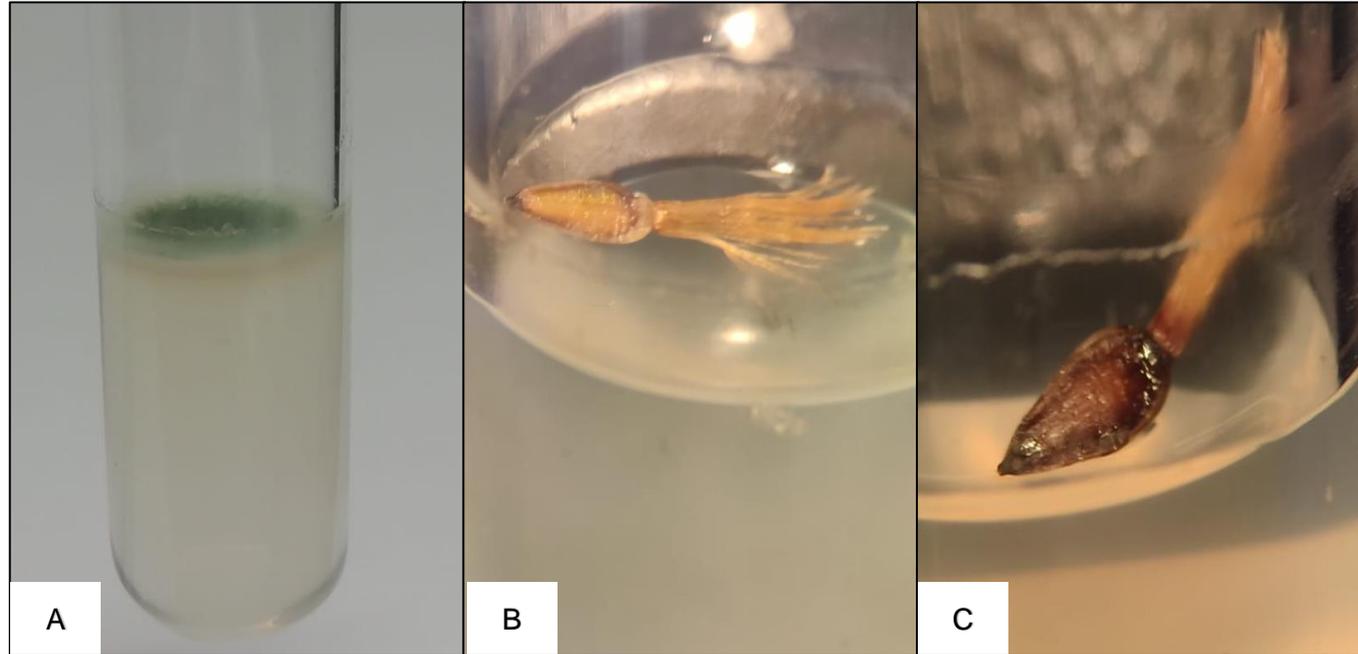
3. Metodología

**4. Resultados y Discusión**

5. Conclusiones y Recomendaciones

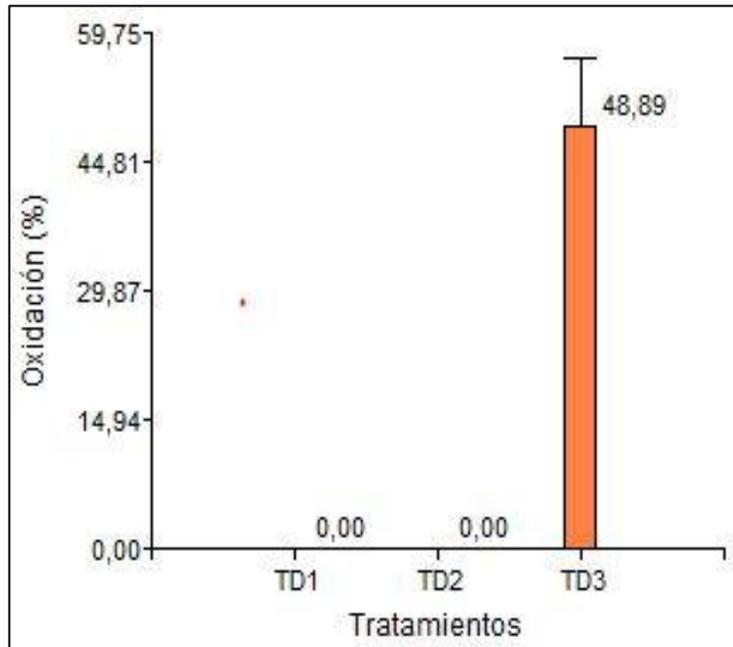


## Desinfección de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

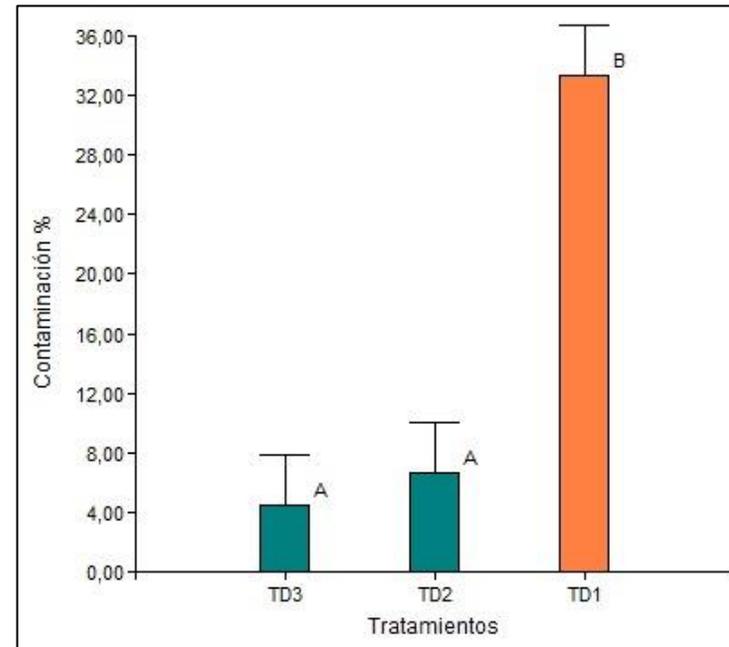


(A) Contaminación por hongo. (B) Semilla libre de contaminación y sin tejido necrosado. (C) Semilla con presencia de tejido necrosado.

## Desinfección de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

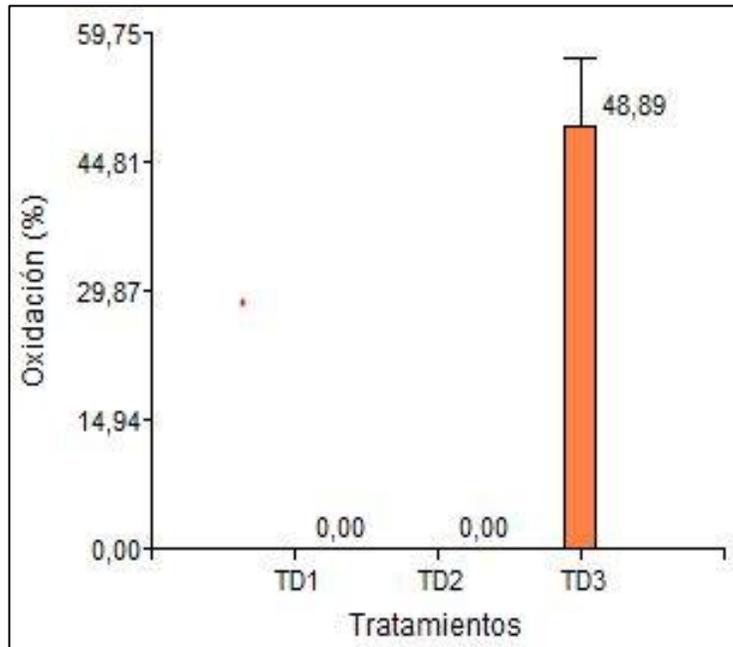


Porcentaje de semillas oxidadas

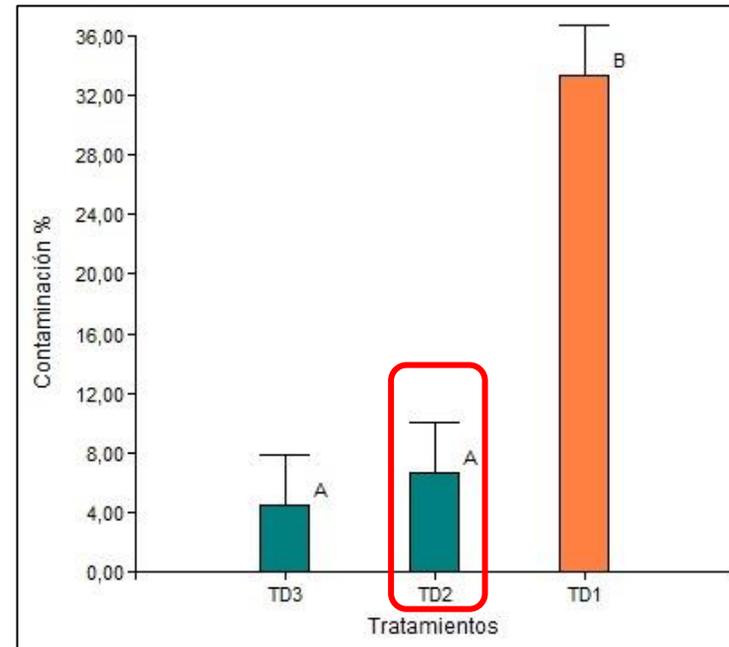


Porcentaje de semillas contaminadas en 15 días

## Desinfección de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

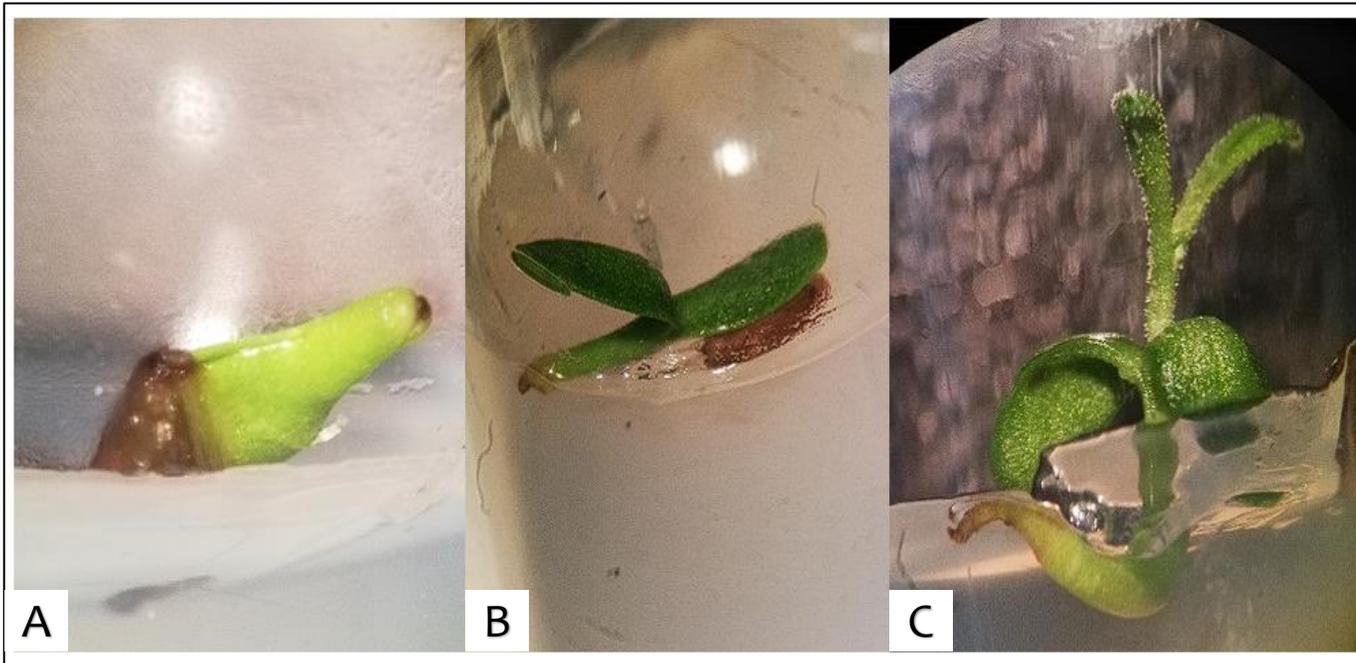


Porcentaje de semillas oxidadas

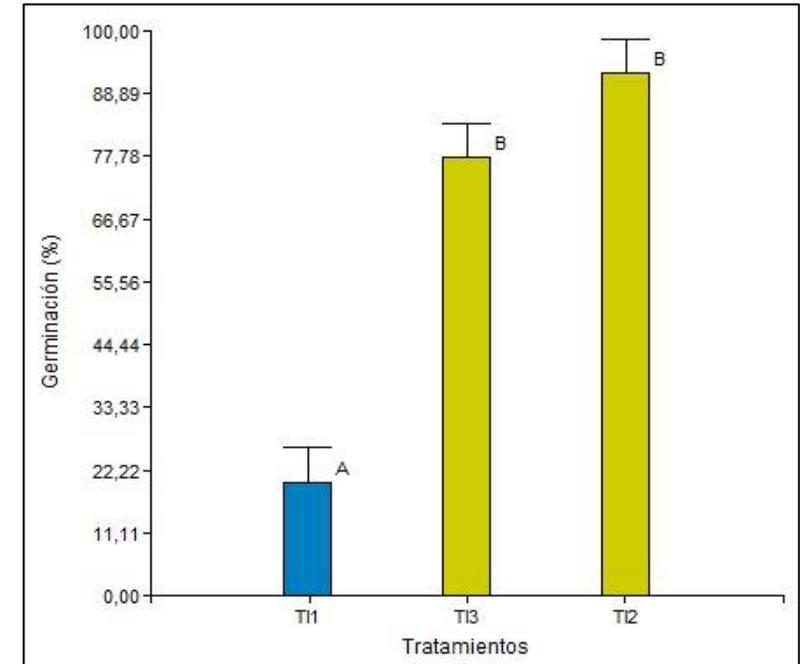


Porcentaje de semillas contaminadas en 15 días

## Introducción de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

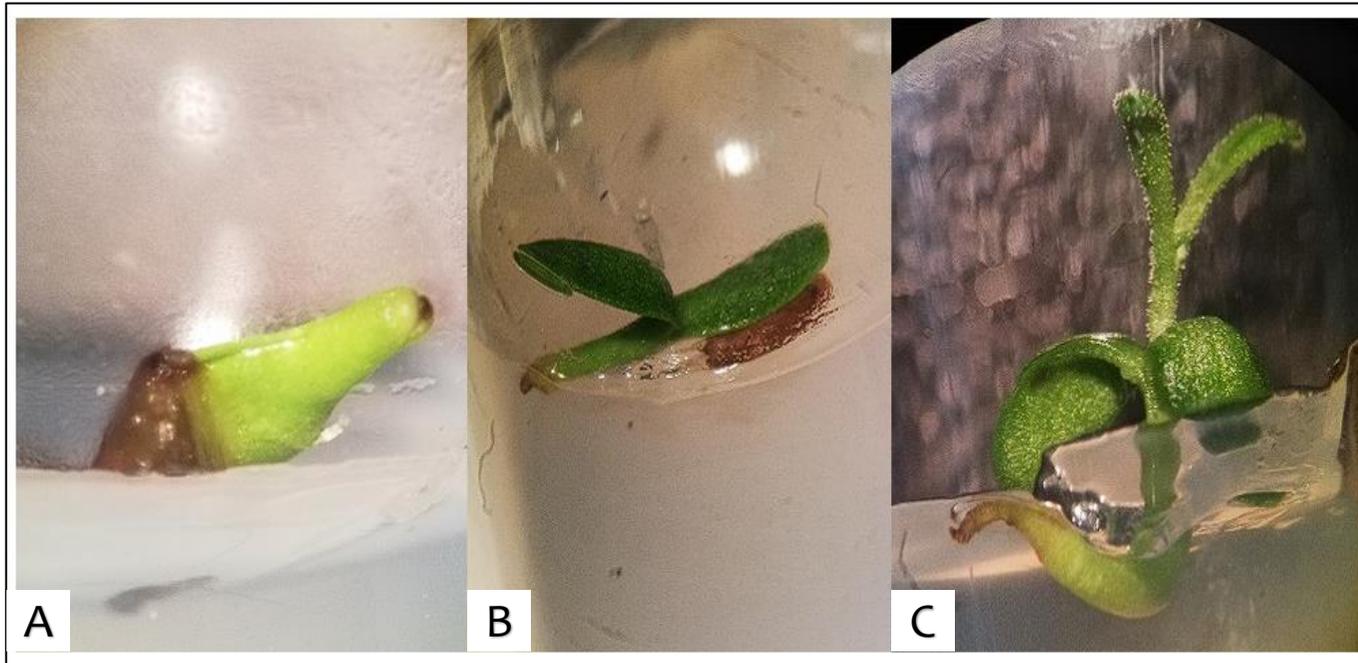


(A) Formación de radícula. (B) Formación de hojas primarias. (C) Formación de un brote viable

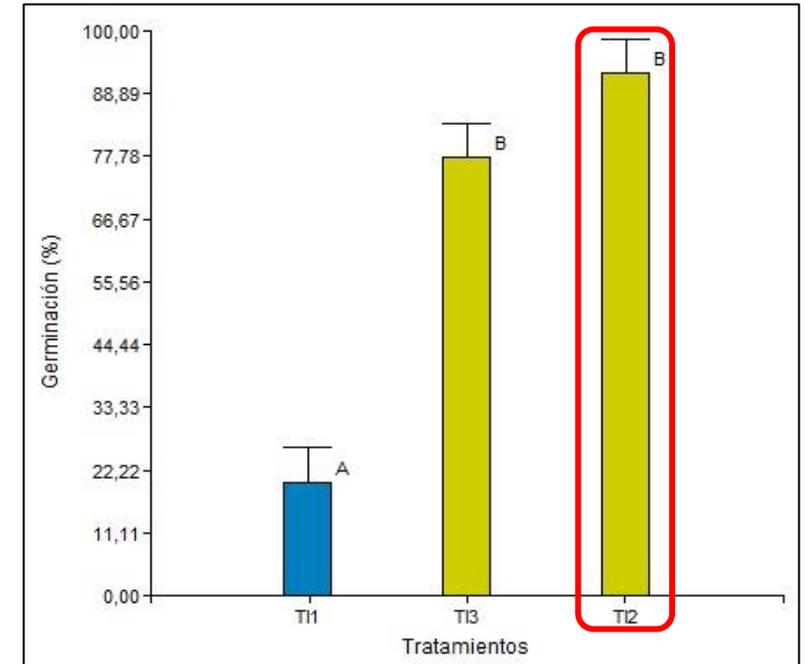


Porcentaje de semillas germinadas

## Introducción de semillas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

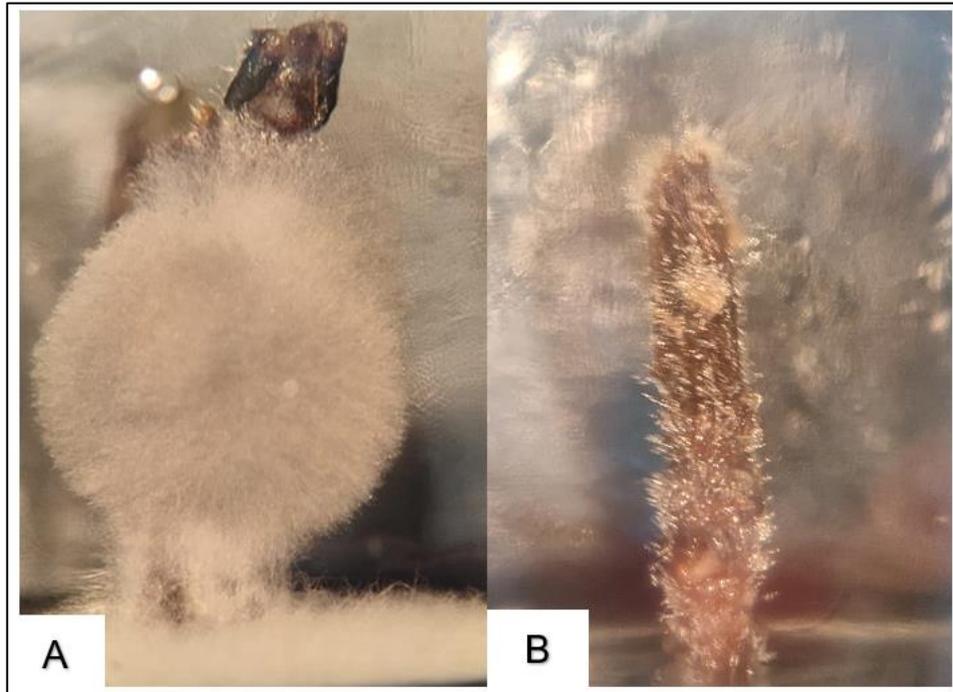


(A) Formación de radícula. (B) Formación de hojas primarias. (C) Formación de un brote viable

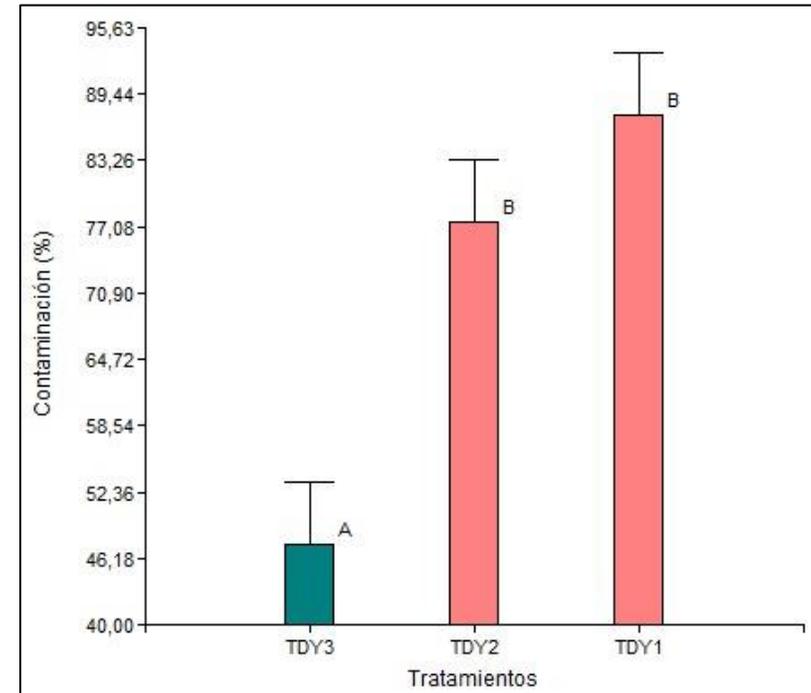


Porcentaje de semillas germinadas

## Desinfección de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

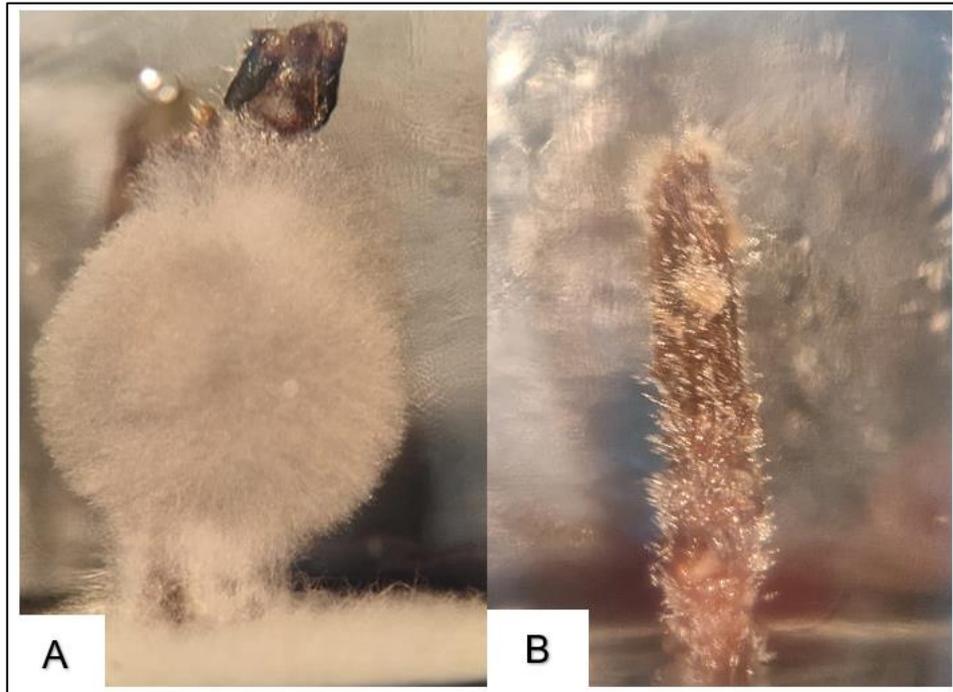


A) Contaminación por hongo; B) Explante oxidado

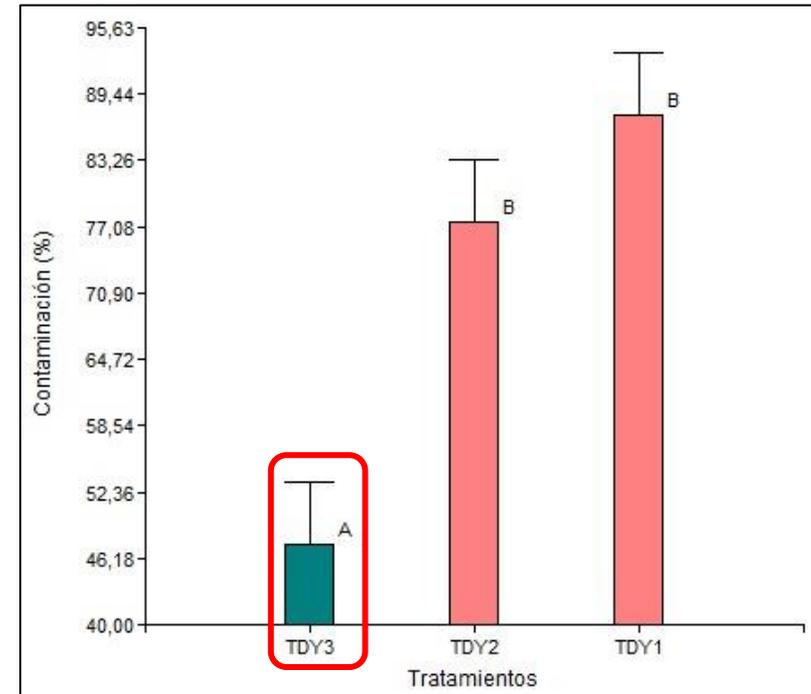


Porcentaje de yemas contaminadas en 15 días

## Desinfección de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.

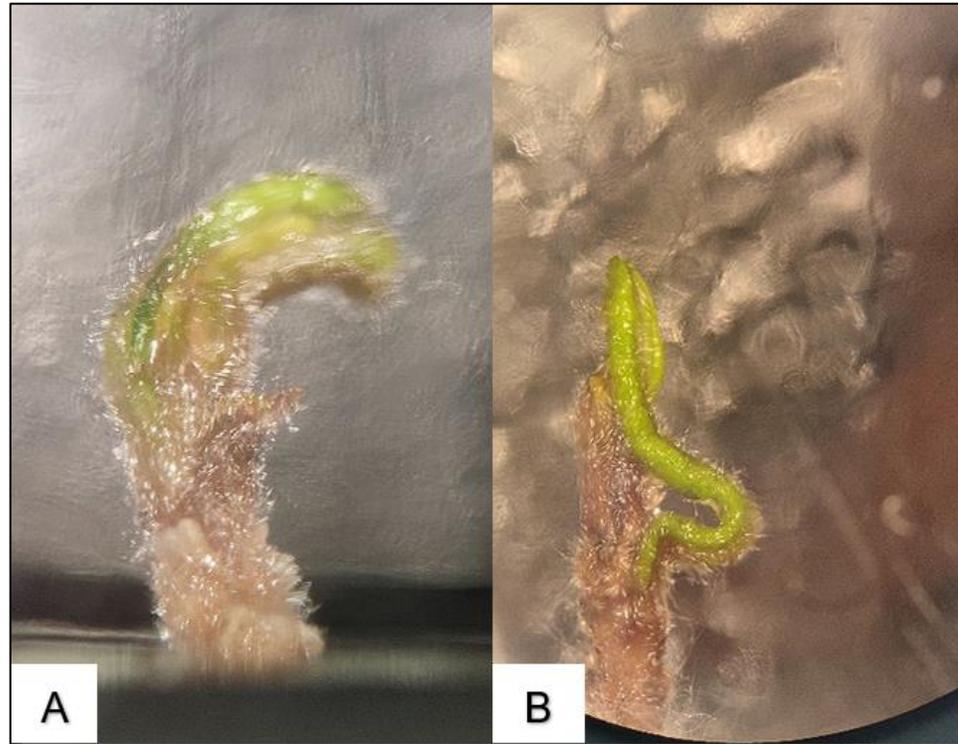


A) Contaminación por hongo; B) Explante oxidado

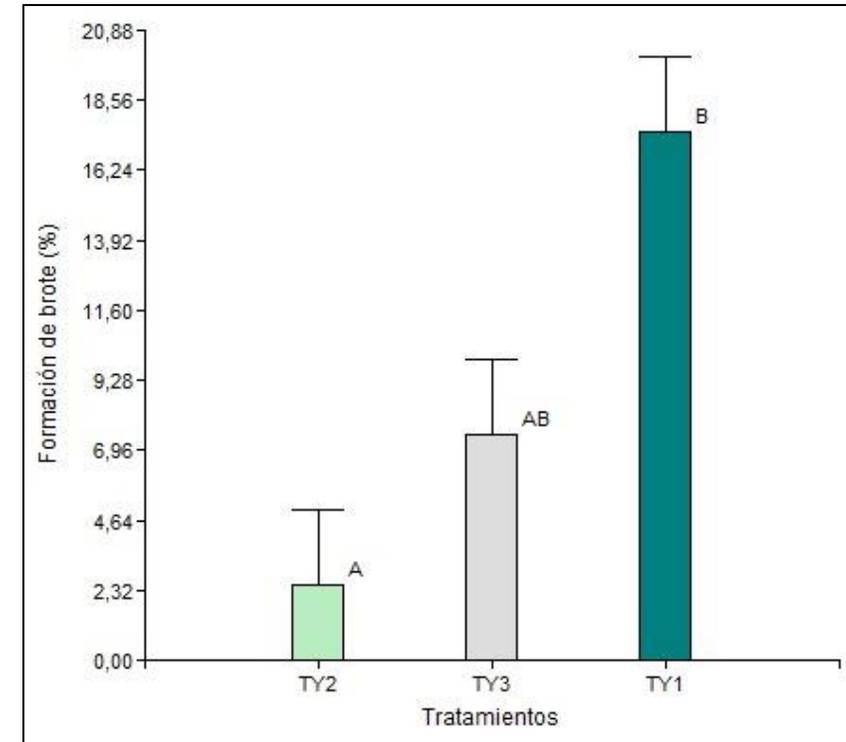


Porcentaje de yemas contaminadas en 15 días

## Introducción de yemas de *Diplostephium rupestre* (Kunth) Wedd.



(A) Formación de hojas primarias (B) Elongación de hojas primarias y formación de hipocótilo



Porcentaje de formación de brotes

1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

**5. Conclusiones y Recomendaciones**



- El protocolo de desinfección estandarizado para las semillas de *D. rupestre* consta de la aplicación de una solución de **detergente al 2% durante 10 minutos, alcohol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 5 minutos**, ya que se obtuvo un porcentaje de desinfección del **93%**.
- El medio de cultivo MS suplementado con **ácido giberélico** a una concentración de **1mg/L**, permitió el establecimiento *in vitro* de semillas de *D. rupestre* con un porcentaje de **germinación del 93%**.



- El protocolo de desinfección estandarizado para las yemas de *D. rupestre* consta de la aplicación de una solución de **detergente al 2%** y **4 gotas de Tween 20 durante 15 minutos**, **NATURAM al 4%** y **4 gotas de Tween 20 durante 1 minuto** e **hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3%** y **4 gotas de Tween 20 durante 5 minutos**, ya que se obtuvo un porcentaje de **desinfección del 52.50%**.
- El **control de la oxidación** para el establecimiento *in vitro* de yemas de *D. rupestre* tuvo los mejores resultados en el **medio de cultivo suplementado con 3mg/L de carbón activado**. Lo que permite disminuir la exudación fenólica de la sección cortada de los explantes.



- En el presente estudio, se obtuvo que la **propagación por semillas tiene mayor porcentaje de obtención de brotes** en comparación a la propagación vegetativa por yemas apicales o laterales
- El **muestreo al azar de semillas** realizado en la presente investigación permite **mantener la variabilidad genética en el establecimiento *in vitro* de *D. rupestre***, lo que evita la pérdida masiva de plantas causada por plagas o enfermedades al momento de **realizar planes de reforestación**.



## RECOMENDACIONES

- En el protocolo de desinfección de yemas de *D. rupestre* se recomienda el uso de agentes desinfectantes más fuertes como el **Cloruro de Mercurio** para eliminar la mayor cantidad de agentes patógenos como hongos y bacterias.
- En el establecimiento *in vitro* de yemas se recomienda realizar pruebas con otros **antioxidantes como PVP, ácido ascórbico** y el uso de **aminoácidos como la glicina, arginina y glutamina** para eliminar las quinonas y poder reducir el efecto oxidativo que provoca la exudación de fenoles.
- Se recomienda realizar la **recolección del material vegetal en diferentes épocas del año** para analizar la variabilidad en los niveles de **contaminación y oxidación de los explantes**.





**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**Karina Proaño, Ph.D.**

Directora del Proyecto de Investigación

**Mónica Jadán, Ph.D.**

Co-directora del Proyecto de Investigación

**Claudia Segovia, Ph.D.**

Co-directora del Proyecto de Investigación

**Mgtr. Andrea Ortega**

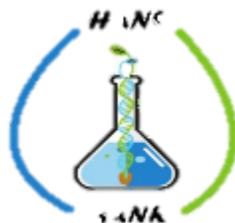
Técnica del Laboratorio de Cultivo de Tejidos

**Tesistas y pasantes**

Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

**Familia**

**Amigas y Amigos**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA