

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Escuela de Ingeniería Agronómica**

**VALIDACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE BANANO (*Musa*  
AAA) VAR. WILLIAMS Y MORA DE CASTILLA SIN ESPINAS (*Rubus*  
*glaucus* Benth), BAJO SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**LUIS SANTIAGO MENESES MONTESDEOCA**

**QUITO – ECUADOR**

**2012**

## 7. RESUMEN

Las técnicas de micropropagación convencionales presentan varias limitaciones relacionadas principalmente con un bajo coeficiente de multiplicación, el alto uso de mano de obra calificada y la escasa posibilidad de automatización de los procesos, esto sin duda, incrementa los costos de producción de las plantas *in vitro* limitando su uso comercial, (Pérez, 1998). Una técnica viable es el uso de Sistemas de Inmersión Temporal que presentan varias ventajas como: un mayor contacto de la biomasa vegetal con el medio de cultivo, la existencia de un intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio de cultivo y de la atmósfera, reflejándose estas características en mayores coeficientes de multiplicación, en la calidad de los brotes producidos y en el aumento de vigor de los mismos, (Ziv, 1995). La utilización de medios líquidos da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes, (George, 1993). Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de hiperhidratación, problema que puede ser superado mediante el uso de la inmersión temporal cuyo principio básico es la sumersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente, (Etienne y Berthouly, 2002). El efecto de los retardantes de crecimiento como Ancymidol y Paclobutrazol en Sistemas de Inmersión Temporal a sus diferentes concentraciones fue estudiado con el fin de reducir el tamaño del brote para permitir un mejor aprovechamiento del espacio interior del recipiente, promoviendo la formación de agrupaciones de brotes, (Ziv, 2005). Por lo expuesto anteriormente, se propuso el presente ensayo en el cultivo de banano y mora de castilla sin espinas, planteando los siguientes objetivos: evaluar dos frecuencias de inmersión para la formación de brotes en banano (*Musa AAA*) var. Williams; evaluar la capacidad de inducción para la formación de brotes de banano (*Musa AAA*) var. Williams con dos hormonas a diferentes dosis; evaluar dos frecuencias de inmersión para la formación de brotes en mora de castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth); evaluar la capacidad de inducción para la formación de brotes de mora de castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) con dos hormonas a diferentes dosis y realizar el análisis financiero de la aplicación comercial de los Sistemas de Inmersión Temporal en la micropropagación de banano (*Musa AAA*) var. Williams y mora de castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth).

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia de Cutuglagua, altitud de 3058 m.s.n.m.

Los factores en estudio para banano fueron: Frecuencia de inmersión f1= Cada tres horas por tres minutos durante veintidós días y f2= Cada seis horas por tres minutos durante veintidós días; Hormonas h1= Ancymidol y h2= Paclobutrazol;

Dosis d1= 1.5 mg/litro, d2= 2.5 mg/litro y d3= 3.5 mg/litro. Los factores en estudio para mora de castilla sin espinas fueron: Frecuencia de inmersión f1= Cada doce horas por tres minutos durante treinta días y f2= Cada dieciocho horas por tres minutos durante treinta días; Hormonas h1= Ancymidol y h2= Paclbutrazol; Dosis d1= 1.5 mg/litro, d2= 2.5 mg/litro y d3= 3.5 mg/litro.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 2x2x3 que se dispuso con cuatro observaciones por tratamiento. La unidad experimental para banano estuvo conformada por dos frascos de vidrio transparente de tres litros de capacidad, el primero contuvo 750 ml de medio de cultivo líquido y el segundo frasco contuvo a cinco grupos de brotes con tres yemas cada uno, obteniendo quince brotes en total, (Castro *et al.*, 2002). La unidad experimental para mora de castilla sin espinas estuvo conformada por dos frascos de vidrio transparente, uno de tres litros de capacidad y otro de dos litros de capacidad, el primero contuvo 250 ml de medio de cultivo líquido y el segundo frasco contuvo 10 explantes conformadas por micro estacas de 3 a 4 centímetros con 3 yemas laterales cada una, hasta completar un total de treinta yemas, (Jones, 2006).

Las variables estudiadas fueron las siguientes: número de brotes, coeficiente de multiplicación, tamaño de brote, peso de brote, porcentaje de brotes hiperhidratados y porcentaje de brotes competentes.

En cuanto a los métodos del manejo del ensayo, la primera etapa incluyó la introducción de explantes de banano y mora en medios semisólidos, luego se hizo la micropropagación convencional de los brotes y al mismo tiempo se eliminó el material contaminado. En la segunda etapa se sembró los explantes obtenidos de la micropropagación convencional, para ser sometidos al Sistema de Inmersión Temporal. El Sistema de Inmersión Temporal empleado fue el propuesto por Alvard *et al.*, 1993 con algunas modificaciones. Como recipientes se utilizaron frascos de vidrio transparente de tres litros de capacidad, los cuales se interconectaron por parejas mediante mangueras de silicona. En un frasco se colocó el medio de cultivo líquido y en el otro los brotes. Cada frasco se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones y la luminosidad. El aire entrante o saliente se esterilizó a través de filtros hidrófobos de 0.2  $\mu\text{m}$ , de tal manera que cada recipiente se manipuló independientemente sin riesgos de contaminación. Todo el material fue previamente esterilizado en una autoclave a 121 ° C por veinte minutos. Los cinco grupos de brotes de banano con tres yemas cada uno se multiplicaron en el medio líquido MS Murashige y Skoog (1962) con vitaminas, se suplementó con 0.1 mg/litro de AIA, 4.0 mg/litro de BAP y el 30 % de sacarosa, se adicionó los retardantes de crecimiento Ancymidol y Paclbutrazol en la dosis que corresponda al tratamiento. El pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización a 121 ° C por quince minutos. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas a una temperatura de 27 $\pm$ 2 °C. La frecuencia de inmersión en el SIT fue de 3 minutos cada 3 horas y de 3 minutos cada 6 horas. Los brotes de bananos que se multiplicaron en el medio semisólido, se constituyeron en el material vegetal de partida para ser sometidos al medio

líquido, mediante el uso de bioreactores de inmersión temporal por 21 días. Para mora de castilla sin espinas se utilizó como recipientes frascos de tres y dos litros de capacidad, los cuales se interconectaron por parejas mediante mangueras de silicona. En el frasco de tres litros se colocó el medio de cultivo líquido y en el de dos litros las microestacas con las yemas laterales. Cada frasco se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones y la luminosidad. El aire entrante o saliente se esterilizó a través de filtros hidrófobos de 0.2  $\mu\text{m}$ , de tal manera que cada recipiente se manipuló independientemente sin riesgos de contaminación. Todo el material fue previamente esterilizado en una autoclave a 121 ° C por veinte minutos. Los brotes de mora se multiplicaron en el medio líquido MS Murashige y Skoog (1962) con vitaminas, se suplementó con 1.0 mg/litro de AG<sub>3</sub>, 4.0 mg/litro de BAP, 100 mg/litro de ácido ascórbico y el 30% de sacarosa, se adicionó los retardantes de crecimiento Ancymidoly Paclobutrazol en la dosis que corresponda al tratamiento. El pH se ajustó a 5.5 antes de la esterilización a 121 ° C por quince minutos. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas, a una temperatura de 21±2 °C. La frecuencia de inmersión en el SIT fue de 3 minutos cada 12 horas y de 3 minutos cada 18 horas. Las vitroplantas de mora de castilla que se multiplicaron en medio semisólido fueron el material vegetal de partida para ser sometidos al medio líquido mediante el uso de bioreactores de inmersión temporal por 30 días.

De la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados:

Para banano variedad Williams (*Musa* AAA), el tratamiento que presentó una mayor generación de brotes competentes (55.68%) y menor hiperhidratación (17.86%), fue f1h2d1 (cada tres horas por un tiempo tres minutos, con Paclobutrazol a una dosis de 1.5mg/litro). El coeficiente de multiplicación de banano es significativamente mayor al disminuir la frecuencia de inmersión de 6 a 3 horas. Por otra parte, el porcentaje de brotes competentes decae si el retardador de crecimiento usado es Ancymidol a sus distintas dosis. Finalmente, la hiperhidratación de los tejidos aumenta al elevar la concentración de los retardadores de crecimiento. Al calcular la correlación entre frecuencias de inmersión y los porcentajes de brotes hiperhidratados obtuvo un coeficiente de correlación de -1, indicando que, cuando la frecuencia de inmersión aumenta, el porcentaje de brotes hiperhidratados disminuye en proporción constante, la correlación entre dosis de Ancymidol y número de brotes obtuvo un coeficiente de -0.88, indicando que, cuando las dosis de Ancymidol aumenta, el número de brotes disminuye y la correlación entre número de brotes y dosis de Paclobutrazol obtuvo un coeficiente de -0.99, indicando que, cuando las dosis de Paclobutrazol aumentan, el número de brotes disminuye. Para realizar el análisis financiero se tomó como medida de evaluación la relación Beneficio/Costo, la cual se calculó dividiendo, el valor presente de los beneficios para el valor presente de los costos de cada tratamiento en estudio, teniendo en el tratamiento f1h2d1 (cada tres horas por tres minutos, con Paclobutrazol a una dosis de 1.5mg/litro) el que obtiene una relación Beneficio/Costo de 2.63

Cuando fueron sometidos los explantes de mora de castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) clon 148 al Sistema de Inmersión Temporal con el uso de biorreactores no produjeron resultados positivos, dado que en los primeros quince días de ser sometidos al estudio, presentaron síntomas severos de oxidación e hiperhidratación que produjeron la muerte de los mismos; para lo cual, se realizó algunas variantes al experimento, para que se puedan obtener los resultados que permitan cumplir con los objetivos de esta investigación, para lo cual se probó con explantes de mayor tamaño, provocándoles el menor daño posible para evitar estrés y el medio de cultivo líquido usado en todos los tratamientos contenía ácido ascórbico para evitar esta oxidación. Además, se cambió los frascos de tres litros a frascos de dos litros de capacidad para mejorar el ambiente interno del frasco, dado que posiblemente la concentración de gases, entre ellos el oxígeno, provoque la oxidación de los explantes. Igualmente, se redujo el volumen del medio líquido de 500 a 250 ml para mejorar la eficiencia del mismo. Otro problema observado fue que los explantes presentaban síntomas de hiperhidratación, esto posiblemente se produjo porque los frascos de los biorreactores acumulaban pequeñas cantidades de medio líquido en su base, dado que no era completamente plana y al ser los explantes muy pequeños estos se alojaban junto al medio líquido permanentemente, para lo cual se fabricó unas mallas plásticas que fueron colocadas en el interior de los frascos que contenían a los explantes para evitar el contacto continuo del medio y los explantes. Para verificar si los explantes de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), clon 148, respondían al uso de medio de cultivo líquido se realizó un ensayo, donde se evaluó a dos clones de mora de castilla, una con espinas (clon 55) y mora de castilla sin espinas (clon 148) en cinco medios de cultivo líquidos, en Erlenmeyers de 100 ml de capacidad en agitación y biorreactores de 2 litros de capacidad con un volumen del medio líquido de 12 ml y 250 ml respectivamente. Se realizó una observación a los quince días y se comprobó que los explantes de mora de castilla 55 y mora de castilla sin espinas 148 sometidos a medio líquido en los Erlenmeyers en agitación tenían brotes nuevos y no presentaban síntomas de oxidación, en tanto que los explantes de mora 55 y 148 sometidos a los biorreactores de inmersión temporal con los distintos medios se oxidaron y murieron, lo que evidenció que la mora de castilla sin espinas no respondió Sistema de Inmersión Temporal con el uso de biorreactores.

En base a lo anteriormente analizado se establecieron las siguientes recomendaciones:

Usar la Frecuencia de inmersión f1 (cada tres horas por tres minutos) para la inducción de brotes de banano (*Musa* AAA) variedad Williams.

Usar el retardador de crecimiento h2 (Paclobutrazol) a la dosis d1 (1.5 mg/litro) para la inducción de brotes de banano (*Musa* AAA) variedad Williams en un medio de cultivo líquido conformado por M&S más vitaminas 4.4g/litro, sacarosa 30g/litro, Ácido indolacético (AIA) 0.1mg/litro y Bencilaminopurina (BAP) 4mg/litro.

Emplear el tratamiento flh2d1 (cada tres horas por tres minutos + Paclobutrazol + 1.5mg/litro) que alcanza una relación Beneficio/Costo de 2.63.

Realizar estudios adicionales para obtener un protocolo que permita generar plántulas de mora de castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) bajo esta metodología.

## SUMMARY

Conventional micropropagation techniques have several limitations mainly related to a low coefficient of multiplication, high use of skilled labor and low possibility of automation of processes, it certainly increases the production costs of plants *in vitro* limiting commercial use, (Pérez, 1998). A viable technique is the use of temporary immersion system that have several advantages such as increased contact of the plant biomass with the culture medium, the existence of a gas exchange and the possibility of controlling the composition of the culture medium and atmosphere, these characteristics reflected in higher coefficients of multiplication, the quality of the shoots produced and increasing force thereof, (Ziv, 1995). The use of liquid media result in increased rates of growth in semisolid media, due to the increased contact surface of the explant with the medium and to the lower diffusion gradients between the medium and the explant, which facilitates the absorptions of nutrients, (George, 1993). However, the continuous immersion of the tissue causes symptoms of hiperhydration, a problem can be overcome through the use of temporary immersion whose basic principle is periodic submersion of the explants in the culture medium, allowing gas exchange with in the container, (Etienne y Berthouly, 2002). The effect of growth retardants like Ancymidol and Paclobutrazol in temporary immersion systems to different concentrations was studied in order to reduce the size of the outbreak to allow better use of space inside the container, promoting the formation of clusters of outbreaks, (Ziv, 2005). As discussed above, this test was proposed in the cultivation of bananas and “Castilla” thornless blackberry, raising the following objectives: to evaluate two frequencies of immersion for the formation of buds in banana (*Musa AAA*) var. Williams; to evaluate the ability of induction in the formation of shoots of banana (*Musa AAA*) var. Williams with two hormones at various doses; to evaluate two immersion frequencies for bud formation in “Castilla” thornless blackberry (*Rubus glaucus* Benth) evaluate the ability of induction for shoot formation of blackberry without thorns (*Rubus glaucus* Benth ) with two hormones at various doses and perform financial analysis of the commercial application of temporary immersion systems in the micropropagation of banana (*Musa AAA*) var. Williams and “Castilla” thornless blackberry (*Rubus glaucus* Benth).

The research was conducted at the Laboratory of Plant Tissue Culture, National Department of Biotechnology, Santa Catalina Experimental Station of the INIAP located in the province of Pichincha, canton Mejía, parish Cutuglagua, altitude of 3058 m. a. s. l.

The factors studied in banana were immersion frequency f1 = Every three hours three minutes and twenty days and f2 = Every six hours for three minutes and twenty days; Hormones h1 = Ancymidol and h2 = Paclobutrazol; dose d1 = 1.5 mg/liter, d2 = 2.5 mg/liter and d3 = 3.5 mg/liter. The factors studied in “Castilla” thornless blackberry were: immersion frequency f1 = Every twelve hours for three minutes for thirty days and f2 = Every eighteen hours per three minutes for thirty days; Hormones h1 = Ancymidol and h2 = Paclobutrazol; dose d1 = 1.5 mg/liter, d2 = 2.5 mg/liter and d3 = 3.5 mg/liter.

Used a completely randomized design with a 2x2x3 factorial arrangement that was available with four observations per treatment. The experimental unit consisted of banana two clear glass bottles of three liter capacity, the first contained 750 ml of liquid culture medium and the second bottle contained five groups of shoots with three buds each, giving a total of fifteen outbreaks (Castro et al., 2002). The experimental unit for "Castilla" thornless blackberry consisted of two bottles of clear glass, a three liter capacity and a two-liter, the first contained 250 ml of liquid culture medium and the second bottle contained 10 explants formed by micro stakes 3 to 4 inches with 3 lateral buds each, for a total of thirty buds, (Jones, 2006).

The variables studied were: number of shoots, multiplication rate, shoot size, shoot weight, percentage of shoots and percentage of shoots hiperhidratados competent.

As for the methods of management of the trial, the first phase included the introduction of banana and blackberry explants in semisolid media, then became conventional micropropagation of shoots while contaminated material was removed. In the second step was seeded explants obtained from conventional micropropagation, to be subjected to temporary immersion system. The temporary immersion system used was that proposed by Alvard *et al.*, (1993) with some modifications. Were used as containers transparent glass bottles three liters of capacity, which are interconnected in pairs by means of silicone tubing. In a flask was placed the liquid culture medium and the other shoots. Each bottle was connected to an intake system air from a compressor, which is triggered by an automatic controller for controlling the frequency, duration of immersions and luminosity. The incoming or outgoing air was sterilized through 0.2  $\mu\text{m}$  hydrophobic filters, so that each container is manipulated independently without risk of contamination. All material was previously sterilized in an autoclave at 121 ° C for twenty minutes. The five clusters of outbreaks with three buds each multiplied in MS liquid medium Murashige and Skoog (1962) with vitamins, supplemented with 0.1 mg/liter IAA, 4.0 mg/liter BAP and 3.0% sucrose, was added growth retardants Ancymidol and Paclobutrazol the dose that corresponds to treatment. The pH was adjusted to 5.8 before sterilization at 121 ° C for fifteen minutes. Cultures were maintained in a growth room with a photoperiod of 16 hours at a temperature of  $27 \pm 2$  ° C. The frequency of immersion in the SIT was 3 minutes at 3 hours and 3 minutes every 6 hours. Outbreaks of bananas that are multiplied in the semisolid medium constituted the starting plant material to be subjected to the liquid medium using temporary immersion bioreactors for 21 days. For "Castilla" thornless blackberry was used as containers jars three two liter, which are interconnected in pairs by silicone tubing. In the flask was placed three liters of the liquid culture medium and in two liters of the micro cuttings with lateral buds. Each bottle was connected to an intake system air from a compressor, which is triggered by an automatic controller for controlling the frequency, duration of immersions and luminosity. The incoming or outgoing air was sterilized through 0.2  $\mu\text{m}$  hydrophobic filters, so that each container is manipulated independently without risk of contamination. All material was



previously sterilized in an autoclave at 121 ° C for twenty minutes. Outbreaks of default multiplied in MS liquid medium Murashige and Skoog (1962) with vitamins, supplemented with 1.0 mg/liter GA3, 4.0 mg/liter BAP, 100 mg/liter of ascorbic acid and 3.0% sucrose , was added growth retardants Ancymidol and Paclobutrazol the dose that corresponds to treatment. The pH was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 ° C for fifteen minutes. Cultures were maintained in a growth room with a photoperiod of 16 hours, at a temperature of  $21 \pm 2$  °C. The frequency of immersion in the SIT was 3 minutes every 12 hours and 3 minutes every 18 hours. Plantlets of blackberry that multiplied in semisolid medium were the starting plant material to be subjected to the liquid medium using temporary immersion bioreactors for 30 days.

In the present study yielded the following results:

For banana variety Williams (*Musa* AAA), the treatment had a higher generation of competent shoots (55.68%) and less hyperhydration (17.86%) was f1h2d1 (every three hours for a three minutes time, with Paclobutrazol at a dose of 1.5 mg/liter). The banana multiplication coefficient is significantly higher by decreasing the frequency of immersion from 6 to 3 hours. Moreover, the percentage of shoots competent decays if the growth retardant used is Ancymidol to their different doses. Finally, the hiperhydration of the tissues increases when increasing the concentration of the growth retardant. When calculating the correlation between frequencies of immersion and the rate of shoots hiperhidratados obtained a correlation coefficient of -1, indicating that when the immersion frequency increases, the percentage of shoots hiperhidratados decreases in proportion constant, the correlation between dose and Ancymidol number of shoots obtained a coefficient of -0.88, indicating that when Ancymidol dose increases, the number of outbreaks decreases and the correlation between number of shoots and Paclobutrazol dose of a correlation coefficient of -0.99, indicating that when the dose of Paclobutrazol increased the number of outbreaks decreases. For financial analysis was taken as a measure of evaluating the benefit / cost, which was calculated by dividing the present value of benefits for the present value of costs for each treatment under study, taking into f1h2d1 treatment (three hours for three minutes with Paclobutrazol at a dose of 1.5mg/liter) who gets a Benefit/Cost of 2.63.

When explants were subjected "Castilla" thornless blackberry (*Rubus glaucus* Benth) clone 148 to temporary immersion systems with the use of bioreactors produced no positive results, since in the first fifteen days of being subjected to the study, had severe symptoms of oxidation and hyperhydration which killed the same, to which was made some variations to the experiment, so they can get the results that would meet the objectives of this research, for which it was tested with larger explants, provoking the least possible damage to avoid stress and the liquid culture medium used in all treatments containing ascorbic acid to prevent this oxidation. Furthermore, the flasks was changed three liter bottles of two liters of capacity to improve the internal environment of the bottle, possibly because the concentration of gases, including oxygen, causing oxidation of the explants. Similarly, reduced the volume of the liquid medium from 500 to 250 ml to

improve efficiency. Another problem noted was that the explants showed signs of hiperhydration, this probably occurred because the bottles of bioreactors accumulated small amounts of liquid at its base, as it was not to be completely flat and very small explants were staying next to these permanently liquid medium, for which it was manufactured a plastic nets which were placed inside the bottles containing the explants to avoid contact of the continuous medium and the explants. To check whether the explants of blackberry (*Rubus glaucus* Benth), clone 148, responded to the use of liquid culture medium was performed one trial, which evaluated two clones of blackberry, one with spines (clone 55) and (clone 148) in five liquid culture media in Erlenmeyer flasks of 100 ml capacity and stirred bioreactors of 2 liters of capacity with a liquid medium volume of 12 ml and 250 ml respectively. Observation was performed on the fifteenth day and found that explants of blackberry 55 and 148 liquid under stirring in Erlenmeyer new outbreaks had no symptoms of oxidation, while the explants 55 and 148 in arrears subject to the temporary immersion bioreactors with different media were oxidized and died, which showed that the failure of “Castilla” thornless blackberry did not respond temporary immersion system with the use of bioreactors.

Based upon the above analyzed were established the following recommendations:

Use the dip frequency f1 (every three hours for three minutes) for induction of shoots of banana (*Musa* AAA) cv Williams.

Using growth retardant h2 (Paclobutrazol) dose d1(1.5 mg/liter) for induction of shoots of banana (*Musa* AAA) variety Williams in a liquid culture medium consisting of M&S 4.4g/liter more vitamins, sucrose 30g/liter indoleacetic acid (IAA) and benzylaminopurine 0.1mg/liter (BAP) 4mg/liter.

Use f1h2d1 treatment (every three hours for three minutes +Paclobutrazol + 1.5mg/liter) reaching a Benefit/Cost of 2.63.

Additional studies to obtain a protocol to generate seedlings of blackberry without thorns (*Rubus glaucus* Benth) under this methodology.