



unl

Universidad
Nacional
de Loja

MICROPROPAGACIÓN DE CINCHONA, EL ÁRBOL DE LA VIDA



Víctor Hugo Eras Guamán
Darlin Ulises Gonzalez Zaruma
Magaly Yaguana Arévalo
Jose Antonio Moreno Serrano
Julia Esther Minchala Patiño
Ruth Alexandra Poma Angamarca

MICROPROPAGACIÓN DE CINCHONA, EL ÁRBOL DE LA VIDA

Autores:

Víctor Hugo Eras Guamán

Darlin Ulises Gonzalez Zaruma

Magaly Yaguana Arévalo

Jose Antonio Moreno Serrano

Julia Esther Minchala Patiño

Ruth Alexandra Poma Angamarca





unl

Universidad
Nacional
de Loja

Ph. D. Nikolay Aguirre

Rector

Ph. D. Elvia Zhapa

Vicerrectora Académica

Ph. D. Max Encalada

Director de Investigación

MICROPROPAGACIÓN DE CINCHONA, EL ÁRBOL DE LA VIDA

Autores:

Víctor Hugo Eras Guamán

Darlin Ulises Gonzalez Zaruma

Magaly Yaguana Arévalo

Jose Antonio Moreno Serrano

Julia Esther Minchala Patiño

Ruth Alexandra Poma Angamarca

Revisión par académico:

Prof. Dr. Mario Luiz Teixeira de Moraes

Prof. Dr. Deivid Lopes Machado

Editorial Universitaria:

Contacto : comision.editorial@unl.edu.ec

ISBN físico - 978-9978-355-90-9

ISBN digital - 978-9978-355-91-6

Diseño e impresión:

EDILOJA Cía. Ltda.

Telefax: 593-7-2611418

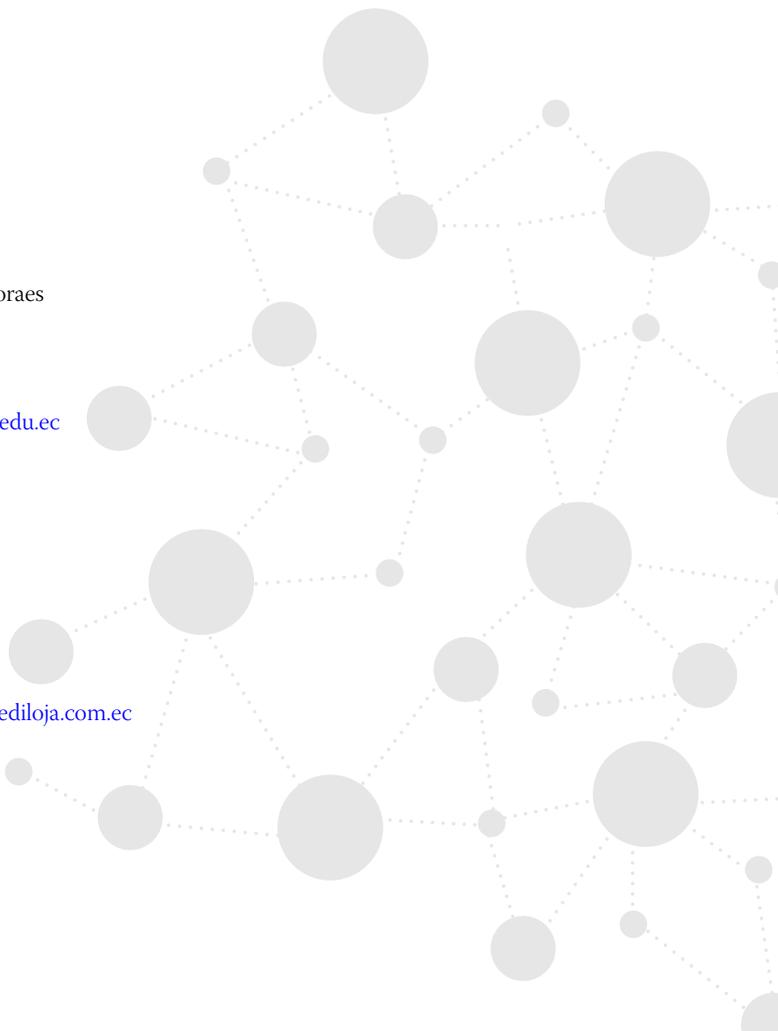
San Cayetano Alto s/n

www.ediloja.com.ec • edilojainfo@ediloja.com.ec

Loja-Ecuador

Diciembre, 2023

Loja, Ecuador



Índice

Índice	5
Índice de figuras	12
Índice de cuadros	19
Autores	21
Coautores	22
Colaboradores	23
Introducción	25
CAPÍTULO 1.	27
1. FUNDAMENTOS BÁSICOS.....	27
1.1. Micropropagación vegetal	27
1.1.1. Definición.....	27
1.1.2. Generalidades del cultivo <i>in vitro</i>	27
1.1.2.1. Ventajas de la micropropagación vegetal.....	28
1.1.2.2. Desventajas de la micropropagación vegetal....	28
1.2. Etapas de la micropropagación	29
1.2.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal.....	30
1.2.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	30
1.2.3. Etapa 2: Multiplicación o brotación	31
1.2.4. Etapa 3. Enraizamiento.....	31
1.2.5. Etapa 4. Aclimatación	32
1.3. Organogénesis	32
1.3.1. Formación de yemas axilares	33
1.3.2. Formación de yemas adventicias.....	33
1.3.3. Cultivo de callos.....	34
1.4. Embriogénesis somática.....	36
1.4.1. Características de la embriogénesis somática.....	37
1.4.2. Origen de la embriogénesis somática	38
1.4.3. Inducción de la embriogénesis somática.....	38
1.4.4. Embriogénesis somática indirecta	40
1.4.5. Embriogénesis somática de alta frecuencia: factores que la controlan	41
1.5. Medio de cultivo.....	41
1.5.1. Sales Inorgánicas	41

1.5.2. Compuestos orgánicos.....	42
1.5.2.1. Carbohidratos.....	42
1.5.2.2. Vitaminas.....	43
1.5.2.3. Reguladores de crecimiento.....	43
1.6. Factores ambientales.....	44
1.6.1. Luz.....	44
1.6.2. Temperatura.....	44
1.6.3. Humedad.....	45
1.6.4. Oxígeno.....	45
1.7. Bibliografía.....	45
CAPÍTULO 2.	53
2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>CINCHONA</i>.....	53
2.1. Antecedentes.....	53
2.2. Descripción del género <i>Cinchona</i>	54
2.3. Clasificación botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	54
2.4. Descripción botánica.....	55
2.5. Usos.....	55
2.6. Categoría de amenaza.....	56
2.7. Bibliografía.....	56
CAPÍTULO 3.	61
3. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO..	61
3.1. Fase de campo.....	61
3.1.1. Quebrada El Naque.....	61
3.1.2. Quebrada San Simón.....	62
3.1.3. Sitio Uritusinga.....	63
3.1.4. Parroquia Selva Alegre.....	64
3.2. Fase de laboratorio.....	64
CAPÍTULO 4.	67
4. DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS <i>IN VITRO</i>.....	67
4.1. Generalidades.....	67
4.2. Estudio de caso: “Procesos Biotecnológicos para la propagación <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de	

diferentes fuentes de material vegetal” Autor: Nelson Ramiro Lima Jiménez.....	68
4.2.1. Colecta de frutos	68
4.2.2. Selección de semillas.....	68
4.2.3. Desinfección de semillas <i>in vitro</i>	69
4.2.4. Medio de cultivo.....	70
4.2.5. Siembra de semillas <i>in vitro</i>	71
4.2.6. Evaluación de ensayos	72
4.2.6.1. Porcentaje y días a la contaminación.....	72
4.2.6.2. Porcentaje de germinación de semillas.....	73
4.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	74
4.2.8. Resultados.....	74
4.2.8.1. Porcentaje y días a la Contaminación.....	74
4.2.8.2. Germinación de semillas <i>in vitro</i>	76
4.3. Conclusiones.....	77
4.4. Bibliografía.....	77

CAPÍTULO 5. 79

5. FASE DE MULTIPLICACIÓN O BROTACIÓN DE EXPLANTES *IN VITRO*..... 79

5.1. Generalidades.....	79
5.2. Estudio de caso: “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas, en La Argelia - Loja” Autora: Lorena Melania Chamba Granda.....	79
5.2.1. Obtención del material vegetal.....	79
5.2.2. Selección del material vegetal.....	80
5.2.3. Medio de cultivo.....	80
5.2.4. Siembra de explantes <i>in vitro</i>	81
5.2.5. Evaluación de ensayos	81
5.2.5.1. Número de brotes, nudos y hojas.....	82
5.2.5.2. Longitud de brote	82
5.2.5.3. Contaminación.....	82
5.2.6. Diseño experimental y análisis de datos	82
5.2.7. Resultados.....	83
5.2.7.1. Número de brotes.....	83

5.2.7.2. Longitud del brote	83
5.2.7.3. Número de nudos	84
5.2.7.4. Número de hojas.....	85
5.2.7.5. Contaminación de explantes in vitro.....	85
5.2.7.6. Mortalidad en explantes in vitro	86
5.3. Conclusiones.....	86
5.4. Bibliografía.....	87
CAPÍTULO 6.	89
6. FASE DE ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES <i>IN VITRO</i>..	89
6.1. Generalidades	89
6.2. Estudio de caso 1: “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas, en La Argelia - Loja” Autora: Lorena Melania Chamba Granda	90
6.2.1. Medio de cultivo.....	90
6.2.2. Obtención de material vegetal e inoculación	91
6.2.3. Diseño experimental aplicado	92
6.2.3.1. Especificaciones del diseño experimental	92
6.2.3.2. Unidad experimental y evaluación.....	93
6.2.3.3. Análisis estadístico de datos.....	93
6.2.4. Resultados.....	93
6.2.4.1. Porcentaje de contaminación de explantes, a los 30 días de evaluación	93
6.2.4.2. Número de días a la contaminación	94
6.2.4.3. Porcentaje de mortalidad.....	95
6.2.4.4. Número de brote por explante.....	95
6.2.4.5. Longitud de brotes.....	96
6.2.4.6. Número de nudos por explante.....	97
6.2.4.7. Número de raíces por explante.....	97
6.2.4.8. Longitud de raíces por explante	98
6.2.5. Conclusiones.....	99
6.3. Estudio de caso 2: “Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja” Autora: Daniela Katherine Paredes Jiménez.	99

6.3.1. Preparación del medio de cultivo.....	100
6.3.2. Selección e inoculación de explantes.....	100
6.3.3. Diseño experimental.....	101
6.3.3.1. Especificaciones del diseño experimental por sitio.....	101
6.3.3.2. Análisis estadístico.....	102
6.3.3.3. Parámetros evaluados.....	102
6.3.4. Resultados.....	102
6.3.4.1. Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	102
6.3.4.2. Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	105
6.3.4.3. Longitud de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	108
6.3.4.4. Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	110
6.3.4.5. Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	112
6.3.4.6. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	114
6.3.4.7. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	116
6.3.5. Conclusiones.....	118
6.4. Bibliografía.....	118

CAPÍTULO 7. 121

7. FASE DE CALLOGÉNESIS DE EXPLANTES *IN VITRO*..... 121

7.1. Antecedentes.....	121
7.2. Estudio de caso 1: “Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” Autora: Katherine Méndez Montaña.....	121
7.2.1. Medio de cultivo.....	121
7.2.2. Obtención de material vegetal e inoculación.....	122
7.2.3. Diseño experimental aplicado.....	123
7.2.3.1. Especificaciones del diseño experimental.....	123

7.2.3.2. Unidad experimental y evaluación.....	124
7.2.3.3. Análisis estadístico de datos.....	124
7.2.4. Resultados.....	124
7.2.4.1. Porcentaje de formación de callo por explante, a los 60 y 55 días de evaluación.....	124
7.2.4.2. Número de días a la formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	126
7.2.4.3. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	128
7.2.4.4. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	129
7.2.4.5. Porcentaje de mortalidad de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	131
7.2.4.6. Color del callo	132
7.2.4.7. Porcentaje de friabilidad de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco	134
7.2.5. Conclusiones.....	135
7.3. Estudio de caso 2: Procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja". Autora: Jessica Guartanza Loja.....	135
7.3.1. Selección de material vegetal.....	136
7.3.2. Desinfección de material vegetal.....	136
7.3.3. Inoculación <i>in vitro</i> de explantes.....	137
7.3.4. Diseño experimental.....	138
7.3.4.1. Especificaciones del diseño experimental	138
7.3.4.2. Análisis estadístico de datos.....	139
7.3.5. Resultados.....	139
7.3.5.1. Porcentaje de formación de callo	139
7.3.5.2. Número de días a la formación de callo	140
7.3.5.3. Color de callo a los 50 días de evaluación.....	141
7.3.5.4. Friabilidad del callo a los 50 días de evaluación	142
7.3.6. Conclusiones.....	143
7.3.7. Bibliografía	143

CAPÍTULO 8.	145
8. LECCIONES APRENDIDAS.....	145
Anexos	147
Anexo 1. Hoja de Registro de Laboratorio, Ensayo Desinfección <i>in vitro</i> de Semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	147
Anexo 2. Hoja de Registro de Laboratorio, Ensayo de Germinación <i>in vitro</i> de Semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	148
Anexo 3. Hoja de Registro de Laboratorio, ensayo de multiplicación o Brotación <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	149
Anexo 4. Hoja de registro de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	150
Anexo 5. Hoja de registro de mortalidad de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	151
Anexo 6. Hoja de registro para las variables: porcentaje de contaminación y mortalidad en fase de enraizamiento de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	152
Anexo 7. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	153
Anexo 8. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	154

Índice de figuras

Figura 1. Árbol de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).....	55
Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima (2016).	61
Figura 3. Paisaje de la Quebrada El Naque, Malacatos, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019). ...	62
Figura 4. Paisaje de la Quebrada San Simón, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).....	63
Figura 5. Paisaje Sitio Uritusinga, El Tambo, Catamayo, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019). ...	63
Figura 6. Paisaje Sitio Selva Alegre, Saraguro, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).....	64
Figura 7. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y González, 2017).....	65
Figura 8. Frutos y semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL, 2019 y Chamba, L. 2017).....	67
Figura 9. Colecta de frutos de <i>Cinchona officinalis</i> L.(Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).....	68
Figura 10. Selección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019 y Lima, 2016).	69
Figura 11. Desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L. en cámara de flujo laminar (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL, 2016).	70
Figura 12. Preparación y esterilización del medio de cultivo (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).....	71
Figura 13. Siembra de semilla <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2016 y Lima, 2016).....	72

Figura 14. Semillas contaminadas por hongos (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).....	72
Figura 15. Semillas germinadas <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).	73
Figura 16. Porcentaje promedio de contaminación de semillas <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> L.....	75
Figura 17. Porcentaje promedio de germinación de semillas <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	76
Figura 18. Preparación del medio de cultivo MS Murashige y Skoog (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Chamba, 2017).....	81
Figura 19. Siembra de explantes <i>in vitro</i> en la cámara de flujo laminar (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Chamba, 2017).....	81
Figura 20. Número promedio de brotes <i>in vitro</i> por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L.	83
Figura 21. Longitud de brote promedio por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L.	84
Figura 22. Número de nudos promedio de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	84
Figura 23. Número promedio de hojas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	85
Figura 24. Preparación del medio de cultivo MS suplementado con auxinas y citoquininas.	91
Figura 25. Preparación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., e inoculación <i>in vitro</i> en medio MS para inducir enraizamiento.	92
Figura 26. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., para el ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i>	94
Figura 27. Días a la contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., para el ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i>	94
Figura 28. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., para el ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i>	95
Figura 29. Número de brotes por explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	96

Figura 30. Longitud promedio de brotes en tratamientos aplicados a explantes para inducir el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	96
Figura 31. Promedio del número de nudos por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., en los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.	97
Figura 32. Número promedio de raíces por explante, en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	98
Figura 33. Tamaño promedio de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.	98
Figura 34. Explantes enraizados de <i>Cinchona officinalis</i> L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona, 2017 - 2018)..	99
Figura 35. Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Zamora Huayco.....	103
Figura 36. Enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Zamora Huayco.....	103
Figura 37. Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Uritusinga.....	104
Figura 38. Enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga....	104
Figura 39. Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Selva Alegre.	105
Figura 40. Enraizamiento de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.....	105
Figura 41. Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	106
Figura 42. Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	107
Figura 43. Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.	108

Figura 44. Longitud promedio de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	109
Figura 45. Longitud promedio de raíces de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	109
Figura 46. Longitud promedio de raíces de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	110
Figura 47. Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	111
Figura 48. Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	111
Figura 49. Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	112
Figura 50. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	113
Figura 51. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	113
Figura 52. Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	114
Figura 53. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	114
Figura 54. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga...	115
Figura 55. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	115
Figura 56. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	116

Figura 57. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.	117
Figura 58. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.	117
Figura 59. Preparación del medio de cultivo: a) Preparación del medio de cultivo MS sólido/fase callos y b) ajuste de pH.....	122
Figura 60. Obtención de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.: a) Aislamiento de ápices caulinares y segmentos nodales y b) Inoculación de explantes en medio de cultivo MS.....	123
Figura 61. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de dos sitios de estudio.....	125
Figura 62. Formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L, de dos sitios de estudio: a) Uritusinga; b) Zamora Huayco.	126
Figura 63. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.	126
Figura 64. Fase de formación de callos; a) 15 días de evaluación; b) 60 días en la formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.....	127
Figura 65. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.....	127
Figura 66. Fase de formación de callos: a) Primeros 10 días de evaluación; b) valoración final (55 días) en <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.	128
Figura 67. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.	128
Figura 68. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.....	129

Figura 69. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.	130
Figura 70. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.....	130
Figura 71. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.	131
Figura 72. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.....	132
Figura 73. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Uritusinga.....	133
Figura 74. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L, del sitio Zamora Huayco.....	134
Figura 75. Porcentaje de friabilidad de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L, de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.	134
Figura 76. Plántulas codificadas del invernadero de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	136
Figura 77. A) Cámara de flujo laminar, B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %.	137
Figura 78. A) Obtención de ápices y segmentos nodales, B) Siembra <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	137
Figura 79. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.....	140
Figura 80. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.....	141
Figura 81. Porcentaje de color de callo de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.	141

Figura 82. Porcentaje de friabilidad de los callos de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, hasta los 50 días de evaluación.....	142
Figura 83. Friabilidad de los callos de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, hasta los 50 días de evaluación. T7 (3 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L ⁻¹ KIN), T5 (1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.50 mg L ⁻¹ KIN), T6 (2.0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L ⁻¹ KIN).....	142

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).	42
Cuadro 2. Tratamientos de investigación para evaluar la desinfección de semilla de <i>Cinchona officinalis</i> L.	70
Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la interacción de auxina – citocinina en la fase de inducción de brotamiento múltiple de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	80
Cuadro 4. Tratamientos para evaluar el efecto hormonal de auxinas en la inducción de enraizamiento de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	90
Cuadro 5. Factores y concentraciones de los reguladores de crecimiento.....	92
Cuadro 6. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina, para enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L...	100
Cuadro 7. Factores y concentraciones de auxina-citoquinina para formación de raíces.	101
Cuadro 8. Efecto de la interacción auxina – citoquinina en el enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L.	101
Cuadro 9. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina para la formación de callos de <i>Cinchona Officinalis</i> L.....	122
Cuadro 10. Factores y concentraciones de los reguladores de crecimiento.....	123
Cuadro 11. Tratamientos aplicados para la inducción de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	138

Autores

Eras Guamán Víctor Hugo. Docente Investigador de la Carrera de Ingeniería Forestal. Director de Proyecto de Investigación Cinchona. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: victor.eras@unl.edu.ec

Gonzalez Zaruma Darlin Ulises. Docente Investigador de la Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: darlin.gonzalez@unl.edu.ec

Yaguana Arévalo Magaly. Técnica Investigadora del Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: magaly.yaguana@unl.edu.ec

Moreno Serrano Jose Antonio. Docente Investigador de la Carrera de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: jose.moreno@unl.edu.ec

Minchala Patiño Julia Esther. Laboratorio Micropropagación Vegetal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: jeminchala@gmail.com

Poma Angamarca Ruth Alexandra. Técnica Investigadora del Proyecto de Investigación Cinchona y Laboratorio de Micropropagación Vegetal, correo electrónico: ruthalexandra2015@gmail.com

Coautores

Lima Jiménez Nelson Ramiro. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: braiklima_15@hotmail.com

Chamba Granda Lorena Melania. Carrera de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: loremelania@yahoo.com

Méndez Montaña Katherine Isabel. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: kathymendes@gmail.com

Paredes Jiménez Daniela Katherine. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: danikathe1993@gmail.com

Guartanza Loja Jessica Alejandra. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: _jessicaguartanza@gmail.com

Colaboradores

Cristian Osvaldo Valarezo Ortega. Técnico Investigador del Proyecto de Investigación Cinchona. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: cris_mrhc@hotmail.com

Mauricio Gabriel Sinche Freire: Técnico Investigador del Proyecto de Investigación Cinchona. Universidad Nacional de Loja, correo electrónico: mauriciosinchef88@gmail.com

Introducción

El género *Cinchona conocida* como “cascarilla o árbol de quina” está conformado por 23 especies de la familia Rubiaceae, generalmente son arboles de tamaño mediano a pequeño o arbustos con corteza amarga, se distribuyen a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes, desde los 10° de latitud norte, hasta los 20° de latitud sur (Andersson et al., 1994).

Cinchona se caracteriza principalmente por el contenido de quinina; sustancia que se utilizó durante siglos para curar la malaria; además, de múltiples beneficios como: estimular el apetito, tonificar el organismo, arritmias cardíacas, crecimiento del cabello y evitar la caída; se utiliza también, para combatir el estrés psíquico y físico; por lo tanto, es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica (Garmendia, 2005). En la provincia de Loja, el género *Cinchona* es considerado como uno de los géneros de mayor importancia, por el valor medicinal y cultural (Santos, 2010). Según Garmendia (2005), Anderson y Taylor (1994) *C. officinalis* L., es endémica del valle de Loja.

En los bosques de la provincia de Loja *C. officinalis* L., se explotó hasta el siglo XIX, debido a las propiedades medicinales antes mencionadas, ya que contiene metabolitos secundarios (alcaloides) en la corteza (Nieto, 2000). Tradicionalmente el género *Cinchona* ha sido utilizado con fines medicinales; sin embargo, el uso antropogénico y la expansión de la frontera agrícola han causado la sobreexplotación de la misma, a tal punto, que no es fácil encontrar poblaciones continuas de cascarilla, únicamente están ubicadas en lugares apartados y en pequeños relictos boscosos, también se observa que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración natural (Buddenhagen et al., 2004).

Todos estos aspectos resaltan la necesidad de aplicar técnicas alternativas para la propagación sexual y asexual, como es el caso del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que constituye una técnica, para la conservación y rescate de especies en peligro de extinción (González, 2002).

Siendo el cultivo de tejidos *in vitro* un método alternativo para obtener plántulas sanas, en mayor número, menor espacio y tiempo, resulta de gran importancia realizar estudios alternativos, que permitan obtener protocolos para la propagación *in vitro* de *C. officinalis* L., que contribuyan conservación de la especie en el hábitat natural.

En este contexto, el presente libro contempla ocho capítulos, en los que se describen los fundamentos básicos, descripción del género *Cinchona*, metodologías para la desinfección y germinación de semillas *in vitro*; multiplicación de explantes; enraizamiento de explantes; formación de estructuras callogénicas de *C. officinalis* L. Además, se incluyen algunas conclusiones y lecciones aprendidas en el marco de los resultados obtenidos en el Proyecto de Investigación Cinchona, ejecutado en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, con la finalidad de generar información sobre técnicas alternativas de propagación de la especie por cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y difundir los mismos a los actores interesados.

CAPÍTULO 1.

1. FUNDAMENTOS BÁSICOS

1.1. Micropropagación vegetal

1.1.1. Definición

La Micropropagación es una técnica biotecnológica, que permite el desarrollo masivo de plantas en medios artificiales (medio de cultivo), bajo condiciones asépticas, a partir de pequeños segmentos (explantes de embriones, segmentos, tallos, polen, etc.), con el propósito de regenerar plantas enteras genéticamente idénticas, denominadas clones. También se puede decir, que es el resultado de la proliferación de brotes, que son multiplicados en condiciones asépticas y con elementos químicos para el desarrollo ideal (Abdelnour y Escalant, 1994; Castillo, 2008; Díaz, 2012). Por lo tanto, la micropropagación vegetal es un método biotecnológico que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, usándose en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, ornamentales, forestales, etc. (Frid, 2009; Segretín, 2010).

1.1.2. Generalidades del cultivo *in vitro*

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por el botánico alemán Gottlieb Haberlandt al cultivar células aisladas obtenidas de estambres de *Tradescantia*, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustenta todas las técnicas del cultivo de tejidos *in vitro*.

Las herramientas necesarias que hicieron posible el avance de estas técnicas, tales como el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores del crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años 50. A partir de este momento se sucedieron una serie de acontecimientos como la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958; Steward et al., 1958) y posteriormente la demostración de que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas (Backs-Husemann et al., 1970; Reinert

et al., 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células.

La aplicación de la biotecnología va desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Nash y Davies, 1972; Komamine et al., 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1955), la propagación masiva (Vasil, 1994; Kitto, 1997), la conservación de germoplasma (Withers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Pérez, 1998) y la ingeniería genética (Herrera et al., 1983).

A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una industria de micropropagación, que se inició en Europa y Estados Unidos y que en la actualidad se ha extendido al resto del mundo, incluyendo a países de América Latina, Asia y África. Esta industria está compuesta por cerca de 600 compañías con una producción de más de 500 millones de unidades por año (Vasil, 1994).

1.1.2.1. Ventajas de la micropropagación vegetal

Rivero (2011) señala algunas de las ventajas que ofrece de la micropropagación vegetal, estas son:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala
- Uniformidad seleccionada del material clonado
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales
- Reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido para tal fin
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Conservación de germoplasma
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal

1.1.2.2. Desventajas de la micropropagación vegetal

Según Watad et al. (1992) citado por Tapia (2004), determinan que la técnica presenta varias dificultades, las más frecuentes al introducir los explantes en cultivo *in vitro* son:

- Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados *in vitro*.
- Pardeamiento y ennegrecimiento del medio de cultivo y de los explantes (oxidación), lo que usualmente causa la muerte. Este fenómeno es conocido en el caso de especies que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, se produce por liberación de fenoles al medio de cultivo al producirse heridas en el tejido.
- Ausencia de brotación de yemas axilares bajo cultivo *in vitro*.
- Hiperhidricidad de los tejidos.

Mientras que para Mejía (1994) y Gonzáles y Vilca (1998), señalan que:

- Se requiere de personal especializado, infraestructura y equipos especiales.
- La adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos económicos.
- Poca literatura relacionada al cultivo "*in vitro*" de especies forestales, pues generalmente la respuesta inicial de algunas especies o genotipos es complicada, ya que el tiempo que se quiere es de 12 a 18 meses para adecuar las condiciones a cada especie o genotipo.

1.2. Etapas de la micropropagación

De acuerdo con Olmos et al. (2004) la regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (etapa 0), que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento.

1.2.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal

El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: a) el tipo de órgano que sirve como explante; b) la edad ontogénica y fisiológica del mismo; c) la estación en la cual se colecta el material vegetal; d) el tamaño y e) el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse sobre la base de una selección masal positiva para las características deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento, que los obtenidos a partir de materiales adultos (Olmos et al., 2004).

El material biológico se sumerge en el agente desinfectante para eliminar los microorganismos presentes. La duración de la desinfección es un factor importante, ya que, si la exposición al agente desinfectante es prolongada, el tejido se dañará, y si es corto, los microorganismos no serán eliminados (Barba et al., 2001).

1.2.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro*

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y el éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Barba et al., 2001).

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Olmos et al., 2004).

1.2.3. Etapa 2: Multiplicación o brotación

Una vez que el explante se adapte a las condiciones del laboratorio sin presentar ningún tipo de contaminación, el objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, aclimatación, etc.). Es importante señalar que, en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento, juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Alarcón, 2006).

Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis pueden darse en forma directa o indirecta, esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica (González, 1998).

1.2.4. Etapa 3. Enraizamiento

Posterior a la fase de multiplicación, los brotes obtenidos nuevamente se individualizan y se llevan a la fase de enraizamiento, para ello, se ensayan concentraciones diferentes de Ácido indolbutírico AIB (0, 1, 2, 4, 6, 8 mg L⁻¹), y también Ácido naftalenacético (ANA) con similares concentraciones (Ramos, 2012).

Villalobos y Thorpe (1991) manifiestan que el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del transplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige-Skoog (MS), por ejemplo, diluido al 50 % ha dado resultados positivos en diferentes especies. De igual manera, se requiere cambiar el balance hormonal, lo cual consiste en disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical.

Durante esta etapa se busca la formación de raíces adventicias, con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas. El tipo de enraizamiento depende de cada especie y la facilidad con la que esta etapa se logre; por ejemplo, para las especies herbáceas es mucho más fácil formar raíces que para las especies leñosas. Es importante tomar en cuenta que para cada especie es necesario formular un método de enraizamiento ya que no todas actúan de igual forma con los diferentes reguladores de crecimiento existentes.

1.2.5. Etapa 4. Aclimatación

Finalmente, se lleva a cabo la última etapa de la micropropagación, que consiste en la adaptación al suelo. Los explantes enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación, es por esto que la adaptación al suelo se considera como crítica, pues hay muchas probabilidades de que la planta muera por no estar bien acondicionada (Segretín, 2010).

1.3. Organogénesis

La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar; en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa.

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

1.3.1. Formación de yemas axilares

Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente (Hu y Wang, 1983). Este método, a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

La principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante, existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de biorreactores (Takayama y Akita, 1996) y sistemas de inmersión temporal de los explantes (Alvard et al., 1993; Jiménez et al., 1997).

1.3.2. Formación de yemas adventicias

Es la formación de estructuras *de novo* de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo, en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para la producción (Akita et al., 1994). Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento. Adicionalmente, presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni et al., 1986). Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema.

1.3.3. Cultivo de callos

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Litz y Jarret, 1991). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación del callo comienza con el aislamiento de un órgano o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente desdiferencian ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizadas, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

En todas las fases del cultivo de callo, el genotipo juega un papel importante para llegar a obtener éxito, por la cual se debe siempre trabajar durante la investigación con 2 a 3 genotipos a la vez.

Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de las células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos, dependiendo fundamentalmente del balance hormonal auxina-citocinina en el medio de cultivo.

Se ha formado callos utilizando tipos de explantes, prácticamente de todas las partes de una planta. Independientemente del explante usado, la edad de este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado, contribuyen a la formación del callo. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente está situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada. La tendencia es a emplear tejidos más indiferenciados y los más jóvenes posibles, lo cual ha permitido obtener éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes especies anteriormente consideradas "recalcitrantes". También el uso de diferentes partes de plantas *in vitro*, así como el uso de órganos o fragmentos de órganos encerrados en frutos o inflorescencias, ha permitido reducir a niveles muy bajos los porcentajes de contaminación, siendo también otra tendencia actual.

El callo puede tener diferentes apariencias y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, así como las condiciones de cultivo *in vitro*. El color varía de blanco, blanco amarillento a pardo. Su apariencia puede ser acuosa (callos que no regeneran) o compactos, secos y nodulares.

La fase de formación de los callos es de forma general la menos importante, solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina “potente” (2,4-diclorofenóxiacético, Dicamba, picloram) se logra la formación; sin embargo, lograr multiplicarlo y al final obtener plantas, son las fases o etapas más difíciles.

Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 30 - 40 días en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2 - 5 mm. Generalmente se emplea el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación de los callos, en la caña de azúcar el medio de cultivo propuesto por Heinz y Mee (1969) ha resultado superior al resto de los medios estudiados, en cuanto al crecimiento y las características de friabilidad, lo cual está dado por el balance hormonal logrado para este medio. Los callos son de color amarillo o blanco, secos y de buen desarrollo. Mostrando una marcada influencia del contenido de agar del medio de cultivo (estado físico) sobre el crecimiento de éstos. Los mejores callos fueron obtenidos al emplear una concentración de agar de 8 g L^{-1} , con diferencias superiores en cuanto a crecimiento y apariencia de los callos a las concentraciones de 4 y 6 g L^{-1} respectivamente. Lo cual parece estar dado por las altas concentraciones a estas dosis de iones de calcio y magnesio, que tiene un papel importante en la formación y calidad del callo.

Producto de la diferencia celular que tiene lugar en los tejidos del callo, las células meristemáticas en continua división se transforman en células grandes, de citoplasma ralo y laterizado, producto del crecimiento de una vacuola que ocupa todo el espacio citoplasmático.

Para la fase de formación de plantas a partir de callos según la vía (organogénesis y embriogénesis somática) que se utilice, será necesaria emplear un balance hormonal diferente. La edad del callo juega un papel fundamental junto con el genotipo en los porcentajes de regeneración alcanzados. Tomando como base experimentos realizados por Gómez (1996) en caña de azúcar, los cultivos de

células desdiferenciadas (callos) una vez establecidos tenían el mismo aspecto y la capacidad de rediferenciar en general (primordios de hojas y raíces) en cuatro variedades, a lo largo de 9 meses varió de 75,6 a 80,4 % en el medio propuesto por Payán et al. (1977). Se comprobó que la capacidad de los callos para regenerar plántulas es mayor cuando la inducción se realiza a los 3 meses (85,56 %) potencialidad que se reduce a menos de la mitad a los 10 meses (28,76 %). Además, de una disminución gradual en la potencialidad de los cultivos de callo para regenerar plántulas en el lapso estudiado, también hubo cambios en el patrón de diferenciación. Desde el tercero al quinto mes no se encontraron cultivos que regeneraran raíces; fenómeno que apareció en cultivo de seis meses y que fue incrementándose gradualmente.

1.4. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin necesidad de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, por primera vez descrita por Strasburgers en 1878. Aunque fueron Reinert et al. (1971) citado por Pérez (1998) quienes dieron créditos por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es ampliamente considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas "*in vitro*". Debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Las desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso aplicado del método.

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación y conservación en plantas

1.4.1. Características de la embriogénesis somática

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa. Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teissont (1989) el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este.
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledones
- Presente bandas procambiales entre los ápices

Según Parrot (1993), la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante.

Morfológicamente un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde pro-embrión, fase globular, corazón torpeda y fase cotiledonar o embrión maduro, esto para el caso de las especies dicotiledóneas.

La embriogénesis somática es afectada por varios factores tales como:

- El genotipo de la planta
- El tipo y estado fisiológico del explante
- Los reguladores del crecimiento

1.4.2. Origen de la embriogénesis somática

Existen varias teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos. Algunos reportes señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en algunos cultivos (Street et al., 1974; Haccius, 1978), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener también un origen pluricelular (Williams y Maheswaran, 1986). Sin embargo, existen criterios que señalan que todos los embriones no pueden tener un origen unicelular en estos tiempos (Vasil, 1987), aun los factores que determinan si un embrión somático ha tenido un origen uni-o-multicelular no han sido dilucidados. Una hipótesis es que el tejido con células deducidas determinadas preembriogénicamente (CsDPE) da lugar a embriones con orígenes multicelulares y un tejido con determinadas células inducidas embriogénicamente (DCIE) da lugar a embriones con origen unicelular (Williams y Maheswaran, 1986), pero pueden ser encontradas suficientes excepciones dentro de esta teoría. Otra posible explicación puede ser que el embrión somático primario puede tener un origen multicelular y posteriormente los embriones somáticos originados desde este embrión primario tengan un origen unicelular.

Como un ejemplo, Hartweek et al. (1988) encontraron embriones somáticos originados desde grupos de células en cotiledones de embriones cigóticos de *Glycine max* (L.) Merr (soya), también Sato et al. (1993) reportan la formación de embriones desde embriones somáticos en estado globular de soya se formaban a partir de una sola célula. Igual origen ha sido observado por Polito et al. (1989) durante la formación de embriones somáticos secundarios en la especie *Aleuritis sp.* (nuez de nogal).

1.4.3. Inducción de la embriogénesis somática

Una valiosa cantidad de información se ha obtenido en estos 38 años desde que por primera vez la embriogénesis somática fue reconocida como tal en los laboratorios de cultivo *in vitro*. No obstante, la inducción exitosa de los embriones somáticos y su siguiente conversión en plantas viables no es rutina o eficiente para la mayoría de las especies en los momentos actuales (Merkle et al., 1996).

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La expresión temporal y espacial de los genes es fuertemente regulada para permitir la diferenciación de varios sistemas de órganos, así como el desarrollo de una planta. La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo estos reemplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante, las cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos. Este concepto fue planteado por primera vez por Evans et al. (1981); Sharp et al. (1984) citado por Pérez (1998) quienes usaron los términos siguientes:

- “Inducción de la embriogénesis en determinadas células” (IEDC) para describir una embriogénesis celular que tuvo origen en una célula no embriogénica.
- “Células somáticas determinadas preembriogénicamente” (CsDPE) para describir aquellas células desde embriones cigóticos de plantas, las cuales siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos.

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado o consiste en CsDPE o CsNE (célula somática no embriogénica).

En el primer caso:

“CsDPE”: Un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante, este proceso es llamado embriogénesis somática directa. O sea, la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada tales como segmentos de embriones cigóticos o embriones cigóticos completos y/o tallos (Williams y Maheswaran, 1986).

“CsNE”: Las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo, aunque también se puede obtener a partir de suspensiones celulares y protoplastos.

Este proceso es llamado embriogénesis somática indirecta y es usado para indicar que una fase se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos.

Uno de los eventos iniciales para la inducción de la embriogénesis somática es la terminación de la salida del gen a los genes del patrón de expresión permitiendo su remplazamiento con el programa de la embriogénesis. Un posible mecanismo para regular la baja expresión de los genes es la metilación del ADN, la cual han sido correlacionadas con la cantidad de auxina exógena presente en el medio de cultivo. Por lo cual tratamientos de estrés que permitan mantener baja la regulación de la expresión de los genes del tejido del explante, pueden también estimular la embriogénesis somática. Se han empleado diferentes técnicas como estrés con calor, aumento de la concentración de iones de hipoclorito, anaerobiosis, temperaturas bajas 4 °C y también la exposición a la auxina (Merkle et al., 1996).

1.4.4. Embriogénesis somática indirecta

Este fenómeno fue observado por primera vez en suspensiones celulares de *Daucus carota* (zanahoria) por Steward et al. (1958) y a partir de callos creciendo en medio sólido por Reinert et al. (1971) citado por Pérez (1998).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF).

En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y maduro).

Mientras que en la segunda los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menor de callos. Por ejemplo, en el caso de *Coffea arábica* (café), al cual se refirió anteriormente, así como en los bananos y *Musa sp* (plátanos).

1.4.5. Embriogénesis somática de alta frecuencia: factores que la controlan

Una característica común de la embriogénesis somática de alta frecuencia para muchos cultivos es la presencia de un tejido embriogénico que se diferencia a partir de células individuales llamadas células embriogénicas madres, otra característica, es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo, debido a la alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Söndahl et al., 1991). Estos autores plantean que en el café se puede reconocer las siguientes fases de la embriogénesis somática de alta frecuencia.

1.5. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes. El medio de cultivo tiene que ser esterilizado para el uso, el mismo se puede realizar por medio de la autoclave o por filtración a través de filtro de papel miliporos.

Los medios de cultivo semisólidos son los más empleados, sin embargo, existen varios estudios que demuestran la importancia del agente gelificante: agar, gelrite, agarosa (Abdelnour, 1994).

1.5.1. Sales Inorgánicas

Una de las mezclas de sales más usadas es la descrita por Murashige y Skoog (1962), conocida normalmente como medio MS (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

Solución Madre	Componentes	mg L⁻¹
NITRATOS	Nitrato de amonio	1 650,00
	Nitrato de potasio	1 900,00
SULFATOS	Sulfato de magnesio	370,00
	Sulfato de manganeso	16,90
	Sulfato de zinc	8,60
	Sulfato cúprico	0,03
HALOIDES	Cloruro de calcio	440,00
	Yoduro de potasio	0,83
	Cloruro de cobalto	0,25
P,B,Mo	Fosfato de potasio	170,00
	Ácido bórico	6,20
	Molibdato de sodio	0,25
Na Fe EDTA	Sulfato ferroso	27,80
	Ácido etilendiaminotetraacético	37,30

Los medios de cultivo pueden estar compuestos por sales minerales, compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y materia inerte.

1.5.2. Compuestos orgánicos

Abdernour (1994) señaló que los compuestos orgánicos están conformados por: carbohidratos, vitaminas, hormonas o reguladores de crecimiento.

1.5.2.1. Carbohidratos

Como fuente de carbono en los medios de cultivo se utiliza normalmente sacarosa, constituyendo un componente esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro* en concentraciones que van desde el 1 al 5 %, también se puede usar glucosa y en menor medida fructuosa, la concentración de azúcar depende mucho del tipo de material vegetal (Pierik, 1990; Roca y Mroginski, 1991).

1.5.2.2. Vitaminas

Se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo de tejidos la Thiamina (vitamina B1). Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia para estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato y riboflavina (Lluna, 2006).

1.5.2.3. Reguladores de crecimiento

Las hormonas reguladoras del crecimiento son compuestos orgánicos importantes que se incluyen en el medio de cultivo, el tipo y concentración empleada de estas depende del objetivo del cultivo *in vitro* (Lluna, 2006).

a. Auxinas

Producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callos), formación de raíces adventicias e inhibición de la formación de vástagos adventicios y axilares. Tienen dos orígenes, auxinas naturales como ácido indol acético (AIA) y auxinas sintéticas como ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).

El ácido naftalenacético (ANA), es usado en bioensayos, inducen efectos similares a las auxinas naturales, al usar diversas concentraciones de auxinas se ha demostrado que existen diferencias en la sensibilidad a estas hormonas (Sitbon y Perrot, 1997).

b. Citocininas o citoquininas

Se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, inducen la formación de vástagos adventicios; sin embargo, inhibe la formación de raíces, promueven la formación de vástagos axilares; además, promueve procesos de morfogénesis, la expansión foliar y el desarrollo de los cloroplastos, mejorando el desarrollo vegetativo. Este tiene dos orígenes, uno natural como la zeatina (ZEA) y otros sintéticos como benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN).

Entre las citocininas más usadas se encuentran la benzilaminopurina (BAP), isopentiladenina (2iP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01 - 3 mg L⁻¹, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (Cárdenas, 2006). Estas actúan sinérgicamente con las auxinas para promover una mayor división celular y por ende mejor crecimiento y desarrollo de la planta (Lozada, 2010).

c. Giberelinas

Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios. Las giberelinas especialmente el ácido giberelico (AG₃), han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemos caulinares de varias especies vegetales (Rosales et al., 2014).

1.6. Factores ambientales

Según Mroginski y Roca (2008), expresan que es de suma importancia que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que tiene que ver a la luz y la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información que existe suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

1.6.1. Luz

El papel principal de la luz agrupa la calidad y periodicidad. Tanto la duración diurna como la calidad son importantes, las mismas que pueden influir en la síntesis y acumulación de ciertas sustancias, la luz de tubos fluorescentes de 0,4 a 2,0 Watt de intensidad, pueden requerir entre 12 a 16 horas diarias, que suele ser la apropiada (Serrano et al., 1991; Barba et al., 2001).

1.6.2. Temperatura

La temperatura se mantiene constante de 24 a 26 °C, dependiendo de la especie vegetal a experimentar, se elige una temperatura más baja 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28 - 29 °C para especies tropicales (Serrano et al., 1991).

1.6.3. Humedad

Se sabe que la humedad dentro de los cultivos es alta por la condensación de las paredes de los tubos de ensayo; la humedad del aire del área de incubación solo influirá en la pérdida de agua de los tubos, Abdelnour (1994) señala que la humedad dentro del área de incubación puede ser de 70 – 80 %.

1.6.4. Oxígeno

Para el crecimiento de células y tejidos, la aireación es un factor importante, por esta razón es frecuente el uso de aparatos y agitadores. El abastecimiento de oxígeno no se puede facilitar suministrando tapones metálicos, realizando inoculaciones apolares, utilizando medios líquidos, o, inocular sobre puentes de papel, bajo estas condiciones el explante obtiene el oxígeno de las moléculas que se encuentran en el agua del medio de cultivo (Díaz, 2012).

1.7. Bibliografía

- Abdelnour, A. y Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 38.
- Alarcón, M.; García, J. y Rojas, S. (2006). Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. Propagación Asexual de Plantas. 60 p.
- Alvard, D.; Cote, F. y Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Akita, M.; Shigeoka, T.; Koizumi, Y. y Kawamura, M. (1994). Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*, 13(3), 180-183. <https://doi.org/10.1007/BF00239888>
- Barba, A.; Luna, B. y Romero, J. (2001). Micropropagación de plantas. Primera edición. México. Trillas. 107.

- Backs-Husemann, D. y Reinert, J. (1970). Embryubildung durch isoilierte einzelzellen aus gewebwkulturen von *Daucus carota*. *Protoplasma*. 70:49-60 <https://doi.org/10.1007/BF01276841>
- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA. 8. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Cárdenas, R. (2006). Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Tesis doctoral. Universidad Austral de Chile. 97 p.
- Díaz, G. (2012). Procesos morfogénicos *in vitro* de Cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 141.
- Escalant, J. y Teissant, C. (1989). Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell. Reports*. (7), 665-668. <https://doi.org/10.1007/BF00272056>
- Evans, D.; Sharp, W. y Flick, C. (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogénesis. In *Plant Tissue Culture: methods and applications in agruculture*. By Thorpe, T. New York. 45-113. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301316438>
- Frid, D. (2009). Reproducción de plantas *in vitro* y sus beneficios para la agricultura. <http://tecnocienciaysalud.com/plantas-in-vitro>
- Gómez, R. (1996). Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) de la caña de azúcar (*Saccharum* sp, híbrido). Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología de plantas, Cuba. 98.
- Gonzáles, C. y Vilca, J. 1998. Micropropagación Vegetativa *in vitro* de Aliso (*Alnus acuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca – Perú. 6-13pp

- Haccius, B. (1978). Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*, (28), 74-81. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302076787>
- Hartweek, L.; Lazzeri, P.; Gui, D.; Collins, G. y Willians, E. (1988). Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cellular y Developmental Biology*. 24, 821. <https://doi.org/10.1007/BF02623654>
- Heinz, D. y Mee G. (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop. Science*. (9), 346-348. <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900030030x>
- Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; Van Montagu, M. y Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303(5914), 209-213. <http://hdl.handle.net/1854/LU-6889610>
- Hu, C. V. y Wang, P. J. (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. En: *Handbook of plant cell*. Evans, D.A. Ammirato, P.V.; Yameda, Y. p 256-290.
- Jiménez, E.; Capote, A.; Pérez, N.; Quiala, E.; Feria, M.; Barbon, R. y Pérez, J. (1997). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en sistemas de inmersión temporal. *Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas*, 97, 7.
- Kitto, S. (1997). Commercial micropropagation. *HortScience*. 32(6). <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.32.6.1012>
- Lozada, P. (2010). Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo *in vitro* de tomate de árbol (*Solanum betaceae*). Tesis Ing. Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. 92.

- Litz, E. y Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: embryogenesis. T. A. Thorpe ed. *In vitro* Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203. <https://hdl.handle.net/10568/54689>
- Lluna, R. (2006). Hormonas vegetales; crecimiento y desarrollo de la planta. http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh196_2/22_27.pdf.
- Mejía, A. (1994). Agrobiotecnología Fundamentos y Aplicaciones, Propagación Comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. La Molina Perú. 79p.
- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin 108. 87. <http://www.fao.org/3/t0831e/t0831e00.htm>
- Merkle, S.; Parrott, W. y Flinn, B. (1996). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. Thorpe, T. *In vitro embryogenesis in plant*. 155-203. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_5
- Morel, G. y Martin, C. (1955). Guérison de pomme de terre de maladies à virus. C.R. Acad. Sci. Paris. p. 1315-1324
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growt and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1992, vol. 15., 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nash, D. y Davies, M. (1972). Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 23(1), 75-91. <https://www.jstor.org/stable/23687507>
- Olmos, S.; Luciani, G. y Galdeano, E. (2004). Métodos de propagación y conservación de Germoplasma. *Echenique*, V. 650., 353-363.
- Parrot, W. (1993). Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. Costa Rica. Proceedings. Montpellier, Francia. 183-191.

- Payán, A.; Carmen, H. y Tascón, G. (1977). Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Columbia*. 37, 43.79.
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 1; 13-16; 400.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi– Prensa. Madrid, España. 209–226.
- Polito, V.; McGranahan, G.; Pinney, K. y Leslie, C. (1989). Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Junglans regia* L.) implications for Agrobacterium mediated transformation. *Plant Cell Reports*. 8, 219. <https://doi.org/10.1007/BF00778537>
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropagación *in vitro* de plantas leñosas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Bogotá. 83. pdf. Recuperado de: <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2515/1/17127974>.
- Reinert, J. (1958). Untersuchugen über die morphogenese und gewebwkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 71:15.
- Reinert, J.; Backs-Husemann, D. y Zerban, H. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. *Cool. Natl. C.N.R.S. (París)*: 261-268.
- Reuveni, O.; Israeli, Y.; Degani, H. y Eshdat, Y. (1986). Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. IBPGR Final Report. 36p.
- Rivero, M. 2011. Cultivo de tejidos vegetales I. Agrobiotecnología Curso 2011. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. 85p.

- Roca, W. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. Palmira. Valle.
- Rosales, F.; Pérez, G. y Santizo, M. (2004). Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de *Allium sativum* L. (Ajo).
- Sannasgala, K. (1989). *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven. 172.
- Sato, S.; Newel, C.; Kolacz, K.; Tredo, L.; Finer, J. y Hinchee, M. (1993). Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports*. 12, 408-413. <https://doi.org/10.1007/BF00234702>
- Segretín, M. 2010. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. 6p
- Serrano, M. y Piñol, T. (1991). Biotecnología vegetal. Ciencias de la vida. Editorial SINTESIS. S. A. España. 285
- Steward, F.; Mapes, M. y Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45, 705-708. <https://doi.org/10.2307/2439507>
- Street, H. y Withers, L. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture. *In Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London. New York. 71.
- Söndahl, M.; Nacamura, T. y Sharp, W. (1991). Propagación *in vitro* de café. 27, 621-642 pp.

- Sitbon, F. y Perrot-Rechenman, C. (1997). Expresión of auxin-regulated genes. *PhysiolPlant* 100;443-455pp. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03048.x>
- Tapia, C. (2004). Iniciación *in vitro* de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile e Iniciación *in vitro* de *Herbertia lahue* una Iridácea chilena de interés ornamental. Tesis Lic. Agr. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Vegetales. 43 p.
- Takayama, S. y Akita, M. (1996). Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. In Cost 822 Workshops on Somatic Embryogenesis, Artificial Seeds and Bioreactors. 2p.
- Tisserat, B.; Esan, E. y Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1, 1-78.
- Vasil, I. (1987). Developing cell and tissue cultur systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology.* 128, 193-218. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE87G057688>
- Vasil, I. (1994). Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2), 105-108. <https://doi.org/10.1007/BF00033917>
- Villalobos, V. y Thorpe, T. (1991). Capítulo 6 Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. 127 – 141pp. En: Roca W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. 947p.
- Vuylsteke, D. y De Langhe, E., (1985). Feasibility of *in vitro* propagation of banana and plantains. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 62, 323-328.
- Williams, E. y Maheswaran, M. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany.* 57, 443-462.

Withers, L. (1985). Cryopreservation and storage of germplasm. En: *Plant cell culture: a practical approach*. R.A. Dixon. IRL Press, Oxford 169-191. <https://experiments.springernature.com/articles/10.1385/0-89603-161-6:39>

CAPÍTULO 2.

2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Cinchona*

2.1. Antecedentes

El árbol conocido como cascarilla o quina, ha sido de gran importancia para la economía e historia de los países en los que se encuentra, la utilización de la corteza de la quina y posteriormente de la quinina (alcaloide extraído de la corteza), supuso un singular aporte del Nuevo Mundo para la salud y la cultura universal, a inicios del siglo XVII. La corteza de algunas especies del género *Cinchona* (*Cinchona officinalis* L.; *Cinchona calisaya* Wedd; *Cinchona pubescens* Vahl.; *Cinchona lancifolia* Mutis.), fue el único remedio eficaz contra el paludismo o malaria, enfermedad infecciosa que afecta los glóbulos rojos de la sangre, cuyos agentes infecciosos son cuatro especies del género *Plasmodium* y se transmite por la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles* (Buitrón, 1999; Garmendia, 1999; ANACAFÉ, 2004; Buddenhagen et al., 2004; Garmendia, 2005; Ibáñez, 2007; Hernández, 2015).

El género *Cinchona* cuenta con 23 especies, siendo las más conocidas *C. officinalis* L., especie endémica y *C. pubescens* especie nativa del valle de Loja, sur del Ecuador. Actualmente estas especies se encuentran localizadas en pequeñas áreas geográficas, se cree que la provincia de Loja produce la quina más apreciada del mercado, por lo que ha recibido diferentes nombres como: quina de Loja, quina fina, o quina verdadera. Por esta razón, Acosta Solís sugirió declararla en 1936 como “Planta Nacional del Ecuador”, simbolizando así el origen histórico del “árbol de la vida” o “planta salvadora de la humanidad” (Andersson y Taylor, 1994; Moya, 1994; Buitrón, 1999; Anda, 2002; Garmendia, 2005; Córdor et al., 2009; Cifuentes, 2013).

La primera descripción científica la realizó Charles Marie de la Condamine en 1738, y la descripción del género y la especie la realizó Linneo basándose en la publicación de La Condamine, quien le asignó el binomen de *C. officinalis* L., que ha prevalecido hasta la actualidad (Buitrón, 1999).

Las propiedades medicinales de *C. officinalis* L., hizo que las poblaciones de la provincia de Loja fueran sobreexplotadas desde el siglo XVII hasta el siglo XIX. Sin embargo, actividades como la agricultura, ganadería y deforestación,

han tenido un impacto mucho más significativo en la destrucción de su hábitat, más que la propia cosecha de la corteza (Madsen, 2002).

2.2. Descripción del género *Cinchona*

Cascarilla, quina y cuarango son los nombres genéricos que reciben diversas especies de árboles del género *Cinchona*, son nativos de los valles andinos de Sudamérica, se distribuye principalmente en regiones del sur de Ecuador y norte de Perú, desde 10° latitud norte hasta 20° latitud sur, encontrándose en altitudes que van desde los 700 hasta los 2 900 m s.n.m. Los árboles de quina o cascarilla en estado natural forman grupos esparcidos en medio del bosque, llamados manchas (Buitrón, 1999; ANACAFÉ, 2004; Campos, et al., 2014; Hernández, 2015).

En Ecuador se encuentran más de la mitad de las especies del género *Cinchona* a una altitud entre los 1 000 a 3 500 m s.n.m. en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja (Garmendia, 1999; Jorgensen y León, 1999; ANACAFÉ, 2004).

La provincia de Loja es considerada como la fuente más importante de *Cinchona*, donde crecen los quinos apreciados (Madsen, 2002), atribuyéndose el origen y principal centro de producción al nudo de Cajanuma (Buitrón, 1999). Garmendia (2005) determina a *C. officinalis* L., como endémica de la región sur del Ecuador, específicamente del valle de Loja.

2.3. Clasificación botánica de *Cinchona officinalis* L.

Reino: Plantae

División: Angiospermas

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Cinchona*

Especie: *officinalis*

Nombre común: Cascarilla, quina o quinina (Missouri Botanical Garden, 2017).

2.4. Descripción botánica

El árbol alcanza una altura de alrededor de 10 a 16 m (Figura 1), con hojas coriáceas, ovaladas, color verde oscuro, pecioladas y con grandes nervios de 1,8 a 2,7 cm de largo y ancho, las flores en inflorescencia terminal, rojas, con corola blanca o rosada tubular de 8 a 13 mm de longitud, se agrupan en panículas, frutos en cápsula cilíndrica con tres o cuatro semillas en su interior. El tipo de germinación es epigea, agente dispersante el viento y polinizador son las aves (Loján, 1992; Martínez et al., 2013).

La corteza externa es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los árboles de 6 a 8 años de edad pueden alcanzar 12 m de altura. Las ramas principales parten del tronco a una altura más o menos de 6 m; puesto que las ramas bajas son desechadas continuamente (Mahecha et al., 2004).



Figura 1. Árbol de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).

2.5. Usos

La cascarilla es considerada como uno de los principales productos forestales del Ecuador, siendo económicamente más importante desde el punto de vista medicinal (Buitrón, 1999). *Cinchona* es el árbol más cultivado para la producción de la quinina, que es un agente antifebril especialmente útil en la prevención y tratamiento de la malaria (Russell, 2012).

El uso culinario tal vez insospechado es en la coctelería a través de mezclas con agua tónica. La quinina extraída de la corteza de estos árboles da el sabor amargo a este tónico que ha conquistado el mercado de bebidas gaseosas, especialmente en Europa y Estados Unidos. Es anecdótico que después de más de cuatro siglos del descubrimiento como tónico medicinal andino, regrese a nuestros países también en forma de tónico, esta vez gaseoso, para su deleite en cócteles (Russell, 2012).

También es sabido que estimula el apetito, tonifica el organismo, es muy utilizada en casos de estrés psíquico y físico, arritmias cardíacas, neumonías, acelerador del parto, tónico capilar para estimular el crecimiento del cabello y evitar la caída, calambres, indigestión, es depurativa pues favorece la eliminación de toxinas por piel y orina (Lopera, Gómez, Muñoz y Ochoa, 2005; Cepvi, 2015; Hernández, 2015).

2.6. Categoría de amenaza

Podemos decir que aún no existe un consenso acerca del estado de conservación de *C. officinalis* L., pese a que ya no se la extrae con igual intensidad, algunos señalan que se halla en la categoría de amenazada, debido a que las poblaciones naturales de esta especie se han reducido por prácticas de quema en agricultura migratoria y explotación de la madera principalmente (Valencia et al., 2000; Mejía et al., 2012). Según los criterios de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) la especie se encuentra en Peligro (EN) (UICN, 2012. Versión 3.1).

2.7. Bibliografía

ANACAFE Asociación Nacional del Café. (2004). Cultivo de Quina: Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera.

Anda, A. (2002). La Cascarilla. Ed. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja – Ecuador. 192 p.

Andersson, L. y Taylor, C. (1994). "Rubiaceae *Cinchoneae coptosapelteae*." En: Harling G, Andersson L (Eds), Flora of Ecuador No 50. Council for nordic publications in Botany. Museo Botánico. Dinamarca. 114p.

- Buddenhagen, C.; Renteria, J.; Gardener, M; Wilkinson, S.; Soria, M.; Yanez, P.; Tye, A. y Valle, R. (2004). Control of a highly invasive tree *Cinchona*, in Galápagos. *Weed technology* 18: 1194-1202p.
- Buitrón, G. 1999. Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. Ecuador: TRAFFIC International. 76p.
- Campos, J.; Cerna, L. y Chico, J. (2014). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. *Revista Científica de Estudiantes. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.* (En línea). Disponible en: [file:///C:/Users/R-LIMA/Downloads/637-1463-1-PB%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/R-LIMA/Downloads/637-1463-1-PB%20(3).pdf).
- Cepvi (2015) Psicología, medicina, salud y terapias alternativas. Enciclopedia de plantas medicinales descripción y usos medicinales; Quina *Cinchona officinalis*. (En línea). Consultado 05 abr. 2015. Disponible en: <http://www.cepvi.com/medicina/plantas/quina.shtml#.VSN2PRqPhTQ>.
- Cifuentes, C. (2013). Estudio de la Composición Química del Tónico Amargo de la Corteza de Quina Roja (*Cinchona pubescens*). Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico farmacéutico. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo Facultad de Ciencias: Escuela de Bioquímica y Farmacia. 101 p.
- Cóndor, C.; Oliveira, B.; Loayza, O. y Reyna P. (2009). Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 54-63. ISSN: 1810-634X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3719/371937612008>
- Garmendia, A. (1999). El árbol de la quina (*Cinchona* spp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.
- Garmendia, A. (2005). El árbol de la quina (*Cinchona* spp), Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura, Universidad Técnica Particular de Loja. UTPL. EC. 185p.

- Hernández, P. (2015). Tratado metódico y práctico de materia médica y de terapéutica. Fundado en la ley de los semejantes; China – *Cinchona officinalis* – Quina – Materia médica. Madrid, España.
- Ibáñez, C. (2007). La malaria como un problema de salud pública. Madrid, España. Disponible en: http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/author/saludpub
- IUCN, International Union for Conservation of Nature. (2012). IUCN Red List Categories and Criteria. Version 3.1, Second edition. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Jorgensen, P. y León, M. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden. 75: 1 – 1182 p.
- Loján, L. (1992). El verdor de los Andes: Árboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal alto andino. FAO. Proyecto de desarrollo forestal participativo en los Andes. Quito, Ecuador, 296 p.
- Lopera, P.; Gómez, I.; Muñoz, L. y Ochoa, F. (2005). El Milagro de las Plantas: Aplicaciones medicinales y orofaríngeas. (M. Ramírez, Ed.) Colombia, 232. https://books.google.com.ec/books?id=ss3tcgKqh_UCyprintsec=frontcoveryh1=esysource=gbs_ge_summary_rycad=0#v=onepageqyf=false
- Madsen, J. (2002). Historia cultural de la cascarilla de Loja, Botánica austro ecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Ediciones Abya Yala, Quito-Ecuador. 385-399 p.
- Mahecha, G.; Ovalle, A.; Camelo, D.; Rozo, A. y Barrero, D. (2004). Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas, Bogotá, Colombia 871.
- Martínez, A.; Guallart, R.; Fernández, F.; Gómez, M. y Martínez, J. (2013). Quino/*Cinchona officinalis* / el árbol de la Quina. (En línea). Consultado el 02 abr. 2015. Disponible en: <http://elarbolmiamigo-encinarosa.blogspot.com/2013/01/quino-cinchona-officinalis-el-arbol-de.html>

- Mejía, F.; Suni, M. y Albán, J. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L. Lima: Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxi/cap07.pdf 6 p.
- Missouri Botanical Garden. (2017). *Cinchona officinalis*. Quinine. Retrieved from <http://www.mobot.org/mobot/archives/image.asp?filename=GPN1982-0505.tif&returnto=/mobot/archives/results.asp>.
- Moya, A. (1994). Auge y Crisis de la Cascarilla en la Audiencia de Quito, Siglo XVIII. FLACSO, sede Ecuador. Obtenido de: <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/44227.pdf>
- Russell, J. (2012). *Cinchona Officinalis*. (B. o. Demand, Ed., 1 p). <http://www.loot.co.za/product/jesse-russell-cinchona-officinalis/wzvd-2307-g330>.
- Valencia, R.; Pitman, N.; León-Yáñez S. y Jorgensen, P. (2000). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, EC. 489.

CAPÍTULO 3.

3. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1. Fase de campo

El trabajo de campo se realizó en la provincia de Loja en tres cantones (Loja, Saraguro y Catamayo), en donde se identificaron cuatro relictos boscosos (Quebrada El Naque, Quebrada San Simón, Uritusinga y Selva Alegre) (Figura 2). En cada sitio se colectó frutos/semillas de árboles características fenotípicas sobresalientes.

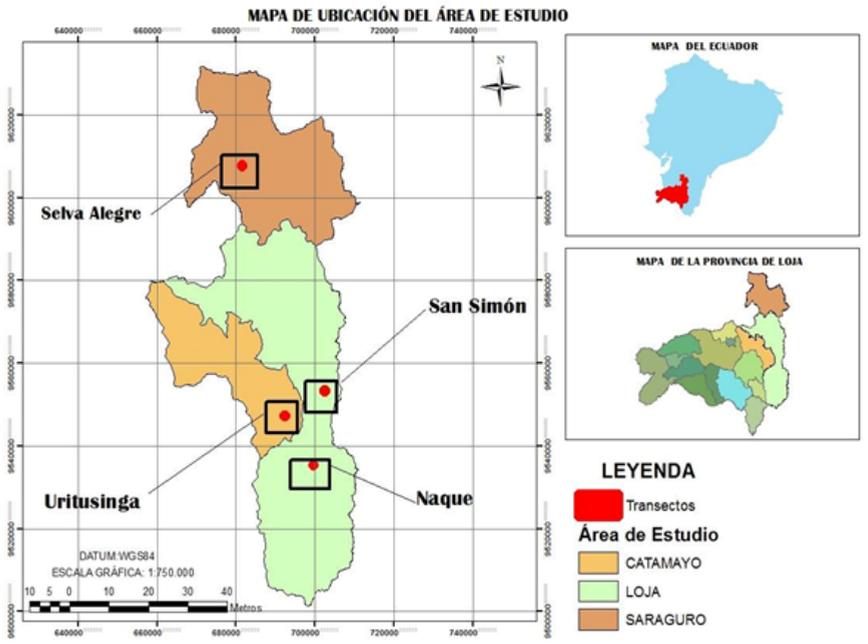


Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio (Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Lima (2016).

3.1.1. Quebrada El Naque

El sitio El Naque, se encuentra ubicado en la parroquia Malacatos, cantón Loja, donde se identificó *Cinchona officinalis* L., en la quebrada El Naque a 1 816 m s.n.m. (53° 53' 82" S y 72° 00' 26" O), en parte del bosque secundario

entre vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada, ya que ha sido utilizada con fines agropecuarios (Figura 3).



Figura 3. Paisaje de la Quebrada El Naque, Malacatos, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL 2019).

3.1.2. Quebrada San Simón

La quebrada San Simón, se encuentra ubicada en la microcuenca Zamora Huayco, cantón Loja, donde se identificó *Cinchona officinalis* L. y se encuentra ubicada a 2 217 m s.n.m. ($60^{\circ} 77' 58''$ S y $68^{\circ} 15' 38''$ O), en tierras agropecuarias, en parte de vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada (Figura 4).



Figura 4. Paisaje de la Quebrada San Simón, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).

3.1.3. Sitio Uritusinga

El sitio Uritusinga se encuentra ubicado en la parroquia El Tambo, cantón Catamayo, en donde se identificó *Cinchona officinalis* L. y se encuentra ubicado a 2 438 m s.n.m. ($55^{\circ} 33' 79''$ S y $70^{\circ} 24' 92''$ O), en plantaciones abandonadas de pino entre vegetación arbustiva y herbácea, zona que se encuentra utilizada para pastoreo (Figura 5).



Figura 5. Paisaje Sitio Uritusinga, El Tambo, Catamayo, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).

3.1.4. Parroquia Selva Alegre

La parroquia Selva Alegre, se encuentra en el cantón Saraguro, *Cinchona officinalis* L., se identificó en el sitio Santa Lucía a 2 744 m s.n.m. ($54^{\circ} 73' 10''$ S y $69^{\circ} 24' 35''$ O), en tierras agropecuarias, en parte de vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada y es utilizada para pastoreo (Figura 6).



Figura 6. Paisaje Sitio Selva Alegre, Saraguro, Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).

3.2. Fase de laboratorio

El trabajo de inoculación *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal (Figura 7) del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, ubicado a 3 kilómetros del centro de la ciudad de Loja, en las coordenadas $04^{\circ} 00' 00''$ S y longitud $79^{\circ} 12' 00''$ O.



Figura 7. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y González, 2017).

CAPÍTULO 4.

4. DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS *IN VITRO*

4.1. Generalidades

La semilla es uno de los principales recursos para el manejo silvícola de algunas especies forestales, para iniciar programas de conservación de germoplasma, reforestación y recuperación de ecosistemas degradados de especies, debido a que pueden almacenarse por largos periodos (Ascon-Bieto y Talon, 2001).

Sin embargo, la semilla de *Cinchona* no puede ser almacenada por largos periodos de tiempo, debido a que al ser una semilla recalcitrante rápidamente pierde su viabilidad; por ello, estas semillas se almacenan por corto tiempo a temperaturas de 6 - 8 °C y en un ambiente húmedo; además, que deben utilizarse tratamientos pre germinativos (Donoso, 1993; Arnold, 1996; Ascon-Bieto y Talon, 2001).

La semilla de *C. officinalis* L., se encuentran dentro del fruto que es una cápsula cilíndrica de color marrón oscuro, de forma elipsoide, dehiscente, las semillas son fusiformes, redondeadas por un ala membranosa de 7 - 10 mm de largo × 2 - 3 mm de ancho, son ligeras y un gramo puede contener ± 9 000 semillas (Figura 8). (ANACAFE, 2004; Garmendia, 2005; Galeano, 2009; Martínez, et al., 2013). A medida que las semillas se almacenan pierden su viabilidad, mientras que, las semillas frescas germinan entre 11 a 20 días (Acosta, 1947; Pappa, 2004)



Figura 8. Frutos y semillas de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL, 2019 y Chamba, L. 2017).

4.2. Estudio de caso: “Procesos Biotecnológicos para la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., a partir de diferentes fuentes de material vegetal” Autor: Nelson Ramiro Lima Jiménez

4.2.1. Colecta de frutos

La colecta de frutos para la obtención de semillas se realizó en árboles seleccionados, y se consideró las características morfológicas, fisiológicas (color marrón a pardo) y fitosanitarias, así también los frutos colectados fueron colocados en papel periódico o fundas de papel identificadas (Figura 9).



Figura 9. Colecta de frutos de *Cinchona officinalis* L.(Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019).

4.2.2. Selección de semillas

La selección de las semillas que vienen de campo se realiza en laboratorio, donde se colocan los frutos fisiológicamente maduros en bandejas, para permitir que se abran los frutos y se libere la semilla, se selecciona las semillas con buenas características fenotípicas (forma, tamaño, color), madurez fisiológica y con las mejores condiciones fitosanitarias, de ser necesario para

esta actividad se puede hacer uso de una lupa o un estéreo-microscopio. Por el tamaño de la semilla que es pequeño y a fin de manipularlas de mejor manera, se colocan en un tul en número de 30 a 50, el tul con las semillas se coloca en frascos de vidrio, para su desinfección en la cámara de flujo laminar (Figura 10).



Figura 10. Selección de semillas de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL 2019 y Lima, 2016).

4.2.3. Desinfección de semillas *in vitro*

La desinfección de semillas se realizó en cámara de flujo laminar, en condiciones asépticas, la semilla se coloca dentro del tul en frascos, con una solución de alcohol etílico al 70 % durante un minuto, tiempo durante el cual se debe remover bien el frasco. Pasado un minuto, se retira la solución de alcohol y se realiza un enjuague con agua destilada estéril, a fin de remover residuos de la solución de alcohol. A continuación, se desinfecta la semilla con una solución de cloro comercial (5 % de NaClO de ingrediente activo). En el presente estudio se aplicó tres concentraciones de NaClO (15, 25 y 50 % respectivamente) en tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos respectivamente) (Cuadro 2). Finalmente, se retira la solución de cloro y se realiza tres enjuagues con agua destilada estéril, a fin de remover residuos de cloro, una vez terminado este procedimiento la semilla esta lista para ser inoculada (Figura 11).

Cuadro 2. Tratamientos de investigación para evaluar la desinfección de semilla de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTOS	DESINFECTANTE	Tiempo de Inmersión
	Concentración NaClO (%)	
1	15	5 minutos
2	15	10 minutos
3	15	15 minutos
4	25	5 minutos
5	25	10 minutos
6	25	15 minutos
7	50	5 minutos
8	50	10 minutos
9	50	15 minutos

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL (2016); Lima (2016).

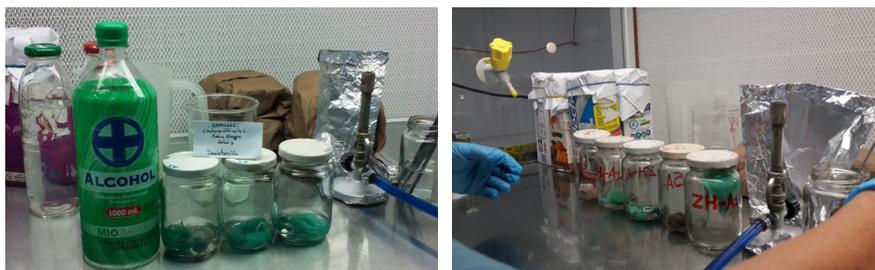


Figura 11. Desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L. en cámara de flujo laminar (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL, 2016).

4.2.4. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una solución nutritiva que consta de las sales minerales del MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas (Thiamina 1 mg L⁻¹ y Mio-inositol 100 mg L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante al 0,6 % y ácido giberélico (AG₃) en tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1,0 mg L⁻¹).

El pH del medio de cultivo se ajusta a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N. Se distribuye 3 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo, finalmente se esteriliza en autoclave a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $1,5\text{ kg/cm}^2$ de presión, durante 20 minutos (Figura 12).



Figura 12. Preparación y esterilización del medio de cultivo (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).

4.2.5. Siembra de semillas *in vitro*

La siembra o inoculación de semillas al igual que la desinfección se realiza en cámara de flujo laminar, en condiciones asépticas, donde se coloca las semillas en una caja o plato de Petri. Para evitar el contacto y posible daño, con una espátula se inoculan las semillas en el medio de cultivo. En el presente estudio el medio de cultivo que se utilizó fue sólido (3 ml) distribuido en tubos de ensayo. Una vez inoculadas las semillas se debe sellar con parafilm e identificar los tubos inoculados, para ser colocados en el cuarto de incubación a una temperatura $\pm 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 16 horas luz - 8 horas de oscuridad, por un periodo de 45 días (Figura 13).



Figura 13. Siembra de semilla *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2016 y Lima, 2016).

4.2.6. Evaluación de ensayos

La evaluación se realiza por observación directa, durante 45 días, las variables evaluadas en este estudio son: contaminación, días a la contaminación, germinación de semillas y días a la germinación.

4.2.6.1. Porcentaje y días a la contaminación

La contaminación es la presencia de microorganismos (hongos y/o bacterias) en la semilla, medio de cultivo o tubo de ensayo, para lo cual, se contabiliza el número de semillas contaminadas en cada tratamiento y se hace relación al número total de semillas sembradas en el ensayo (Figura 14).



Figura 14. Semillas contaminadas por hongos (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).

Los días a la contaminación, se considera como los días transcurridos desde la siembra hasta el día en que se observa presencia de microorganismos (hongos bacterias y/o levaduras).

4.2.6.2. Porcentaje de germinación de semillas

Se considera la germinación de semillas *in vitro* al observar emerger la radícula del embrión (Figura 15).



Figura 15. Semillas germinadas *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Lima, 2016).

Para obtener el porcentaje de germinación de semillas por tratamiento, se contabiliza el número de semillas germinadas en cada tratamiento, con los datos obtenidos se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{No de semillas germinadas}}{\text{No total de semillas sembradas}} \times 100$$

Los días a la germinación, se considera como los días transcurridos desde la siembra hasta el día en que emerge la radícula de la semilla.

Los datos del ensayo de laboratorio se anotan en una hoja de registro (Anexo 1 y 2).

4.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo utiliza un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 3 x 3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones. La unidad experimental es un tubo de ensayo con dos semillas, cada tratamiento consta de 15 tubos de ensayo (30 semillas), en todo el ensayo se evaluó 135 tubos de ensayo (270 semillas).

Se utilizó el software Info Stat (Di Rienzo et al., 2009). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), estableciendo diferencias significativas con el test de LSD Fisher a un nivel de significancia de 0,05 en cada uno de los ensayos realizados.

4.2.8. Resultados

4.2.8.1. Porcentaje y días a la Contaminación

En el presente estudio la contaminación de semillas *in vitro*, se presentó en diferente tiempo para los distintos tratamientos. En general, al desinfectar la semilla con cloro comercial (5 % de NaClO de ingrediente activo) en concentraciones de 15, 25 y 50 %, durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, el porcentaje de contaminación de semillas *in vitro* se mantuvo en valores menores al 14 %, la contaminación fue ocasionada principalmente por hongos y/o bacterias. El ANOVA y Test de LSD Fisher al 0,05 % mostraron que no existe diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p= 0,3276$) (Figura 16).

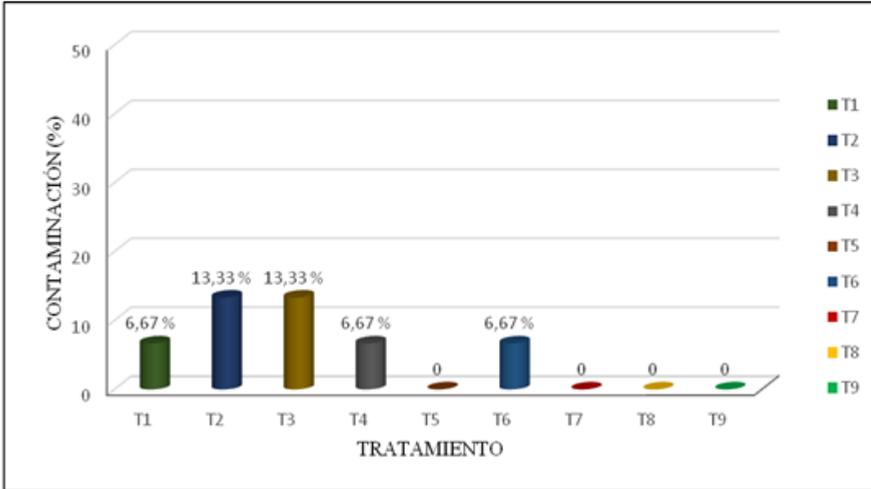


Figura 16. Porcentaje promedio de contaminación de semillas *in vitro* de *C. officinalis* L.

Sin embargo, se puede observar que, en los tratamientos que se desinfectó con NaClO al 50 % de concentración, durante 5, 10 y 15 minutos (T7, T8 y T9) respectivamente y con NaClO al 25 % de concentración, durante 15 minutos (T5), no se presentó contaminación. Mientras que, en los tratamientos que se desinfectó con NaClO al 15 % de concentración, durante 10 y 15 minutos (T2 y T3) respectivamente la contaminación fue de 13,33 % iniciando el quinto día después de la siembra. Así mismo, en los tratamientos que se desinfectó con NaClO al 25 % de concentración, durante 5 y 15 minutos (T4 y T6) respectivamente, la contaminación fue de 6,67 %, iniciando el quinto día en un tratamiento y el día diez después de la siembra en otro tratamiento. A partir del día 15 después de la siembra, no se observó contaminación.

Debemos considerar que, si bien la aplicación de desinfectantes disminuye la contaminación exógena, existe una contaminación causada por microorganismos presentes dentro de las células vegetales (contaminación endógena), que es un problema frecuente, que no se elimina mediante la desinfección externa, pero que se puede combatir mediante el cultivo de meristemos y la adición de antibióticos al medio de cultivo (Valenzuela-Núñez y Armendáriz-Erives, 2000).

En este sentido, a pesar de que el material vegetal proviene de campo, donde con seguridad se encuentra expuesto al ataque de plagas y enfermedades, y considerando que no se aplicó ningún antibiótico al medio de cultivo, el porcentaje de contaminación en semillas *in vitro* se encuentra dentro de un rango aceptable en cultivo de tejidos. Por lo que se puede atribuir que la desinfección con hipoclorito de sodio al 5 % de ingrediente activo, en mayor concentración resulta más efectiva.

4.2.8.2. Germinación de semillas *in vitro*

La germinación de semillas *in vitro* se presentó en diferente tiempo para los distintos tratamientos. En general al suplementar el medio de cultivo con ácido giberélico (AG_3) en concentraciones de 0,5 y 1,0 $mg L^{-1}$, más un testigo, el porcentaje de germinación de semillas *in vitro* alcanzó valores entre 40 y 70 %. El ANOVA y Test de LSD Fisher al 0,05 % mostró que si existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p= 0,0379$) (Figura 17).

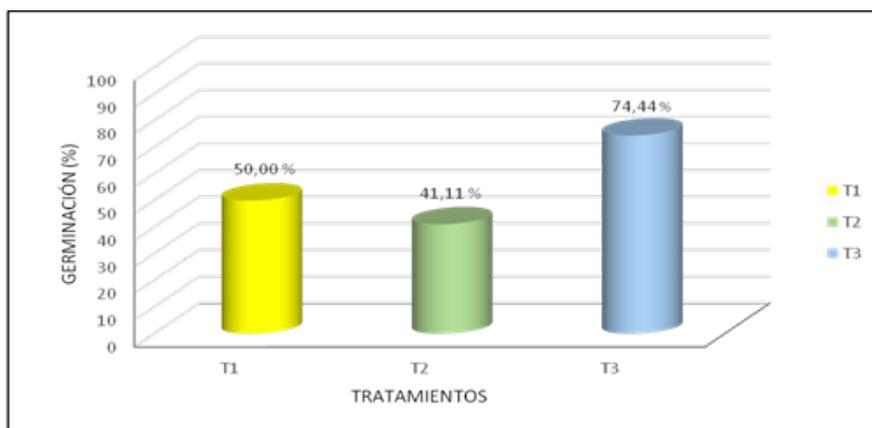


Figura 17. Porcentaje promedio de germinación de semillas *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Se puede observar que en el tratamiento suplementado con 1.0 $mg L^{-1}$ AG_3 (T3) la germinación de semillas *in vitro* fue de 74,44 %, iniciando a los 15 días después de la siembra y estabilizándose a los 45 días; de manera similar, el tratamiento Testigo (sin hormona) obtuvo un 50,0 %, iniciando a los 20 días y estabilizándose los 45 días de inoculación; y el tratamiento con 0,5 $mg L^{-1}$ AG_3 (T2) con 41,11 %, iniciando a los 20 días y estabilizándose los 40 días de inoculación.

4.3. Conclusiones

- Al realizar la desinfección de semillas *in vitro* con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50%, durante 5, 10 o 15 minutos, no presentó contaminación de ningún tipo.
- Con una concentración de 1,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) que se adicionó al medio de cultivo (MS), el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L, fue de 74,44 %.

4.4. Bibliografía

- Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas del Ecuador*. Quito: Editorial del Ecuador. Retrieved from <http://www.biodiversitylibrary.org/item/146652>
- ANACAFE Asociación Nacional del Café. (2004). *Cultivo de Quina: Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera*.
- Arnold, F. (1996). *Manual de vivero forestal: elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile*. Documento Técnico CONAF-DED.
- Ascon-Bieto y Talon (2001). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Madrid: Edit. Interamericana-McGraw-Hill.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. (2009). *InfoStat versión*. Argentina.: Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba.
- Donoso, C. (1993). *Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- Galeano, V. (2009). *Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades*. AHYAT, Ed., 223.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp), Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*, Universidad Técnica Particular de Loja. UTPL. 185p.

- Lima, R. (2016). Procesos Biotecnológicos para la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., a partir de diferentes fuentes de material Vegetal. Tesis de grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 84 p.
- Martínez, A; Guallart, R; Fernández, F; Gómez, M. y Martínez, J. (2013). Quino *Cinchona officinalis* el árbol de la Quina. Disponible en: <http://elarbolmiamigo-encinarosa.blogspot.com/2013/01/quino-cinchona-officinalis-el-arbol-de.html>.
- Pappa 2004. Cultivo de la Quina. Anacafé, 11 pp.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Valenzuela-Núñez, L.M. y Armendáriz-Erives, S. (2000). Uso de antibióticos en Medios De Cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. Universidad de Chapingo. 1(1) 4pg.

CAPÍTULO 5.

5. FASE DE MULTIPLICACIÓN O BROTACIÓN DE EXPLANTES *IN VITRO*

5.1. Generalidades

En la fase de multiplicación o brotamiento se espera que los explantes originen brotes axilares con varios nudos y hojas (Castillo, 2004). Los brotes *de novo* son necesarios para a la producción de material vegetal de calidad y libre de enfermedades (Martínez-Ruiz, et al., 2003) y servirán para las siguientes fases de enraizamiento y aclimatación.

El descubrimiento de las citocininas y el hallazgo de que éstas, en combinación con las auxinas que regulan la morfogénesis de brotes, fueron de suma importancia para desarrollo de técnicas para la regeneración de plantas a partir de células en cultivo (Smith y Wood, 1998).

El éxito de la fase de brotamiento, depende de los reguladores de crecimiento (citocininas, auxinas o su combinación), concentraciones hormonales y especie en la que se ensaya. En este capítulo se presenta un ensayo ejecutado en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, que dio paso a la definición de un protocolo para el proceso biotecnológico de multiplicación o brotación múltiple para *C. officinalis* L.

5.2. Estudio de caso: “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas, en La Argelia - Loja” Autora: Lorena Melania Chamba Granda.

5.2.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal para la fase de multiplicación o brotamiento *in vitro* consiste en explantes (segmentos apicales y segmentos nodales) obtenidos a partir de plántulas de 5 cm de altura, germinadas *in vitro*, con buenas características morfológicas y fitosanitarias.

5.2.2. Selección del material vegetal

La selección de vitroplantas inicia en el cuarto de incubación, donde se selecciona plantas de tamaño similar, consistentes, de color y condiciones adecuadas. En cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, utilizando cajas de petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas se obtienen los explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de 2 a 3 cm con 1 o 2 nudos, que son sembrados en frascos de vidrio con medio de cultivo.

5.2.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo para micropropagación de explantes está constituido por sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas (Thiamina 5 mg L⁻¹ y Mio-inositol 100 mg L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante al 0.6 % y reguladores de crecimiento como Ácido Naftalen acético (ANA) y Benzil amino purina (BAP), en distintas concentraciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la interacción de auxina – citocinina en la fase de inducción de brotamiento múltiple de explantes de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTOS	Auxina	Citocinina
	mg L ⁻¹	
	ANA	BAP
1	0,5	2,5
2	0,5	3,0
3	0,5	3,5
4	1,5	2,5
5	1,5	3,0
6	1,5	3,5

El pH del medio de cultivo se ajusta a 5,8 ± 0,2 con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N. El medio de cultivo se distribuye en frascos de vidrio en un volumen de 30 ml. Los frascos con medio de cultivo se esterilizan en autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg cm⁻² de presión, durante 25 minutos (Figura 18).

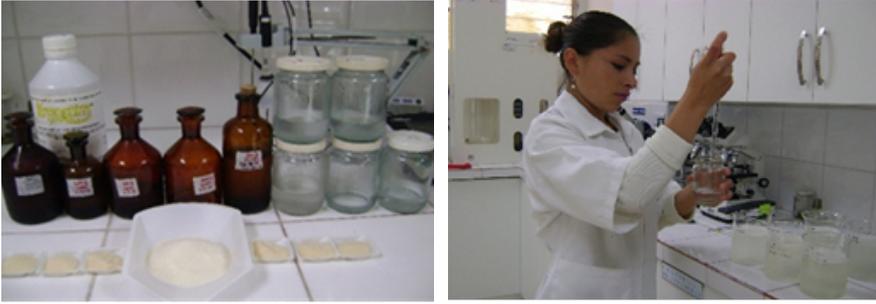


Figura 18. Preparación del medio de cultivo MS Murashige y Skoog (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Chamba, 2017).

5.2.4. Siembra de explantes *in vitro*

La siembra o inoculación de explantes *in vitro* se realiza en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas. Se siembra a razón de dos explantes por frasco de vidrio con medio de cultivo para el fin. Los frascos se identifican y colocan en el cuarto de incubación, donde se mantienen a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad por un periodo de 90 días (Figura 19).



Figura 19. Siembra de explantes *in vitro* en la cámara de flujo laminar (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL y Chamba, 2017).

5.2.5. Evaluación de ensayos

La evaluación se realiza por observación directa, durante 90 días que dura el ensayo, las variables evaluadas en este estudio son: porcentaje de brotamiento, número de brotes, número de nudos, número de hojas, longitud del brote.

Además, se registra el porcentaje de contaminación, días a la contaminación y mortalidad.

5.2.5.1. Número de brotes, nudos y hojas

En cada tratamiento, se contabiliza el número de brotes *de novo*, nudos y hojas bien formados por explante y se obtiene el número de brotes *de novo*, nudos y hojas promedio.

5.2.5.2. Longitud de brote

La longitud del brote se determina midiendo con una regla o papel milimétrico el brote *de novo* y se obtiene la longitud en cm o mm de brote en promedio por tratamiento.

5.2.5.3. Contaminación

En esta etapa se evalúa durante los 30 primeros días el porcentaje y días a la contaminación; y, porcentaje de sobrevivencia de explantes; además, es importante también determinar si existe formación de raíces, callos u otras estructuras. Los datos de los ensayos de laboratorio se anotan en una hoja de registro (Anexos 3, 4 y 5).

5.2.6. Diseño experimental y análisis de datos

Para evaluar el ensayo, se utiliza un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial de 2 x 3, con 6 tratamientos, 3 repeticiones. La unidad experimental es el explante, sembrando 2 explantes por frasco, 48 explantes por tratamiento y 288 explantes en el ensayo.

Para el análisis de datos se utiliza el software InfoStat (Di Rienzo et al, 2008) versión 2008, para determinar si existe diferencia significativa entre tratamientos se aplica un Análisis de Varianza (ANOVA), para establecer entre que tratamientos existe diferencia se aplica el Test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Se prueba supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad para cada una de las variables.

5.2.7. Resultados

5.2.7.1. Número de brotes

El número de brotes varía de un tratamiento a otro. En general al adicionar ANA y BAP al medio de cultivo en diferentes concentraciones, el número promedio de brotes *de novo* estuvo entre 2,00 y 6,06. El ANOVA y prueba de Tukey mostró que si existe diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0007$).

Con el tratamiento suplementado con ANA 0,5 mg L⁻¹ + BAP 2,5 mg L⁻¹ (T1), obtuvo 6,06 brotes en promedio (Figura 20).

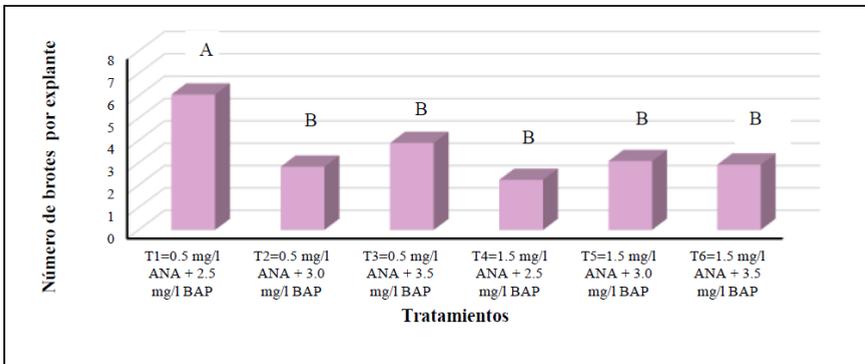


Figura 20. Número promedio de brotes *in vitro* por explante de *Cinchona officinalis* L.

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

5.2.7.2. Longitud del brote

Se logró obtener una longitud promedio de brotes de alrededor de 20 mm; así, el tratamiento con 1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP (T5), alcanzó la mayor longitud de brote con 17,68 mm, seguido del tratamiento con 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP (T1), con 16,07 mm; T6 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,5 mg L⁻¹ BAP) con 15,09 mm; T3 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 3,5 mg L⁻¹ BAP) con 14,55 mm; T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) 13,57 y finalmente el tratamiento T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP) con 12,58 (Figura 21).

El ANOVA y prueba de Tukey mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0001$).

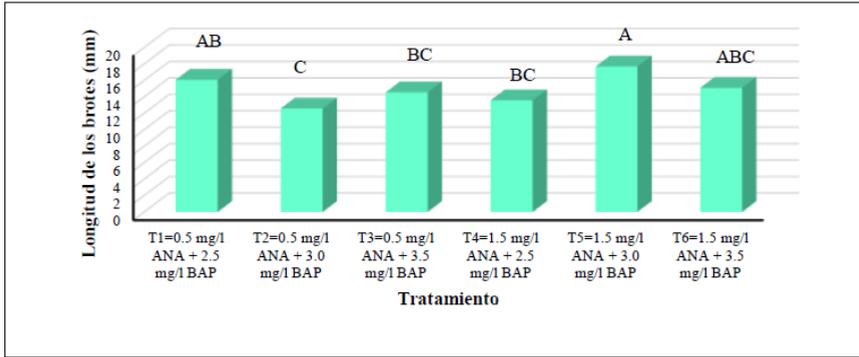


Figura 21. Longitud de brote promedio por explante de *Cinchona officinalis* L. **Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).**

5.2.7.3. Número de nudos

Se registró que el tratamiento T1 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) con 2,92 nudos en promedio fue el mejor frente a los tratamientos T2 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) y T3 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) que obtuvieron un número de nudos en promedio de 1,56 y 2,02 respectivamente. Además, en los tratamientos T4 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), T5 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) y T6 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) se observó 1,60; 2,02 y 1,68 nudos en promedio, respectivamente (Figura 22).

Para el número de nudos por explante, según el ANOVA y prueba de Tukey mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,0016$).

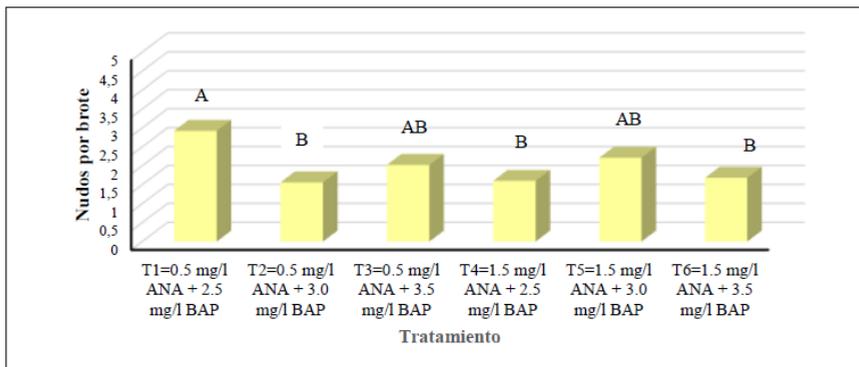


Figura 22. Número de nudos promedio de *Cinchona officinalis* L. **Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).**

5.2.7.4. Número de hojas

Se observó que el tratamiento T1 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor número de hojas promedio por explante con 6,20; mientras que los tratamientos T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 3,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvieron un número de hojas promedio por explante de 3,21 y 4,25 respectivamente. En los tratamientos T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP), T5 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP) y T6 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,5 mg L⁻¹ BAP) el número de hojas promedio por explante fue de 3,31; 4,75 y 3,73 mm, respectivamente (Figura 23).

Para el número de hojas por explante, según el ANOVA y prueba de Tukey presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,0001$).

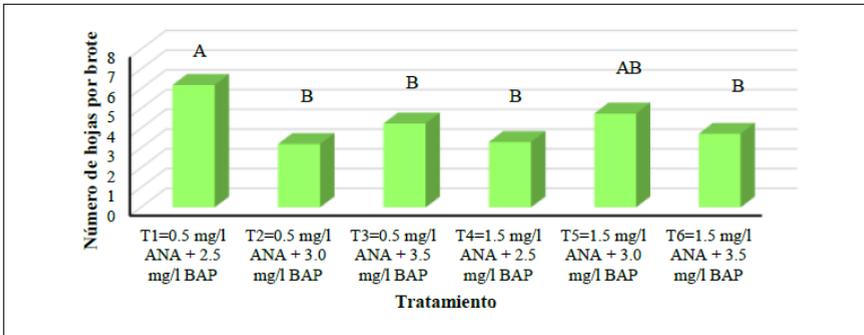


Figura 23. Número promedio de hojas de *Cinchona officinalis* L.

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En los estudios realizados por Lima (2016) y Córdova (2012) reportan resultados en la inducción de brotes, nudos y hojas en explantes de *Cinchona officinalis* L., utilizando concentraciones de 0,2 mg L⁻¹ de ANA + 2 mg L⁻¹ de BAP y 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1 mg L⁻¹ de BAP respectivamente.

5.2.7.5. Contaminación de explantes in vitro

A pesar de tratarse de explantes provenientes de vitroplantas, que no requieren de procedimientos de desinfección por tratarse de material estéril, se evidenció niveles bajos de contaminación en tres tratamientos. Corroborando así que, la contaminación se puede presentar incluso cuando se trabaja con material aséptico, Esta contaminación tiene dos orígenes: a)

microorganismos endófitos y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en laboratorio, estos organismos se conocen como “vitro patógenos” (Hernández, 2010).

La contaminación en explantes *in vitro* se evidenció a partir del noveno día de inoculación en el tratamiento T6, donde se inició con una contaminación de 8,32 % y se estabilizó a los 18 días en 24,9 %; en el tratamiento T5, la contaminación inició a los 12 días de la inoculación, con un 4,16 %, estabilizándose a los 15 días en 8,32 %, y en el tratamiento T3 la contaminación se observó a partir de los 15 días iniciando en 4,16 %, este porcentaje se mantuvo constante hasta los 30 días de evaluación. Además, cabe señalar, que en los tratamientos T1, T2 y T4, no se presentó contaminación de ningún tipo.

5.2.7.6. Mortalidad en explantes *in vitro*

La mortalidad se evidenció al sexto día para el T1 con un porcentaje de 4,16; en el T2 a los nueve días de la siembra se presentó un 2,08 % de mortalidad; en el T3 se evidenció a los 15 días de evaluación un porcentaje de mortalidad del 2,08; en los tratamientos 4 y 5 a los 12 días de la siembra se presentó un porcentaje de mortalidad del 2,08 y 4,16 respectivamente, estos porcentajes se mantuvieron durante los 30 días de evaluación; y finalmente el tratamiento T6 a los 9 días de la siembra presentó mortalidad de 8,3 %, estabilizándose a los 27 días con un valor de 24,9 %.

5.3. Conclusiones

- En la fase de multiplicación o brotación de *Cinchona officinalis* L., los porcentajes de contaminación y mortalidad de los explantes fueron bajos en la mayoría de los tratamientos ensayados, en razón de utilizar como fuente de explantes vitroplantas que crecieron en condiciones de asepsia.
- La multiplicación de *Cinchona officinalis* L. alcanzó un valor máximo en la formación de brotes adventicios con la interacción hormonal 0.5 mg L⁻¹ ANA + 2.5 mg L⁻¹ BAP (T1), es decir concentraciones bajas que se utilizó de ANA- BAP respecto de los tratamientos aplicados, resultaron más efectivas.

5.4. Bibliografía

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*.
- Chamba, L. (2017). Procesos biotecnológicos para brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L, a partir de vitroplantas en la Argelia-Loja. Universidad Nacional de Loja. Loja – Ecuador.
- Córdova, P. (2012). Evaluación del efecto de los ciclos de cultivo y reguladores de crecimiento sobre la estabilidad genética en el cultivo de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* usando marcadores ISSR. Universidad Técnica Particular de Loja. 50 p.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2008). *InfoStat versión*. Argentina.: Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba.
- Hernández, Y. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes . *cultrop* vol.31 no.4 La Habana. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015. 19 p.
- Lima, R. (2016). Procesos biotecnológicos para la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., a partir de diferentes fuentes de material vegetal. Tesis de grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 84 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Martínez-Ruiz, R. Azpiroz-Rivero, H. S. Rodríguez-de la O, J.L. Cetina-Alcalá, V. M. Gutiérrez-Espinosa M. A. 2003. Aplicación de la Biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 9(1): 17-34, 2003.

CAPÍTULO 6.

6. FASE DE ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES *IN VITRO*

6.1. Generalidades

En la fase de enraizamiento, se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de dos centímetros, obtenidos durante la fase de multiplicación (brotes múltiples), los cuales, se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas (Castillo, 2004).

El enraizamiento *in vitro* en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica; en esta fase, pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento como auxinas para promover la rizogénesis (Olmos et al., 2004). El enraizamiento depende de varios factores: potencial genético, la condición fisiológica y nutricional de las plantas madre, la edad de la planta, la concentración del regulador de crecimiento aplicado y la concentración endógena del mismo. La aplicación de ácido indol butírico (AIB) aumenta la concentración de auxinas en la base de la estaca, promueve la activación de las células del cambium y favorece la formación de raíces adventicias (Vanzini, 2016).

En esta sección se exponen dos ensayos realizados en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, con la finalidad de inducir al enraizamiento en explantes de *C. officinalis* L., provenientes de la fase de brotación. En el primer caso, los explantes fueron sometidos a diferentes tipos y concentraciones de tres auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y, ácido indol butírico (AIB); mientras que, en el segundo caso se probó la interacción auxina-citocinina ácido indol butírico (AIB) + benzil amino purina (BAP), en diferentes concentraciones, como se muestran más adelante.

6.2. Estudio de caso 1: “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas, en La Argelia - Loja” Autora: Lorena Melania Chamba Granda.

En este ensayo se evaluó el efecto de tres tipos de auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indol butírico (AIB), en tres concentraciones de 0,1 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹ y 1,0 mg L⁻¹ respectivamente, con la finalidad de inducir el enraizamiento en explantes de *C. officinalis* L., a continuación, se detalla la metodología empleada para la instalación del ensayo.

6.2.1. Medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con vitaminas: 5,0 mg L⁻¹ de tiamina y 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, sacarosa 2,0 %, agar 0,6 %; y como reguladores de crecimiento ANA, AIA y AIB en diferentes concentraciones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos para evaluar el efecto hormonal de auxinas en la inducción de enraizamiento de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Descripción
T1	0,1 mg L ⁻¹ ANA
T2	0,5 mg L ⁻¹ ANA
T3	1,0 mg L ⁻¹ ANA
T4	0,1 mg L ⁻¹ AIA
T5	0,5 mg L ⁻¹ AIA
T6	1,0 mg L ⁻¹ AIA
T7	0,1 mg L ⁻¹ AIB
T8	0,5 mg L ⁻¹ AIB
T9	1,0 mg L ⁻¹ AIB

El pH del medio de cultivo se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N, según el requerimiento. Finalmente se

distribuyó 30 ml de medio de cultivo en cada frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave (120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión), durante 25 minutos (Figura 24).



Figura 24. Preparación del medio de cultivo MS suplementado con auxinas y citoquininas.

6.2.2. Obtención de material vegetal e inoculación

El material vegetal se obtuvo de vitroplantas en brotamiento de alrededor de 5 cm de altura, de donde se colectaron los ápices caulinares y segmentos nodales, de los cuales se extrajeron explantes de 2 a 3 cm de altura con al menos 2 nudos. Su desinfección no fue necesaria, debido a que el material se encontraba en estado aséptico; sin embargo, se eliminaron partes muertas y/o necrosadas (Figura 25).

La inoculación *in vitro* de explantes de *C. officinalis* L. se realizó en cámara de flujo laminar, los materiales de disección usados fueron: cajas de petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas que sirvieron para manipular el material vegetal. Se inocularon dos explantes en cada frasco de vidrio, con el respectivo medio de cultivo según las especificaciones de su tratamiento (Figura 25).

Finalmente se identificó cada frasco según su tratamiento y se los ubicó en el cuarto de incubación, a una temperatura de ± 23 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 90 días.

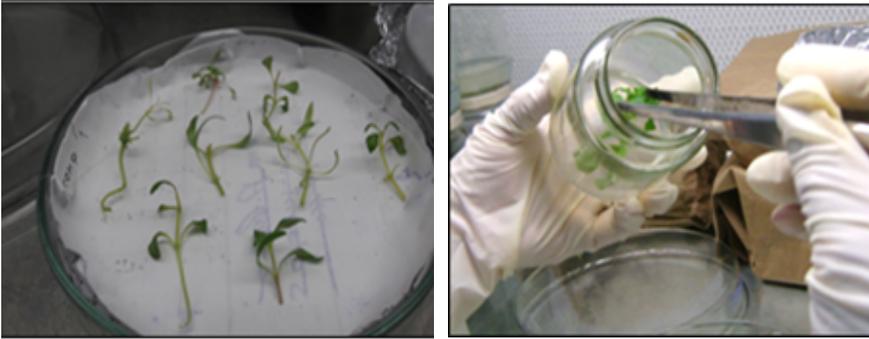


Figura 25. Preparación de explantes de *Cinchona officinalis* L., e inoculación *in vitro* en medio MS para inducir enraizamiento.

6.2.3. Diseño experimental aplicado

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial de 3 x 3, con nueve tratamientos y tres repeticiones.

Cuadro 5. Factores y concentraciones de los reguladores de crecimiento.

Factores	Concentraciones
Nivel de concentración de ANA	0,1 mg L ⁻¹ (A1)
	0,5 mg L ⁻¹ (A2)
	1,0 mg L ⁻¹ (A3)
Nivel de concentración de AIA	0,1 mg L ⁻¹ (A1)
	0,5 mg L ⁻¹ (A2)
	1,0 mg L ⁻¹ (A3)
Nivel de concentración de AIB	0,1 mg L ⁻¹ (C1)
	0,5 mg L ⁻¹ (C2)
	1,0 mg L ⁻¹ (C3)

6.2.3.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos):	8
Número de tratamientos:	9
Número de repeticiones:	3
Número de unidades experimentales por tratamiento:	3
Número total de frascos por tratamiento:	24

Número total de unidades experimentales del ensayo:	27
Número total de explantes por frasco:	2
Número de explantes por unidad experimental:	16
Número total de explantes:	432

6.2.3.2. Unidad experimental y evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de ocho frascos de vidrio, en donde se inocularon un total de 16 explantes (dos por frasco). Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación y mortalidad, días a la contaminación, número de raíces/explante y longitud de raíces; además, se evaluó la longitud de brotes, número de brotes/explante, número de nudos/explante, número de hojas/explante.

Para la evaluación de contaminación y mortalidad de los explantes de *C. officinalis* L., se realizaron registros cada tres días por el lapso de 30 días, a partir de la siembra (Anexo 6). Entre tanto para la evaluación de la longitud de brotes en mm, número de brotes/explante, número de nudos/explante, número de hojas/explante, número de raíces/explante y longitud de raíces en mm, se tomaron registros cada 10 días, hasta 90 días después de la siembra.

6.2.3.3. Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2008) versión 2008, en donde se realizó el análisis de varianza, estableciendo diferencias significativas con el test de Duncan a un nivel de significancia de 0,05.

6.2.4. Resultados

6.2.4.1. Porcentaje de contaminación de explantes, a los 30 días de evaluación

El porcentaje de contaminación presentó un coeficiente de variación de 27,25 % y diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$). El tratamiento con mayor porcentaje de contaminación es el T1 (0,1 mg L⁻¹ ANA) con un valor de 20,83 % frente a los tratamientos T8 (0,5 mg L⁻¹ AIB) y T7 (0,1 mg L⁻¹ AIB) que no presentaron contaminación (Figura 26).

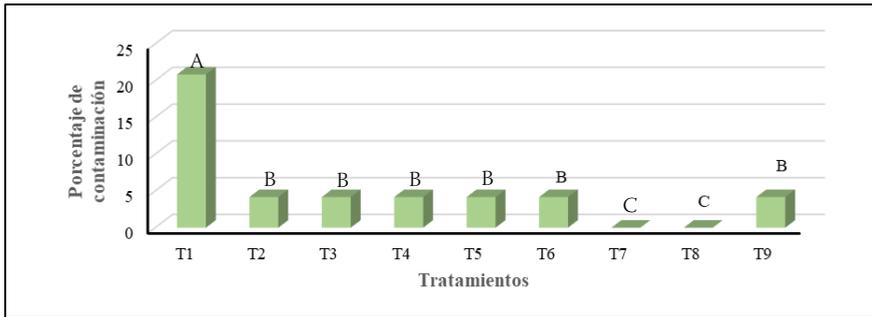


Figura 26. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., para el ensayo de enraizamiento *in vitro*.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

6.2.4.2. Número de días a la contaminación

La contaminación se evidenció a partir del tercer día de evaluación, en los tratamientos: T1 con 20,83 %; y, T2, T3, T4 y T5 con 4,16 % en cada caso, valor que se mantuvo durante el periodo de evaluación; en el T6 apareció contaminación a los 18 días de evaluación con 4,16 %; en el tratamiento T9 la contaminación se evidenció a los 9 días de evaluación con 4,16 %. Finalmente, en los tratamientos T7 y T8 no presentaron contaminación (Figura 27).

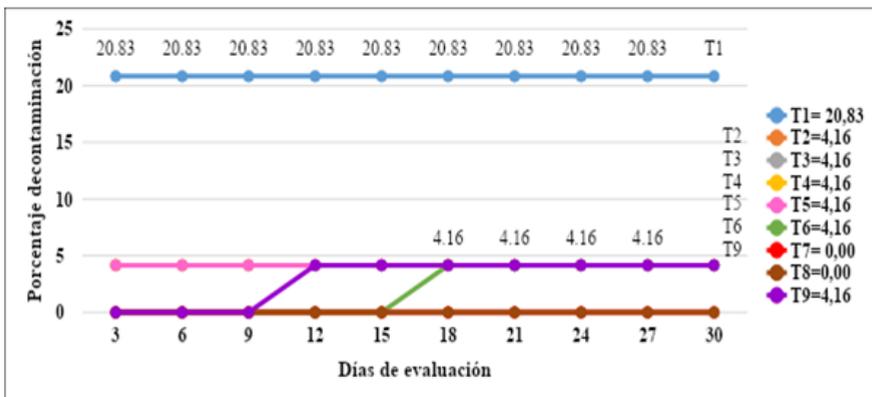


Figura 27. Días a la contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., para el ensayo de enraizamiento *in vitro*.

6.2.4.3. Porcentaje de mortalidad

El porcentaje de mortalidad presentó un coeficiente de variación de 27,25 % y diferencias significativas entre tratamientos ($p = < 0,0001$) donde se observa que el tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad fue el tratamiento T1 (0,1 mg L⁻¹ ANA) con 20,83 % frente a los tratamientos T8 (0,5 mg L⁻¹ AIB) y T7 (0,1 mg L⁻¹ AIB) que no presentaron índices de mortalidad (Figura 28).

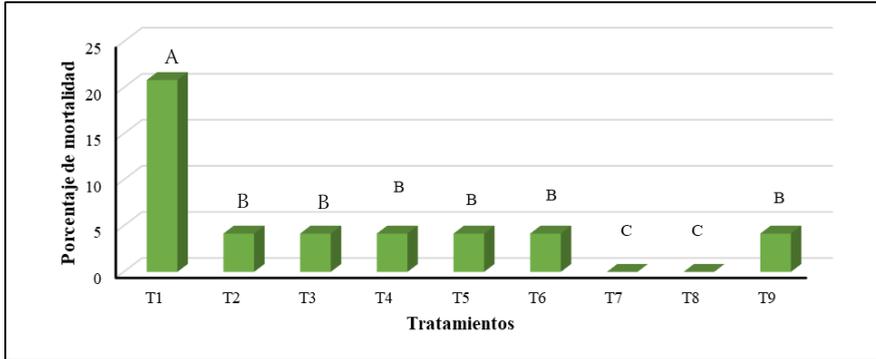


Figura 28. Porcentaje de mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L., para el ensayo de enraizamiento *in vitro*.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

6.2.4.4. Número de brote por explante

El número de brotes formados por explante presentaron un coeficiente de variación alto (21,98 %) y diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,0009$), donde se observa que el T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA) presentó el mayor promedio con 3,74 brotes por explante; frente al T6 (1,0 mg L⁻¹ AIA), con el menor promedio de brotes por explante, alcanzando un valor de 1,03 (Figura 29).

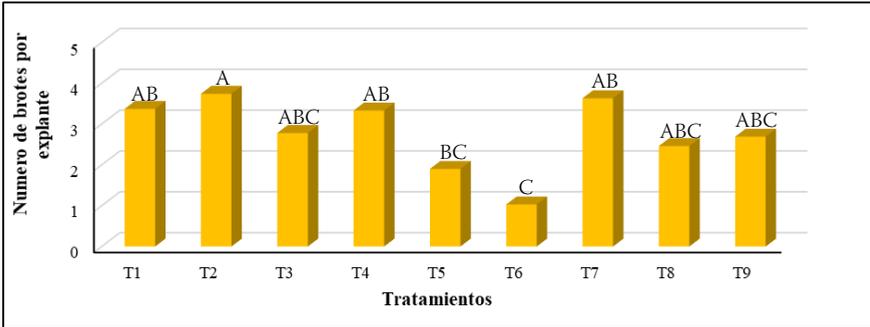


Figura 29. Número de brotes por explantes de *Cinchona officinalis* L. en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Letras diferentes muestran diferencia significativa ($p > 0,05$)

6.2.4.5. Longitud de brotes

La longitud de brotes presentó un coeficiente de variación del 13,61 % y diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,0046$). Los tratamientos con mayor longitud fueron el T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA) con un promedio de 31,29 mm; T3 (1 mg L⁻¹ ANA) con 30,76 mm y el T1 (0,1 mg L⁻¹ ANA); frente al tratamiento T8 (0,5 mg L⁻¹ AIB), que presentó la menor longitud de brotes con un promedio de 17,92 mm (Figura 30).

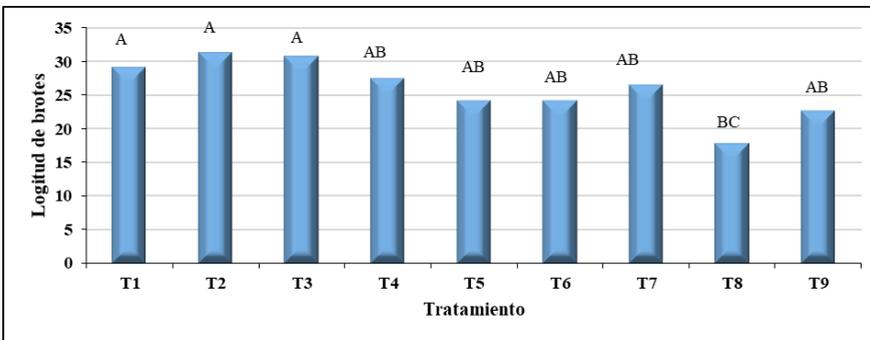


Figura 30. Longitud promedio de brotes en tratamientos aplicados a explantes para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

6.2.4.6. Número de nudos por explante

El número de nudos por brote registra que el tratamiento T1 (0,1 mg L⁻¹ ANA) con un promedio de 2,92 presentó mayor número de nudos por brote; frente a los tratamientos T8 (0,5 mg L⁻¹ AIB) y T7 (0,1 mg L⁻¹ AIB), con promedios de 1,44 y 1,40 nudos por brote respectivamente (Figura 31). Además el coeficiente de variación de 21,00 % y hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,0037$).

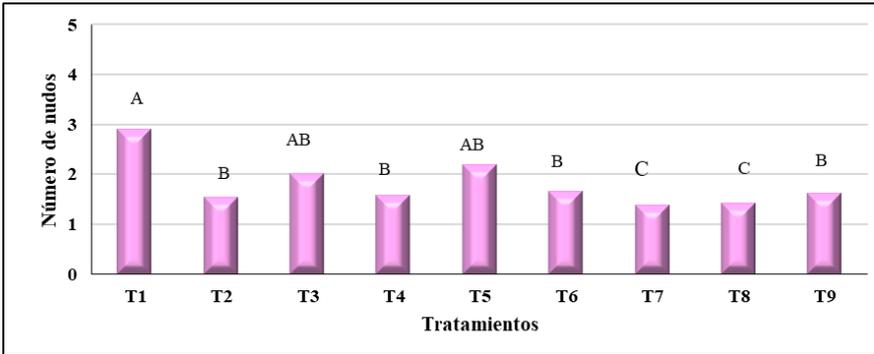


Figura 31. Promedio del número de nudos por explante de *Cinchona officinalis* L., en los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

6.2.4.7. Número de raíces por explante

El número de raíces por explante presentó un coeficiente de variación de 89,38 % y diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$). El tratamiento con mayor número promedio de raíces fue el T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA) con 5,31 raíces/explante; frente a los tratamientos T5 (0,5 mg L⁻¹ AIA); T6 (1,0 mg L⁻¹ AIA) y T4 (0,1 mg L⁻¹ AIA) que no hubo presencia de raíces (Figura 32).

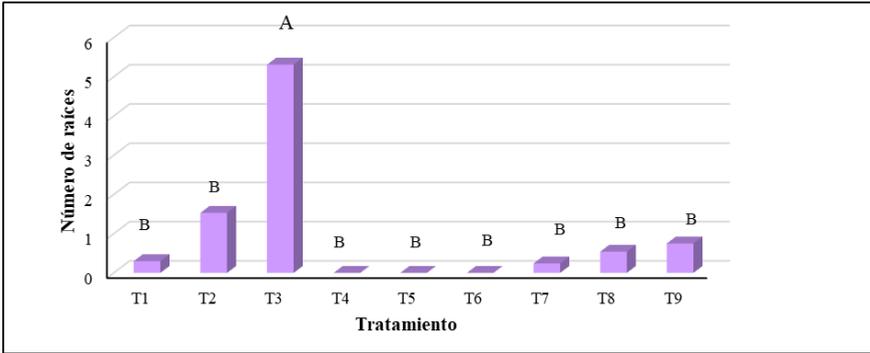


Figura 32. Número promedio de raíces por explante, en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

6.2.4.8. Longitud de raíces por explante

La longitud de raíces por explante registra un coeficiente de variación de 73,66 % y diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,0001$), donde el tratamiento con mayor longitud de raíces fue el T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA) con 2,45 mm; frente a los tratamientos T4 (0,1 mg L⁻¹ AIA), T5 (0,5 mg L⁻¹ AIA) y T6 (1,0 mg L⁻¹ AIA) que no presentaron enraizamiento (Figura 33).

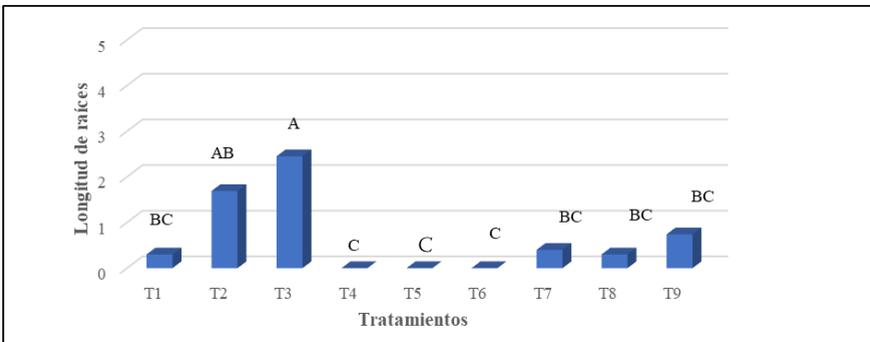


Figura 33. Tamaño promedio de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).



Figura 34. Explantes enraizados de *Cinchona officinalis* L. (Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona, 2017 - 2018).

6.2.5. Conclusiones

- El enraizamiento de *Cinchona officinalis* L. alcanzó un máximo en la aplicación hormonal ANA 1,0 mg L⁻¹ (T1), resaltando que las raíces se formaron a través de organogénesis indirecta o callos.
- La utilización de ANA en 1,0 mg L⁻¹ (T1), permitió la formación de callo en los explantes, inhibiendo la formación de raíces, las cuales se formaron en la base del callo.
- El enraizamiento de *Cinchona officinalis* L. por organogénesis directa se presentó en la concentración hormonal AIB 1,0 mg L⁻¹.

6.3. Estudio de caso 2: “Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja” Autora: Daniela Katherine Paredes Jiménez.

En el segundo caso, se evaluó la interacción de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* en explantes de *Cinchona officinalis* L.

6.3.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo compuesto por sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas (Tiamina 1 mg L⁻¹ y Mio - Inositol 100 mg L⁻¹), sacarosa 2 %, agar 0,6 %, carbón activado 1,0 g L⁻¹ y reguladores de crecimiento constituido por auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones como se expone en el Cuadro 6. El pH del medio se ajustó a 5,8 ± 0,2 de ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N, según el caso.

Cuadro 6. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina, para enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Auxina	Citoquinina
	AIB (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
T1	1,0	0,0
T2	2,0	0,0
T3	1,0	0,5
T4	2,0	0,5

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL, 2017-2018.

El medio de cultivo se distribuyó en frascos de vidrio a razón de 30 ml/frasco y se esterilizó en autoclave a temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos.

6.3.2. Selección e inoculación de explantes

Los explantes fueron seleccionados de vitroplantas provenientes de tres sitios: Uritusinga, Zamora Huayco y Selva Alegre; luego en la cámara de flujo laminar se sembraron dos explantes por frasco, para lo cual se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales obtenidos previamente en la fase de brotación, el tamaño de los explantes fue de 1,0 a 2,0 cm de altura con 1 a 2 nudos.

Los frascos fueron identificados por tratamiento, sector de procedencia, número de árbol codificado por sector y fecha de siembra; y se colocaron en

el cuarto de incubación a una temperatura de $\pm 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, durante 90 días, que duró la evaluación.

6.3.3. Diseño experimental

En el presente ensayo se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 4 x 3, con cuatro tratamientos y tres repeticiones. En el cuadro 7 se muestran los factores (hormonas) y las concentraciones usadas en el enraizamiento a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *C. officinalis*, mientras que en el cuadro 8 se exponen los tratamientos evaluados.

Cuadro 7. Factores y concentraciones de auxina-citoquinina para formación de raíces.

FACTORES	CONCENTRACIONES (mg L ⁻¹)
Nivel de concentración de auxinas (AIB)	1,0 (A1)
	2,0 (A2)
Nivel de concentración de citoquininas (BAP)	0,0 (C1)
	0,5 (C2)

Cuadro 8. Efecto de la interacción auxina – citoquinina en el enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Descripción	Código
T1	1,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mg L ⁻¹ BAP	A1 C1
T2	2,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mg L ⁻¹ BAP	A2 C1
T3	1,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ BAP	A1 C2
T4	2,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ BAP	A2 C2

6.3.3.1. Especificaciones del diseño experimental por sitio

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales totales	12
Número total de frascos por tratamiento	15

Número total de explantes por frasco	2
Número de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes del ensayo	120

6.3.3.2. Análisis estadístico

Para el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey al 0,05 de probabilidad, se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017), con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

6.3.3.3. Parámetros evaluados

La evaluación se realizó a través de observación directa durante 90 días, en periodos de cinco días a partir del tercer día de haberse realizado la siembra de explantes. Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante, longitud de raíces, longitud de brote, porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de oxidación fenólica.

6.3.4. Resultados

El análisis de los resultados de la fase de enraizamiento se realizó por separada en cada sitio (Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre).

6.3.4.1. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

A los 90 días de evaluación el enraizamiento, no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,8224$), para los explantes colectados en sector Zamora Huayco; sin embargo, el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor porcentaje de enraizamiento con 46,11 %; mientras que T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el valor más bajo con 39,44 % (Figura 35).

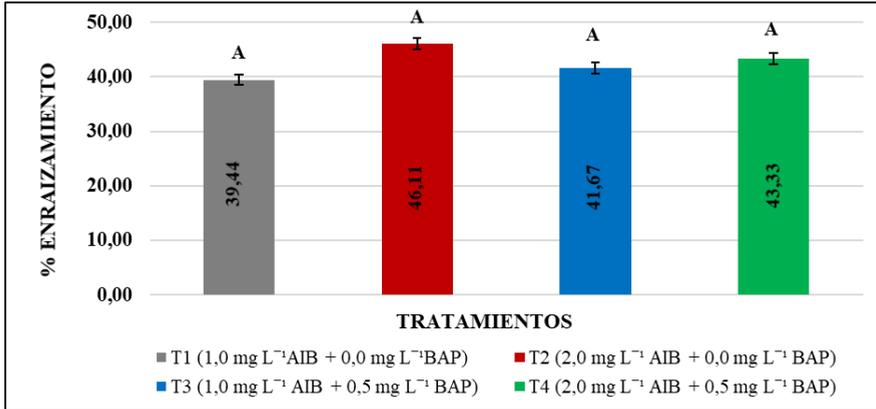


Figura 35. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Zamora Huayco.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

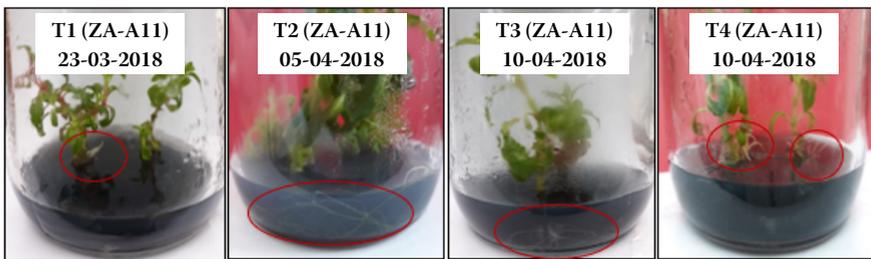


Figura 36. Enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Zamora Huayco.

b. Sector Uritusinga

En este sector el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) registró el mayor porcentaje de enraizamiento (17,78). Al contrario, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) no presenta ningún indicio de formación de raíces, siendo este el valor más bajo (0 %) al culminar la evaluación (Figura 37 y 38).

Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 %, mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.2557$)

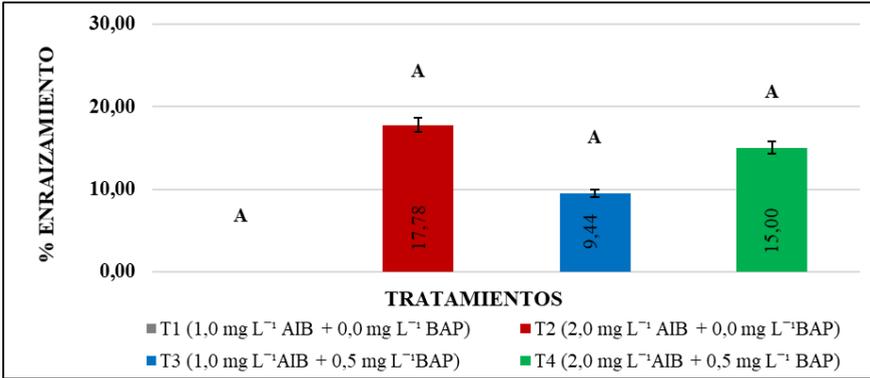


Figura 37. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Uritusinga.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

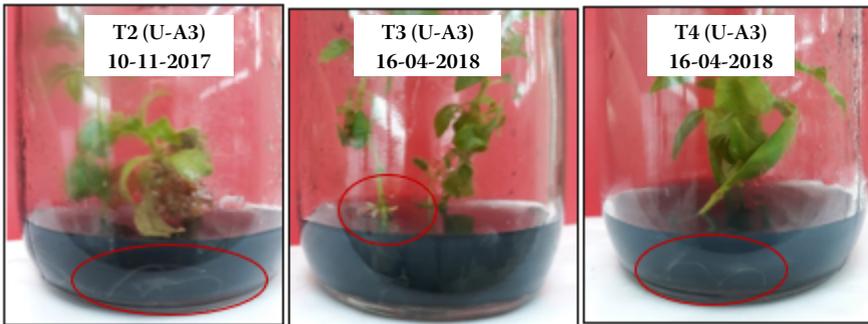


Figura 38. Enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

c. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre el T2 (2,0 mg L⁻¹ + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentaron el mayor porcentaje de enraizamiento con 26,67 %; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el valor más bajo con 12,22 % al culminar la evaluación (Figura 39 y 40).

Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 % mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,3461$).

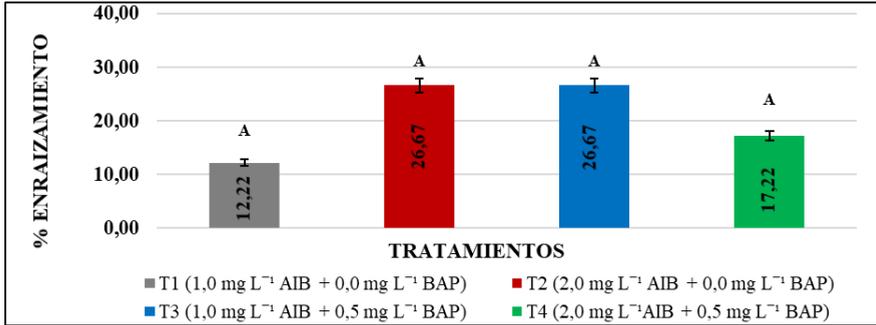


Figura 39. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Selva Alegre.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

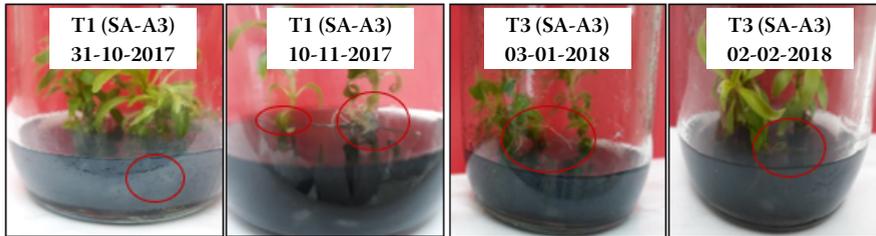


Figura 40. Enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.

6.3.4.2. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

En el caso de los explantes provenientes del sector Zamora Huayco a los 90 días de evaluación, se determinó que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor número promedio de raíces con 2,77; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor número con 2,37 raíces por explante (Figura 41).

Se observó formación de raíces a los 20 días de haber realizado la siembra, en los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); mientras que, en los T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) las raíces se observaron a los 25 días.

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,8224$) entre tratamientos.

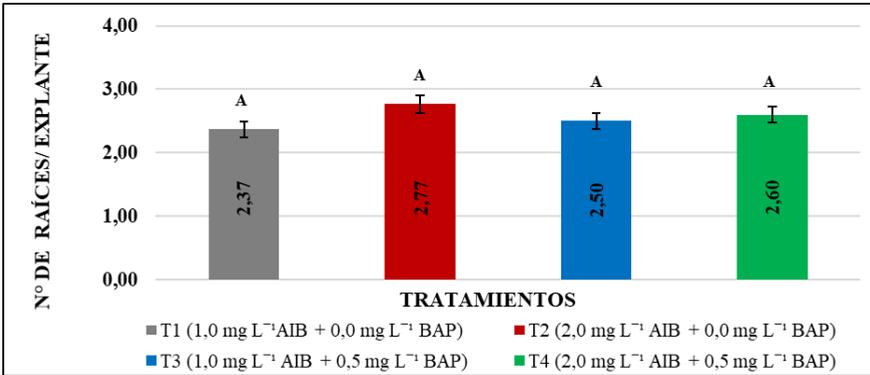


Figura 41. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$.

b. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga a los 90 días de evaluación, se determinó que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el mayor número promedio de raíces con 1,07; en cambio, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor número con 0,57 (Figura 42).

Se observó las primeras raíces a partir de los 55 días de haberse realizado la siembra en los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) por el contrario, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) no registró la aparición de raíces y diferencias significativas ($p= 0,2557$) entre tratamientos.

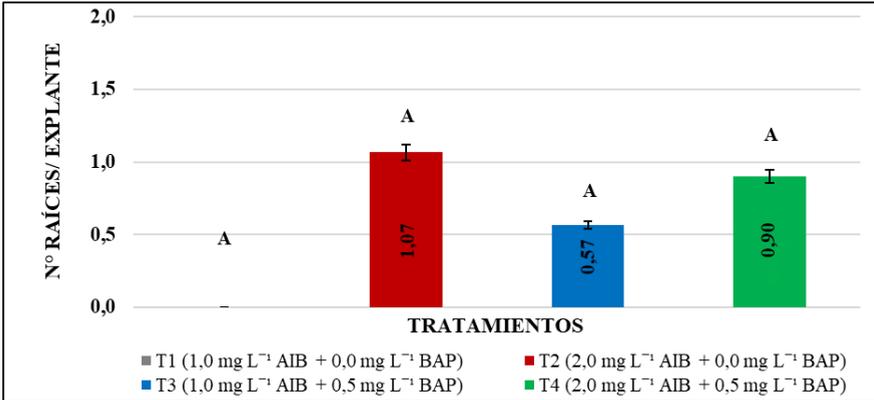


Figura 42. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

c. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre a los 90 días de evaluación, se determinó que los T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvieron el mayor número promedio de raíces con 1,60 en ambos casos; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor número promedio de raíces con 0,73 (Figura 43).

Se observó las primeras raíces en el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) luego de 20 días de haber realizado la siembra, en el transcurso de 30 días se apreció en el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); a los 45 días se presencié en el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y luego de 50 días se registró en el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP). Además, no existe diferencias significativas ($p = 0,3461$) entre tratamientos.

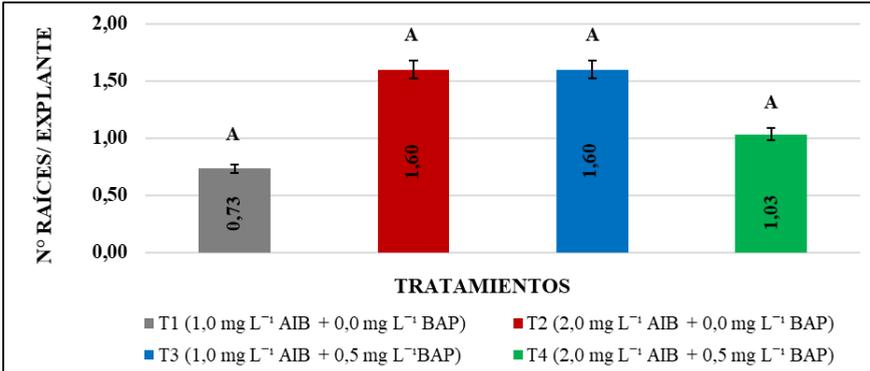


Figura 43. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

6.3.4.3. Longitud de raíces en explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

Luego de 90 días de evaluación, la longitud promedio de las raíces en los explantes provenientes del sector Zamora Huayco indicaron que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor promedio con 2,1 cm; mientras que, el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio con 1,4 cm (Figura 44).

El ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existen diferencias estadísticas significativas ($p = 0,8732$) entre los tratamientos.

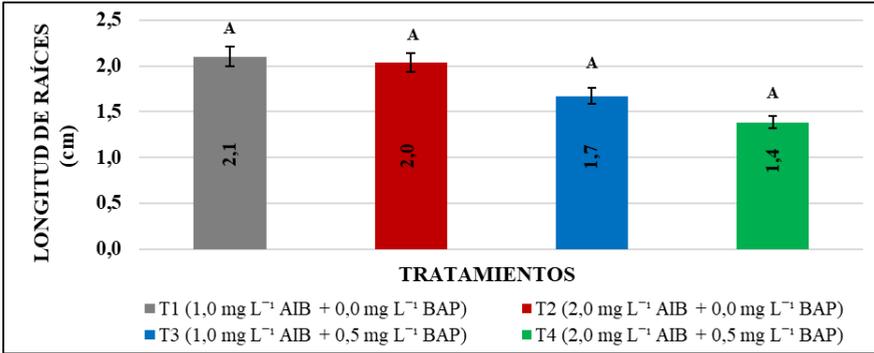


Figura 44. Longitud promedio de raíces en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

b. Sector Uritusinga

La longitud promedio de raíces en los explantes del sector Uritusinga registró que el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor promedio de raíces con 0,5 cm; mientras que, el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio con 0,2 cm (Figura 45). Es necesario indicar, que en el T1 no presento la formación de raíces adventicias. Además, no existen diferencias estadísticas significativas ($p = 0,8254$) entre los tratamientos.

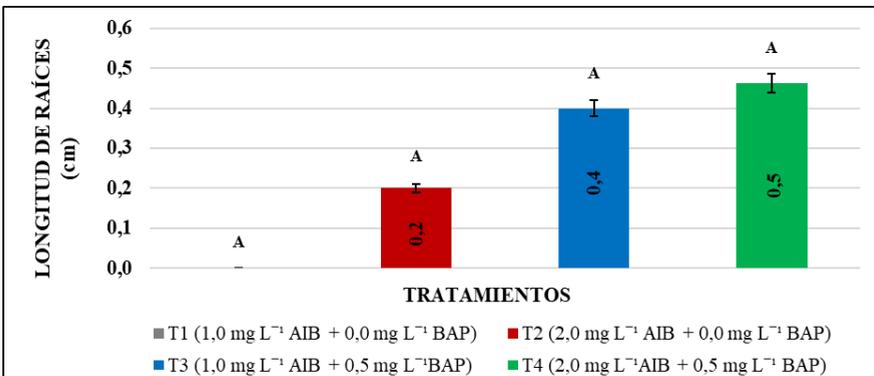


Figura 45. Longitud promedio de raíces de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

c. Sector Selva Alegre

La longitud promedio de raíces en los explantes provenientes del sector Selva Alegre indicaron que el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó el mayor promedio de raíces con 1,2 cm. Por otro lado, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el menor promedio con 0,4 cm (Figura 46). Además, no existen diferencias estadísticas significativas ($p=0,1992$) entre los tratamientos.

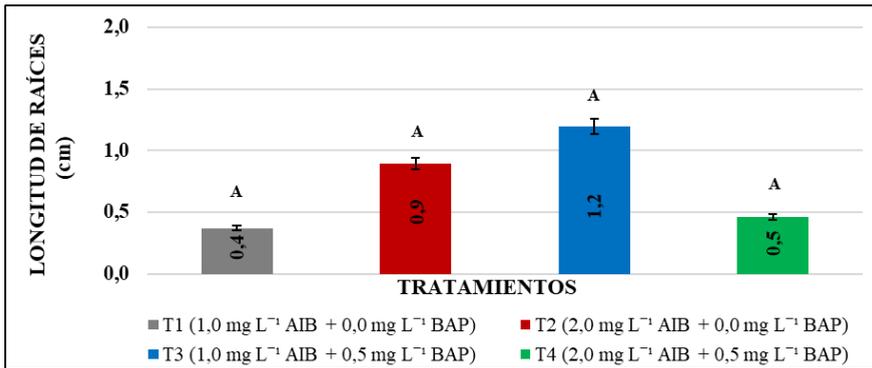


Figura 46. Longitud promedio de raíces de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$.

6.3.4.4. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

Al culminar la evaluación a los 90 días en el sector Zamora Huayco, alcanzó la mayor longitud promedio con 4,1 cm el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP). Por otra parte, el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio con 3,5 cm (Figura 47).

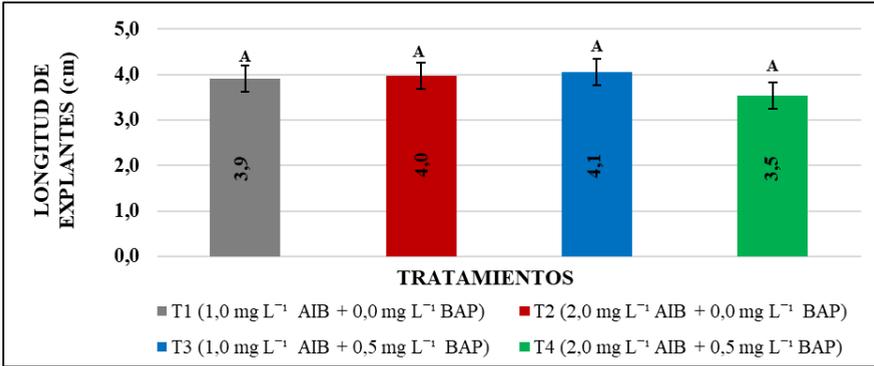


Figura 47. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

b. Sector Uritusinga

El sector Uritusinga registró la mayor longitud promedio con 3,7 cm en el T4 (2,0 mg L⁻¹ + 0,5 mg L⁻¹ BAP); sin embargo, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el menor promedio con 2,5 cm (Figura 48).

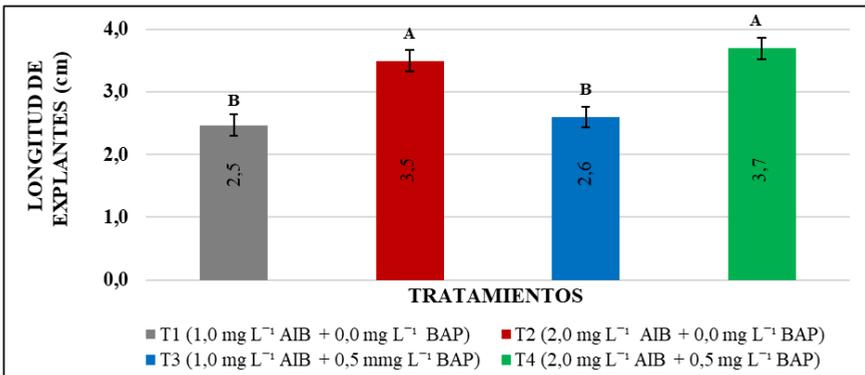


Figura 48. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

c. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre presentaron la mayor longitud promedio con 3,2 cm los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); mientras que, el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó el menor promedio con 2,4 cm (Figura 49).

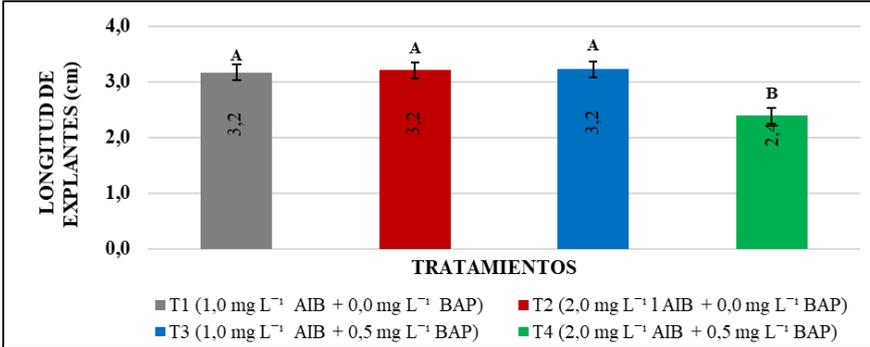


Figura 49. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

6.3.4.5. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) no presentaron contaminación; sin embargo, la contaminación del T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 13,33 % (Figura 50).

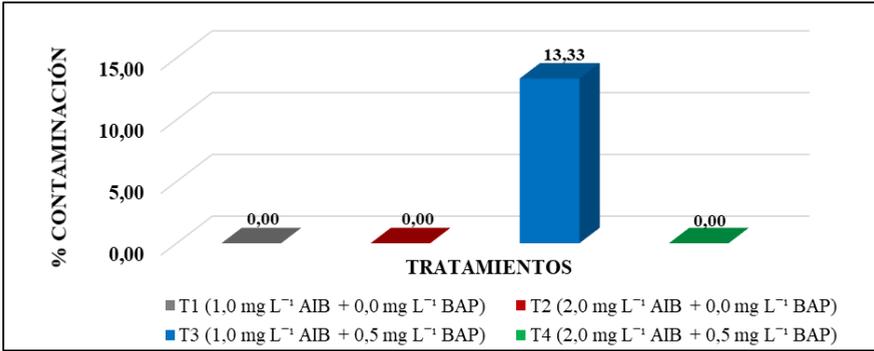


Figura 50. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

b. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga, tres tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) no presentaron contaminación. Mientras que, la contaminación del T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue del 6,67 % (Figura 51).

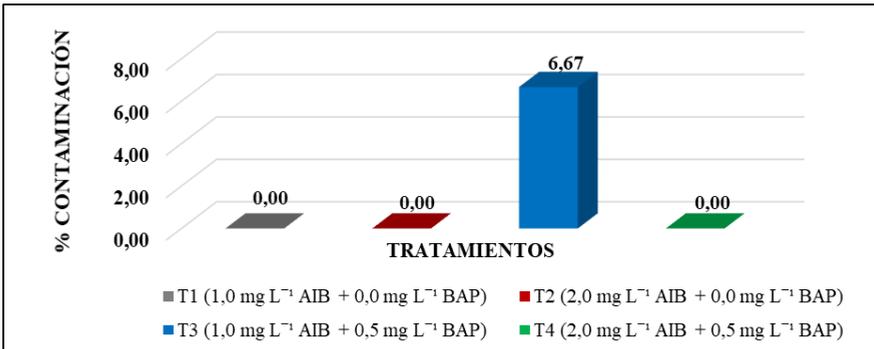


Figura 51. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

c. Selva Alegre

En el sector Selva Alegre los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) no presentaron contaminación alguna; en cambio, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB

+ 0,5 mg L⁻¹ BAP) llegó a un porcentaje de contaminación del 6,67 % (Figura 52).

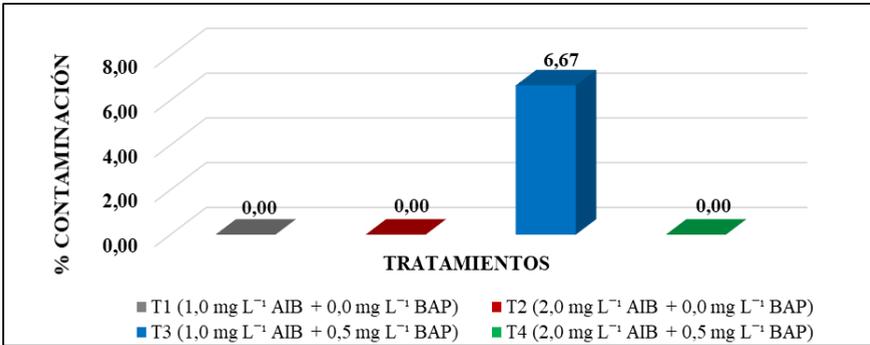


Figura 52. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

6.3.4.6. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco, de manera general, el porcentaje de sobrevivencia fue alto, es así que, en el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 86,67 %; mientras que, el 100 % de sobrevivencia lo presentaron los tratamientos: T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) (Figura 53).

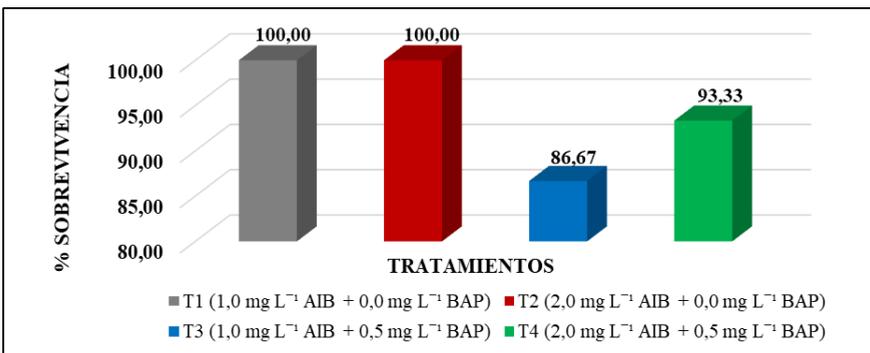


Figura 53. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

b. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga el porcentaje de sobrevivencia fue superior al 93,33 % en el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP), conservando el 100 % en los T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (Figura 54).

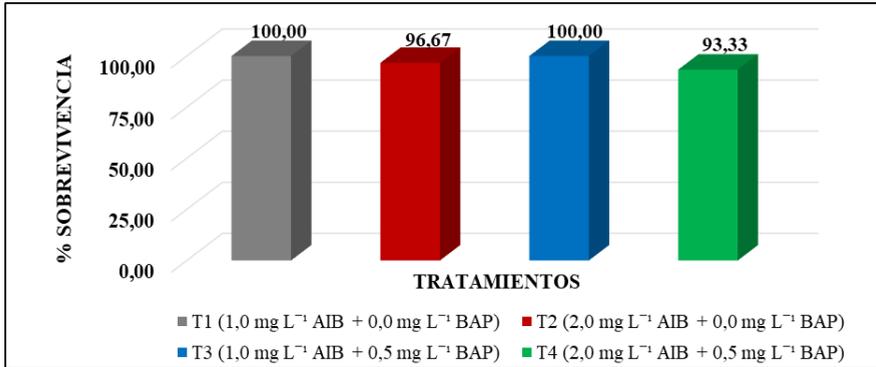


Figura 54. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

c. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre el porcentaje de sobrevivencia registro como valor mínimo 96,67 % en los T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); y 100 % de sobrevivencia en el caso de los T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (Figura 55).

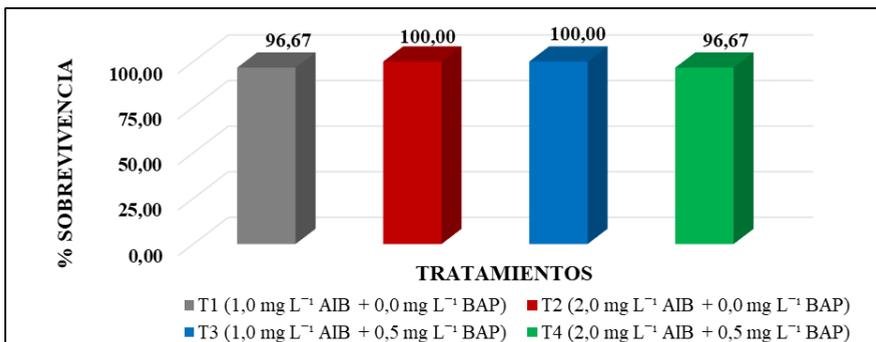


Figura 55. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

6.3.4.7. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sector Zamora Huayco

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Zamora Huayco a los 90 días de evaluación mostró que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo la menor oxidación con 0,56 %; sin embargo, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el valor más alto con 10,57 % (Figura 56).

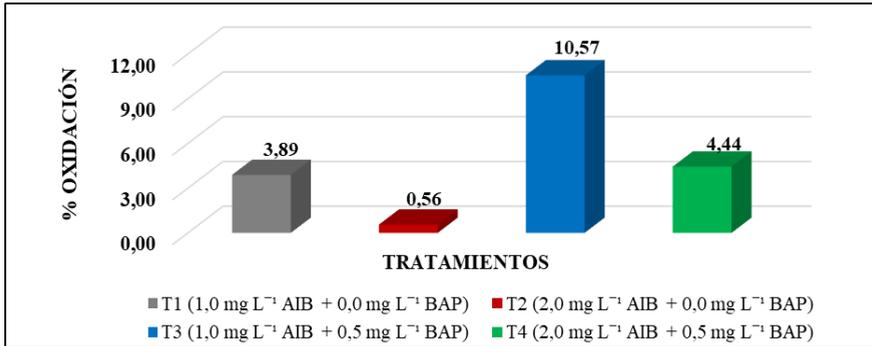


Figura 56. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

b. Sector Uritusinga

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Uritusinga a los 90 días de evaluación reportaron que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor valor con 2,22 %; por otro lado, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el mayor porcentaje de oxidación con 4,44 % (Figura 57).

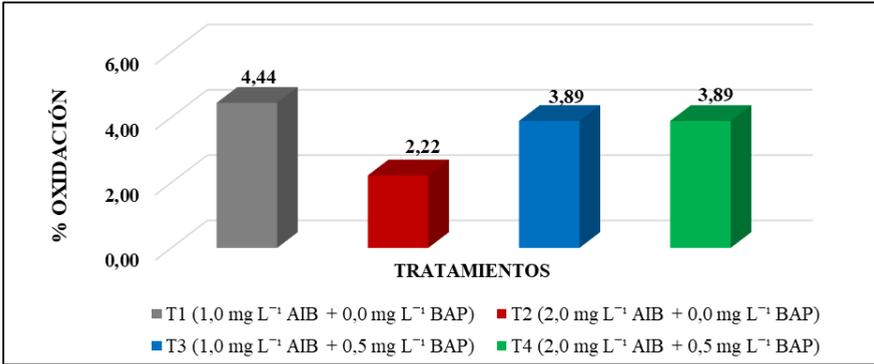


Figura 57. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

c. Sector Selva Alegre

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Selva Alegre a los 90 días de evaluación mostró que el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo una oxidación de 2,78 %; mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el 3,89 % (Figura 58).

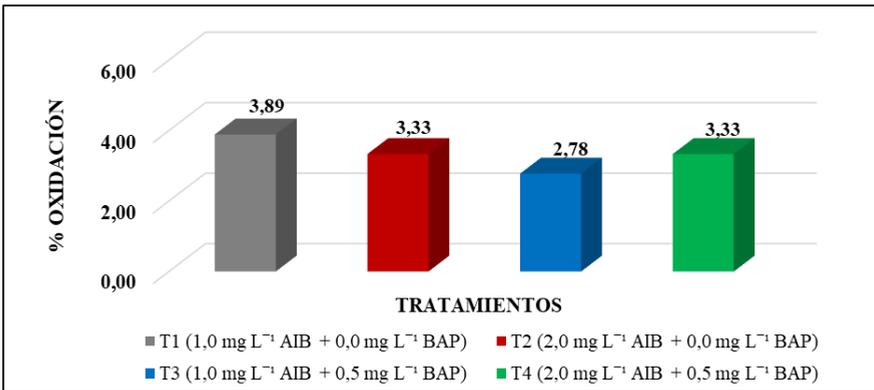


Figura 58. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

6.3.5. Conclusiones

- Para la fase de enraizamiento *in vitro* el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó los porcentajes más elevados en los tres sectores; sin embargo, se obtuvo resultados intermedios en el sector Zamora Huayco con 46,11 %; valores más bajos en Uritusinga con 17,78 % y Selva Alegre con 26,67 % e igual valor con el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,5 mg L⁻¹ BAP).
- En cuanto a la longitud de raíces el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo 2,1 cm en el sector Zamora Huayco, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó 1,2 cm en Selva Alegre, a diferencia de Uritusinga que registró 0,5 cm en el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP).
- El porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos utilizados fue alto: 86,67; 93,33 y 96,67 % en los sectores Zamora Huayco, Selva Alegre y Uritusinga, respectivamente.
- El porcentaje de contaminación fue nulo en los T1, T2 y T4 en los tres sitios evaluados, registrándose 13,33 % en el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP) sector Zamora Huayco y 6,67 % en Uritusinga y Selva Alegre.
- El porcentaje de oxidación fenólica fue bajo, alcanzando el valor máximo de 10,57 %; resultado que es importante, por cuanto se dispone de un mayor número de explantes para las fases sucesivas de los ensayos.

6.4. Bibliografía

- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Brujas, Uruguay. Recuperado de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34431273/Propagacion_de_plantas_por_cultivo_in_vitro.pdf?response-content-
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2004). *Métodos de propagación y conservación de germoplasma*. Recuperado de https://www.ecured.cu/Micropropagaci%C3%B3n_de_plantas?fbclid=IwAR1JBbpIw5__F8MU3g5XI6A7dcTnTa0XCTGH-zNE9lUkQ9GgjhDn0HirB-0#Etapa_3:_Enraizamiento_y_aclimataci.C3.B3n
- Vanzini, M. (2016). *Desarrollo de un sistema de propagación in vitro en Guayabo del país (Acca sellowiana (Berg.) Burret.)*. Recuperado de https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19723/1/TTS_VanziniPinoMar%C3%ADaIn%C3%A9s.pdf

CAPÍTULO 7.

7. FASE DE CALLOGÉNESIS DE EXPLANTES *IN VITRO*

7.1. Antecedentes

Una vez obtenidas las vitroplantas de *C. officinalis* L., antes de pasar a la fase de formación de callos fue necesario trabajar en una fase intermedia denominada fase de brotamiento, la cual permitió obtener suficiente material vegetal para proceder a la fase de formación de callos de *C. officinalis* L., para lo cual, se aplicó el mejor tratamiento para brotamiento (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP), obtenido en la investigación denominada: “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L.” (Chamba, 2017).

7.2. Estudio de caso 1: “Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” Autora: Katherine Méndez Montaña

En este ensayo se evaluó el efecto de una auxina: ácido naftalenacético (ANA), en dos concentraciones de 1,0 mg L⁻¹ y 2,0 mg L⁻¹; así como, bencil amino purina (BAP) en 0,0 mg L⁻¹ y 0,5 mg L⁻¹, con la finalidad de inducir la formación de callo en explantes de *Cinchona officinalis* L. A continuación, se detalla la metodología empleada para la instalación del ensayo.

7.2.1. Medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas: 5,0 mg L⁻¹ de Tiamina y 100 mg L⁻¹ de Mio-inositol; sacarosa 3,0 %, agar 0,6 %; y como reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético) y BAP (Bencil amino purina) en diferentes concentraciones, como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina para la formación de callos de *Cinchona Officinalis* L.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	ANA	BAP
T1	1,0	0,0
T2	2,0	0,0
T3	1,0	0,5
T4	2,0	0,5

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona 2017.

El pH del medio de cultivo se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N, según el requerimiento. Finalmente se distribuyó 30 ml de medio de cultivo en cada frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave (120 °C de temperatura y 1,5 kg cm⁻² de presión), durante 25 minutos (Figura 59).

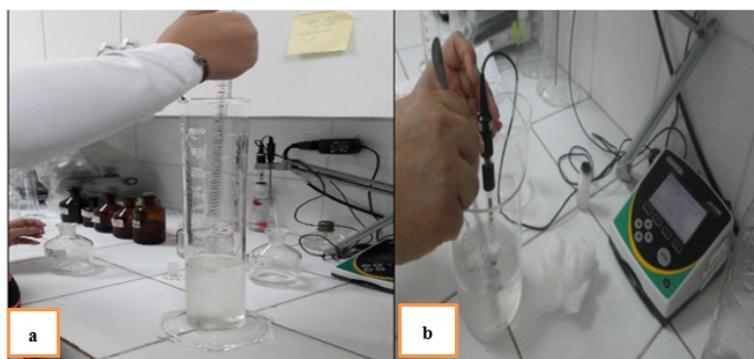


Figura 59. Preparación del medio de cultivo: a) Preparación del medio de cultivo MS sólido/fase callos y b) ajuste de pH.

7.2.2. Obtención de material vegetal e inoculación

La inoculación “*in vitro*” de los explantes de *C. officinalis* L. se realiza en la cámara de flujo laminar, garantizando condiciones de total asepsia; en donde a partir de vitroplantas se obtuvieron ápices caulinares y segmentos nodales; para lo cual, se diseccionaron segmentos de hojas que incluyeron parte del pecíolo segmentado, a razón de 2 explantes/frasco (Figura 60).

Posteriormente se trasladaron los frascos debidamente etiquetados, al cuarto de incubación para desarrollo, a una temperatura constante de $\pm 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 60 días.

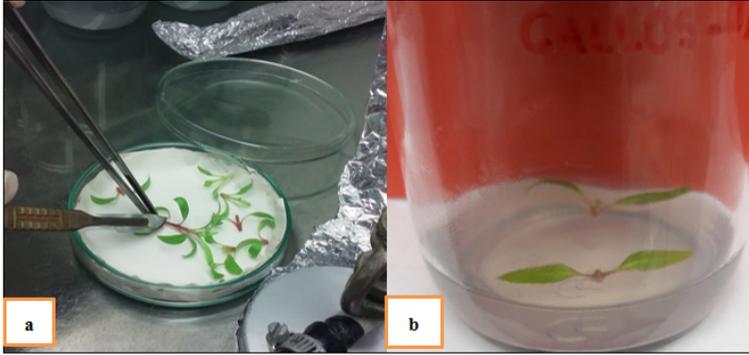


Figura 60. Obtención de explantes de *Cinchona officinalis* L.: a) Aislamiento de ápices caulinares y segmentos nodales y b) Inoculación de explantes en medio de cultivo MS.

7.2.3. Diseño experimental aplicado

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos y tres repeticiones (Cuadro 10).

Cuadro 10. Factores y concentraciones de los reguladores de crecimiento.

FACTORES	CONCENTRACIONES (mg L^{-1})
Nivel de concentración de ANA	1,0 (A1)
	2,0 (A2)
Nivel de concentración de BAP	0,0 (B1)
	0,5 (B2)

7.2.3.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de frascos por tratamiento	15

Número total de unidades experimentales del ensayo	12
Número total de explantes por frasco	2
Numero de explantes por unidad experimental	10
Numero de frascos por tratamiento	60
Número total de explantes por ensayo.	120

7.2.3.2. Unidad experimental y evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de cinco frascos de vidrio, en donde se inocularon un total de 10 explantes (dos por frasco). Las variables evaluadas fueron: número de callos/explante, número de días a la formación de callos, porcentaje de contaminación, porcentaje de mortalidad, color del callo, porcentaje de oxidación y friabilidad del callo.

La evaluación se efectuó 5 días después de realizada la inoculación de los explantes de *C. officinalis* L., a través de observación directa por 60 días, para el sitio de Uritusinga, ya que los explantes utilizados mantenían buenas condiciones fenotípicas y el medio de cultivo se encontraba en condiciones óptimas y adecuadas para el desarrollo del mismo; mientras que, para los explantes del sitio de Zamora Huayco las evaluaciones se realizaron durante 55 días, ya que los explantes utilizados comenzaron a perder su viabilidad, presentando indicios de contaminación y oxidación fenólica, por ende fue necesario el término de su evaluación (Anexo 7).

7.2.3.3. Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2008), en donde se realizó el análisis de varianza, estableciendo diferencias significativas con el test de LSD de Fisher a un nivel de significancia de 5 %.

7.2.4. Resultados

7.2.4.1. Porcentaje de formación de callo por explante, a los 60 y 55 días de evaluación

Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5 % se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos, tanto para

el sitio de Uritusinga, como para el sitio de Zamora Huayco. Para el caso de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Uritusinga, al término de 60 días de evaluación, el tratamiento T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con 50,83 %; mientras que, el tratamiento T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó menor porcentaje de formación de callos con 33,50 % (Figura 61 y 62).

Asi mismo, para los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de Zamora Huayco al término de 55 días de evaluación se logró determinar que el tratamiento T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor porcentaje de formación de callo con 70 %; y, el tratamiento T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó el menor porcentaje de formación de callos con 22,50 (Figura 61).

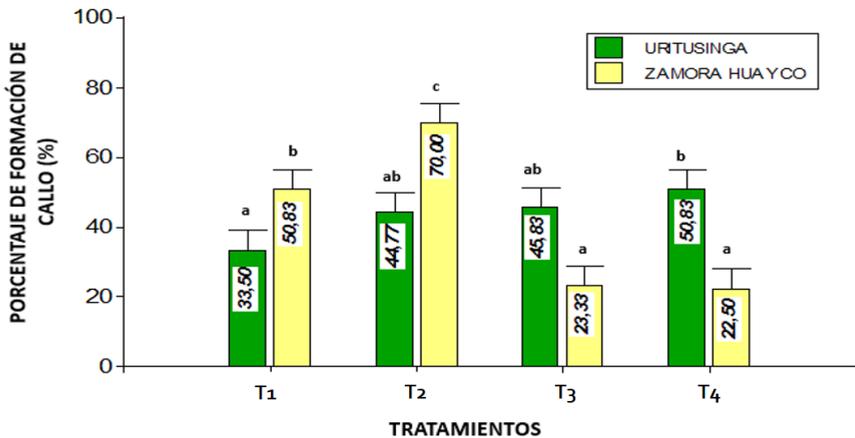


Figura 61. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de dos sitios de estudio.

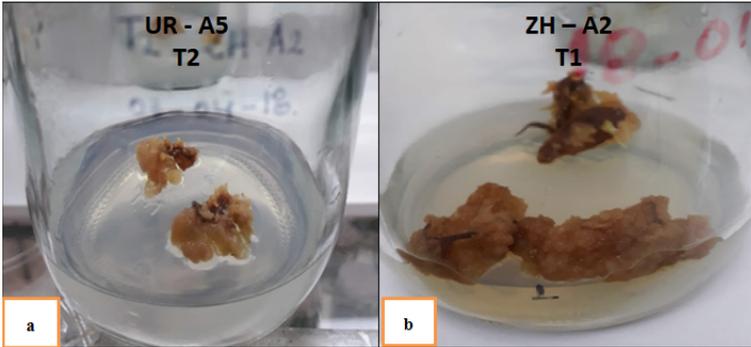


Figura 62. Formación de callos de *Cinchona officinalis* L, de dos sitios de estudio: a) Uritusinga; b) Zamora Huayco.

7.2.4.2. Número de días a la formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

a. Sitio Uritusinga

La formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L, para el sitio de Uritusinga inicio 10 días después del establecimiento del ensayo, en donde los explantes fueron expuestos a diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas; finalmente, se lograron estabilizar a los 60 días de evaluación y diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 63 y 64).

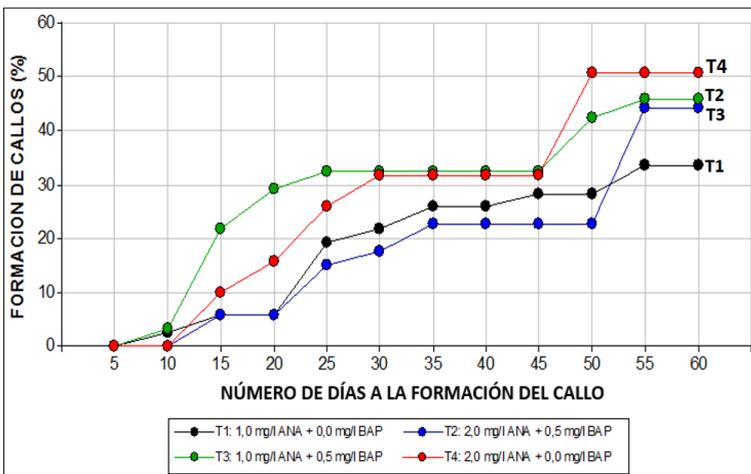


Figura 63. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

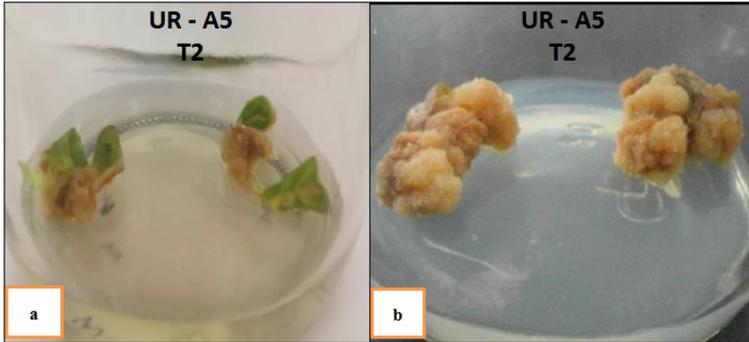


Figura 64. Fase de formación de callos; a) 15 días de evaluación; b) 60 días en la formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

b. Sitio Zamora Huayco

La fase de formación de callos se evidenció a partir de los 10 días de evaluación, los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP). Las evaluaciones mostraron que la formación de callo se estabilizó a los 55 días y diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 65 y 66).

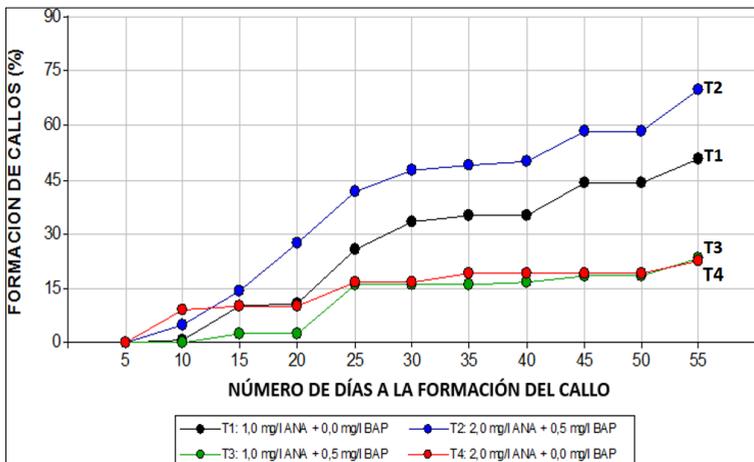


Figura 65. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

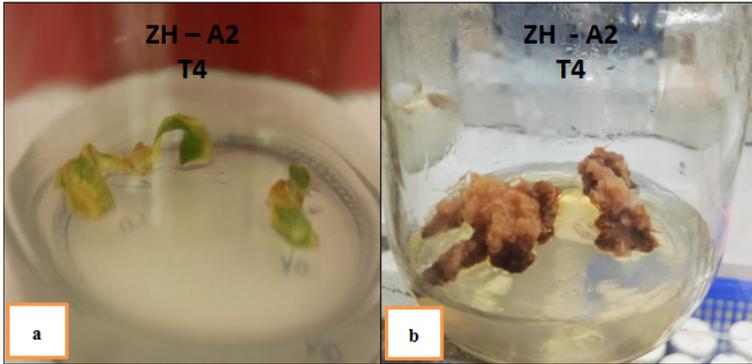


Figura 66. Fase de formación de callos: a) Primeros 10 días de evaluación; b) valoración final (55 días) en *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

7.2.4.3. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L.

a. Sitio Uritusinga

El porcentaje de contaminación que se registró para los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) , y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 3,33% respectivamente; mientras que, el T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) no presentó contaminación durante la evaluación (Figura 67).

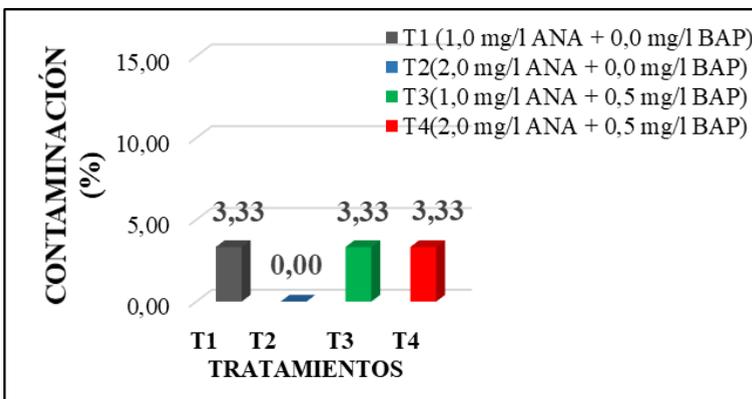


Figura 67. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

b. Sitio Zamora Huayco

Al someter los datos al análisis estadístico, se logró determinar que si existió diferencia estadística significativa entre tratamientos para el caso de Zamora Huayco, el porcentaje de contaminación para los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), y T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 3,33 %; mientras que, el T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) no presentó contaminación alguna durante los días de evaluación (Figura 68).

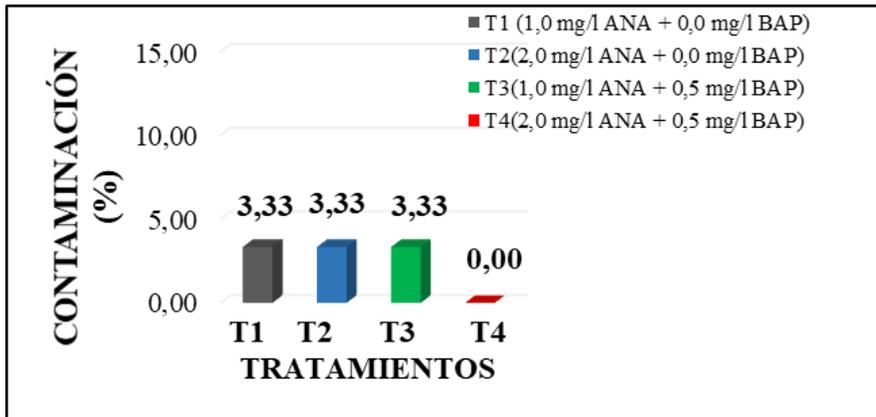


Figura 68. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

7.2.4.4. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L.

a. Sitio Uritusinga

En cuanto a la variable porcentaje de oxidación, al aplicar el análisis estadístico se determinó que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos de los explantes provenientes del sitio Uritusinga, el T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor porcentaje (13,33 %), seguido del T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) con un porcentaje de oxidación equivalente al 10 %; los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fueron los que presentaron los menores porcentajes de oxidación con 6,67 % cada uno (Figura 69).

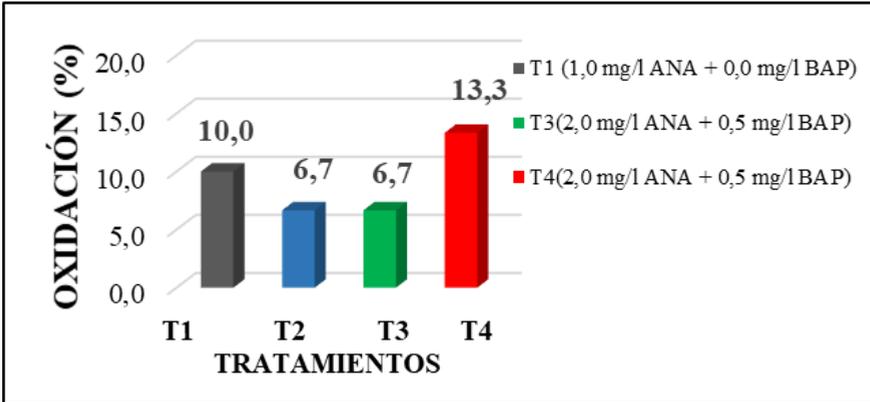


Figura 69. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

b. Sitio Zamora Huayco

Para el sitio de Zamora Huayco, al someter los datos a un análisis estadístico, se logró determinar que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos, para la variable de porcentaje de oxidación, el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) fue 13,33 % el tratamiento con mayor número de explantes con oxidación fenólica; finalmente el T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) (6,67 %), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (3,33 %), y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (3,33 %), fueron los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de oxidación fenólica (Figura 70).

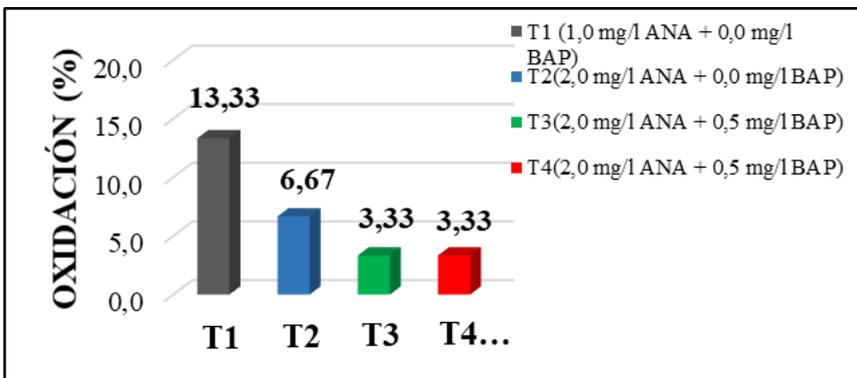


Figura 70. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

7.2.4.5. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L.

a. Sitio Uritusinga

El porcentaje de mortalidad, mostró diferencia estadística significativa entre tratamientos, el T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de explantes con el 10 %; en comparación a los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP), y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) que obtuvieron porcentajes de mortalidad bajos, con 0,00 %; 6,67 %; y 0,00 % respectivamente (Figura 71).

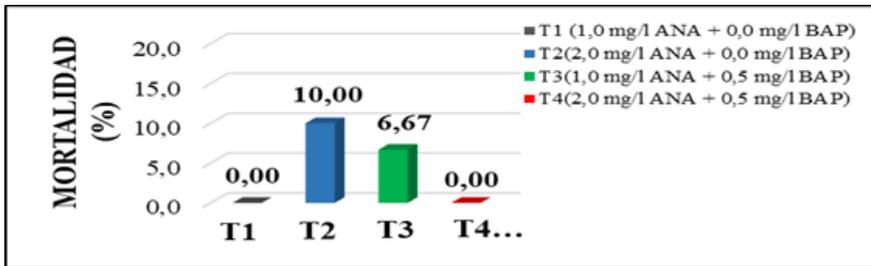


Figura 71. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

b. Sitio Zamora Huayco

Para explantes provenientes del sitio Zamora Huayco, al aplicar el análisis estadístico se determinó que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos, el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentaron el mayor porcentaje de mortalidad de callos (6,67 %); en contraste con los tratamientos T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) que presentaron los menores porcentajes con el 0,00 % y 3,33 % respectivamente (Figura 72).

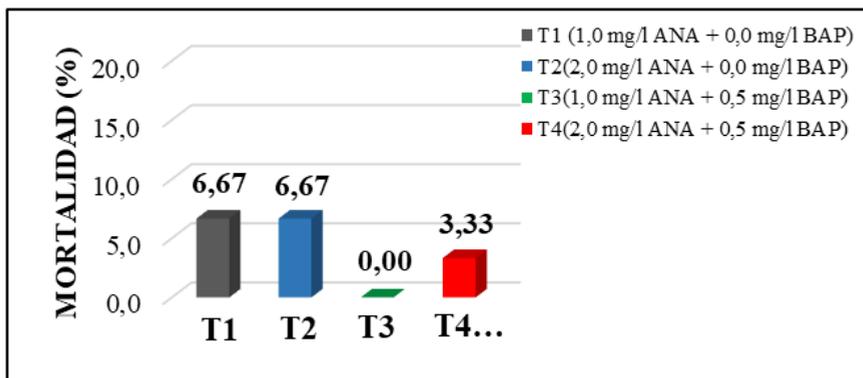


Figura 72. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

7.2.4.6. Color del callo

a. Sitio Uritusinga

En lo que respecta a la variable color del callo se observa que, el T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), fue el tratamiento con mayor porcentaje de callos con una coloración crema durante los 60 días de evaluación, con un porcentaje de 72 %; mientras que, los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP), y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostraron valores de 46, 60 y 52 % respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que existieron callos que a lo largo de la evaluación se tornaron de calor carmelita-marrón, siendo el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) el tratamiento con mayor porcentaje de callos en pigmentación carmelita-marrón; mientras que, los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostraron valores de 28, 40, y 48 % respectivamente, con ésta coloración (Figura 73).

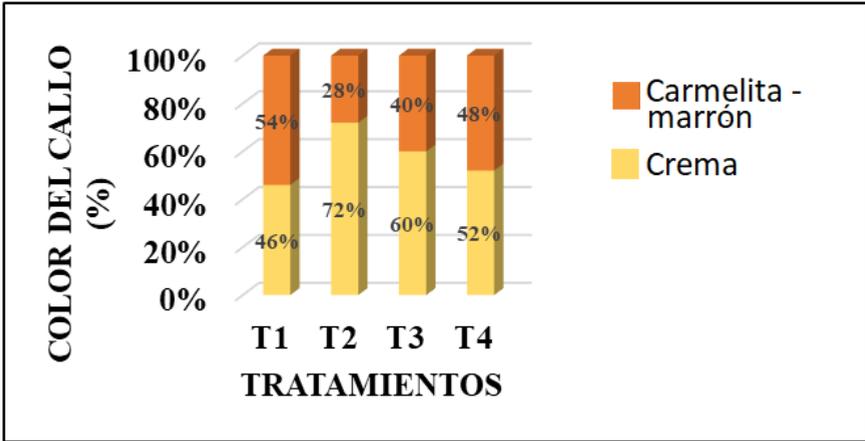


Figura 73. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

b. Sitio Zamora Huayco

Para el sitio de Zamora Huayco el T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) fue el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de callos de color crema con un 78 %; mientras que, los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentaron menor porcentaje de callos con coloración crema con 60, 64 y 71 % respectivamente. Por otro lado, T2 fue el tratamiento que presentó el mayor número de callos en coloración carmelita-marrón con un 40 %, mientras que los tratamientos T1, T3, y T4 lucieron menor porcentaje de callos en coloración carmelita-marrón con 22, 36 y 29 % respectivamente (Figura 74).

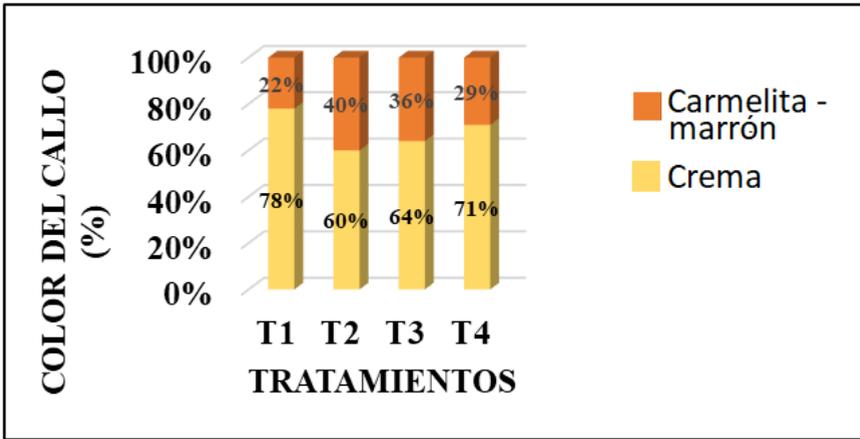


Figura 74. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L., del sitio Zamora Huayco.

7.2.4.7. Porcentaje de friabilidad de callos de *Cinchona officinalis* L., provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco

Para la variable friabilidad de callo de *Cinchona officinalis* L., para ambos sitios tanto Uritusinga y Zamora Huayco se obtuvo una friabilidad del 100 %; es decir, todos los callos formados en cada uno de los tratamientos tuvieron consistencia homogénea y firme, lo cual no permitió, que los callos formados al ser manipulados puedan destruirse con facilidad (Figura 75).

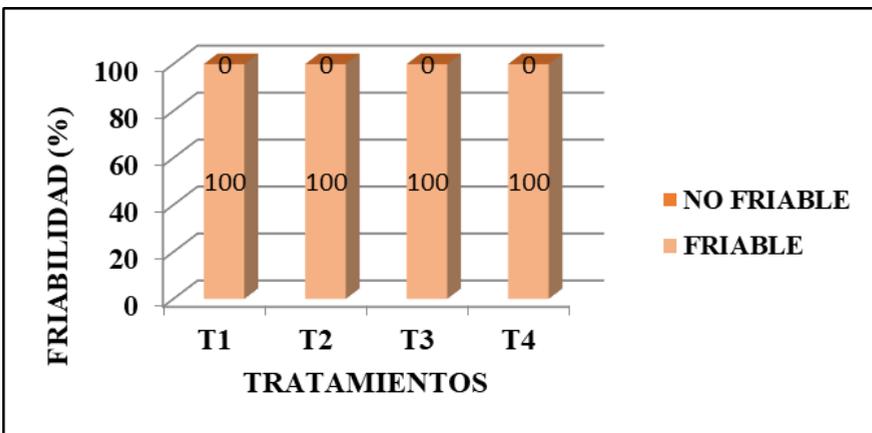


Figura 75. Porcentaje de friabilidad de callos de *Cinchona officinalis* L., de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

7.2.5. Conclusiones

- Para la formación de callos “*in vitro*” a partir de explantes provenientes de vitroplantas de la especie *C. officinalis* L., el T4 constituido por 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP para Uritusinga dio los mejores resultados con 50,8 %; y para el caso de Zamora Huayco el medio óptimo fue T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP), con 70,0 %.
- En cuanto a la variable de oxidación fenólica en la fase de formación de callos el tratamiento T4 (2,0 mg L⁻¹ ANA y 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó el mayor porcentaje de explantes con oxidación fenólica para el sitio de Uritusinga; mientras que para el sitio de Zamora Huayco el tratamiento T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA y 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el mayor porcentaje de explantes con oxidación fenólica.
- En lo que respecta a la mortalidad T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de mortalidad en explantes provenientes del sitio de Uritusinga; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco T1 (1,0 mg L⁻¹ ANA y 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T2 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentaron mayores porcentajes de mortalidad.
- En lo relacionado al porcentaje de contaminación de los callos los valores obtenidos no superaron el 4 %, lo que resulta positivo para contar con el mayor número de estructuras callogénicas, para las etapas sucesivas.

7.3. Estudio de caso 2: Procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos en *Cinchona officinalis* L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja”. Autora: Jessica Guartanza Loja.

En este ensayo se evaluó el efecto de la interacción de una auxina y una citoquinina en diferentes concentraciones: 2-4 D en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹ más kinetina al 0,50 mg L⁻¹ respectivamente, con la finalidad de inducir la formación de callo en explantes provenientes de invernadero de

C. officinalis L. A continuación, se detalla la metodología empleada para la instalación del ensayo.

7.3.1. Selección de material vegetal

Se seleccionó plántulas del invernadero, provenientes de árboles codificados de *Cinchona officinalis* L., del relicto boscoso ubicado en el sitio Uritusinga, cuyas coordenadas geográficas son: 55°33'79" S; 70°24'92" O, los mismos que fueron seleccionados previamente por el Proyecto de Investigación Macro de cinchona, en base a las mejores características fenotípicas y de fisiología reproductiva. Los explantes fueron recolectados de las plántulas codificadas del invernadero, que se encuentra adjunto al laboratorio de Micropropagación Vegetal, de una altura de 5 a 15 cm, las mismas que se obtuvieron de la germinación de semillas y que presentaron características morfológicas adecuadas (Figura 76).

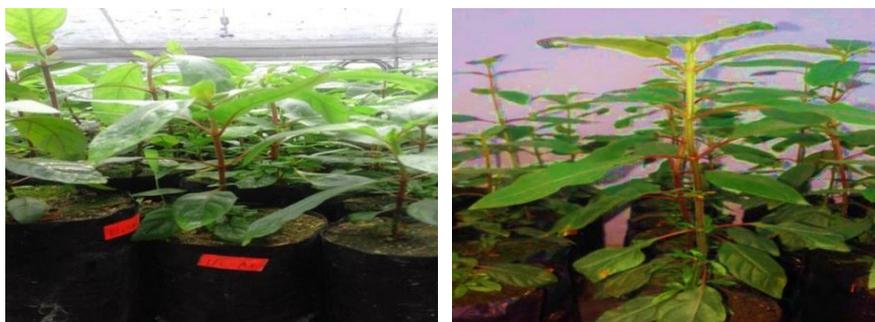


Figura 76. Plántulas codificadas del invernadero de *Cinchona officinalis* L.

7.3.2. Desinfección de material vegetal

La desinfección inició con un enjuague del material vegetal con agua corriente para retirar los residuos de tierra, posteriormente se sumergió en solución fungicida – bactericida (Benomil 2,00 g L⁻¹ – Kasumin 1,00 %) por cinco minutos, se realizó un enjuague con agua destilada; y, finalmente se colocaron los explantes en una solución de polyvinylpyrrolidone (PVP) por 5 minutos más.

Posteriormente en la cámara de flujo laminar se aplicó el protocolo de desinfección de explantes, sumergiendo en alcohol al 70,00 % por un minuto,

luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril, seguidamente se aplicó la solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaClO) al 50,00 % (Figura 77) por 10 minutos, finalmente se realizó 2 enjuagues con agua destilada estéril y un enjuague con PVP, para posteriormente realizar la siembra *in vitro*.

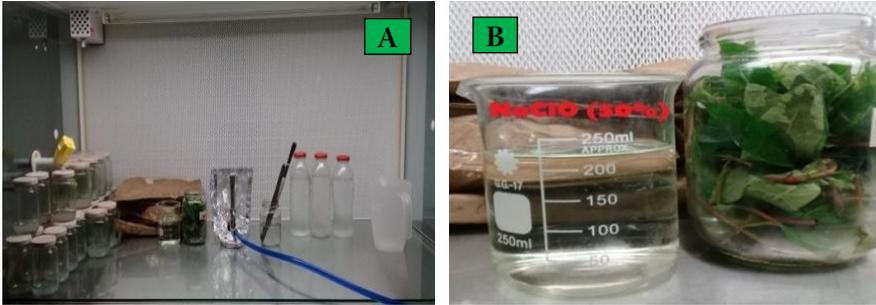


Figura 77. A) Cámara de flujo laminar, B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %.

7.3.3. Inoculación *in vitro* de explantes

La inoculación de los explantes de *C. officinalis* L., se efectuó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar; para ello, con la ayuda de un bisturí se eliminó las partes necrosadas del material vegetal; y luego, sobre una caja Petri con papel absorbente se diseccionó, con el fin de obtener ápices y segmentos nodales de 1 cm con hojas (explantes); inoculándose 2 explantes por frasco (Figura 78).

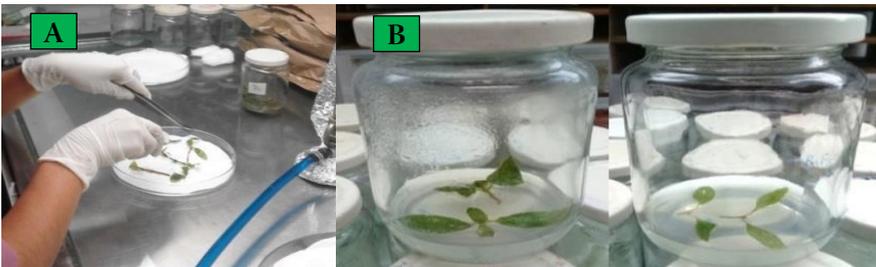


Figura 78. A) Obtención de ápices y segmentos nodales, B) Siembra *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Se identificó los frascos de acuerdo con cada tratamiento y se procedió a ubicar en el cuarto de incubación, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y en condiciones de total oscuridad, para la inducción del callo.

7.3.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 7 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 11 se muestran los tratamientos que se realizó en la interacción hormonal auxina y citoquinina para la inducción de callos, a partir de explantes de plántulas codificadas de *Cinchona officinalis* L., provenientes del invernadero.

Cuadro 11. Tratamientos aplicados para la inducción de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Concentración	Código*
T1	0,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.00 mg L ⁻¹ KINETINA	TT
T2	1,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.00 mg L ⁻¹ KINETINA	A1C1
T3	2,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.00 mg L ⁻¹ KINETINA	A2C1
T4	3,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.00 mg L ⁻¹ KINETINA	A3C1
T5	1,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.50 mg L ⁻¹ KINETINA	A1C2
T6	2,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.50 mg L ⁻¹ KINETINA	A2C2
T7	3,00 mg L ⁻¹ 2. 4-D + 0.50 mg L ⁻¹ KINETINA	A3C2

*T= Testigo; A=Auxina; C=Citoquinina.

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona, 2017.

7.3.4.1. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue un frasco de vidrio con dos explantes, cada tratamiento estuvo formado por 30 explantes, dando un total de 210 explantes del ensayo

Unidad experimental (un frasco de vidrio)	1
Número de tratamientos	7
Número de repeticiones	3
Número de explantes por unidad experimental	2
Número total de explantes /tratamiento	30
Número total de explantes del ensayo	210
Número total de frascos	105

La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 50 días, cada cinco días después de realizada la siembra. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de formación del callo, número de días a la formación de callos, color y friabilidad del callo.

Sin embargo, para la evaluación de la contaminación, oxidación fenólica y sobrevivencia de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se tomó registros durante 30 días, a partir del tercer día de la inoculación. En el Anexo 8 se presenta la hoja de registro de datos que se utilizó en la fase de inducción de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

7.3.4.2. Análisis estadístico de datos

Para la evaluación del efecto hormonal de la auxina y citoquinina: 2,4-D y kinetina en la fase de inducción de callos, se analizaron los datos de las diferentes variables evaluadas en el software SPSS, para probar supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión (Di Rienzo et al., 2016); se realizó el análisis de varianza no paramétrica de Kruskall Wallis; y la prueba estadística con el test de Bonferroni al 5,00 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en las medias y varianzas.

7.3.5. Resultados

7.3.5.1. Porcentaje de formación de callo

Durante la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes de plántulas codificadas del invernadero, al término de 50 días de evaluación en la oscuridad, el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con el 73,30 %; mientras que, el tratamiento T1 (0,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN), no presentó formación de callo (Figura 79). Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskall Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,00 %, se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

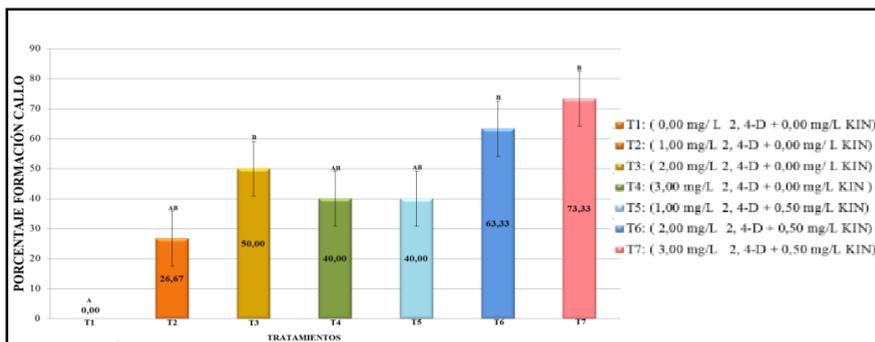


Figura 79. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.

Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

7.3.5.2. Número de días a la formación de callo

La formación de callos se evidenció a los cinco días, para los tratamientos T3, T4, T5 y T6 con porcentajes de 3, 13, 7 y 17 % respectivamente. Para los tratamientos T2 y T7 la formación de callos inició a los 10 días de evaluación, con porcentajes de 3,30 % y 23,30 % respectivamente. Los tratamientos T2 y T3 se estabilizaron a los 30 días de evaluación con porcentajes de 26,70 % y 50,00 % respectivamente; el tratamiento T4 se estabilizó a los 40 días, con el 40,00 %; el tratamiento T5 se estabilizó a los 15 días de evaluación, con un porcentaje de 40,00 %; los tratamientos T6 y T7 se estabilizaron a los 20 días de instalado el ensayo, con un porcentaje de 60,00 % y 73,30 %, respectivamente. Finalmente, el tratamiento T1 se mantuvo estable, durante todo el periodo de evaluación con el 0,00 % (Figura 80), es decir no hubo la formación de callo.

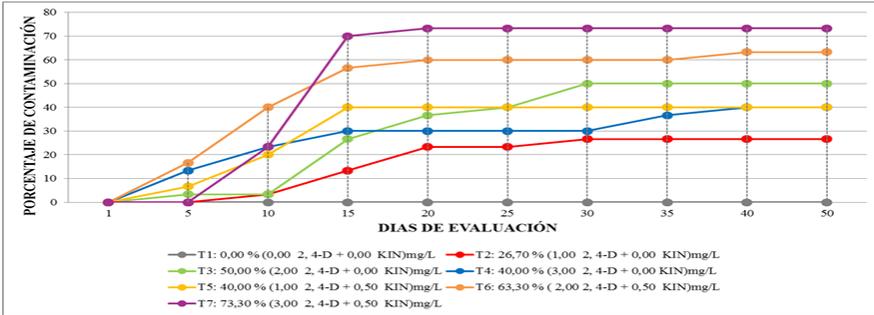


Figura 80. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.

7.3.5.3. Color de callo a los 50 días de evaluación

En la Figura 81, se observa que el tratamiento T3 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) al término de los 50 días de evaluación, obtuvo el más alto porcentaje de callos de color Crema con el 73,0%; así mismo, el tratamiento T7 (3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de callos de color carmelita, con el 73,0%. Finalmente, el tratamiento T5 (1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) presenta callos de color crema y carmelita, además presentó callos de color amarillo, con el 16,70%.

Sin embargo, es importante mencionar que todos los callos adquirieron una coloración crema en los primeros días de evaluación.

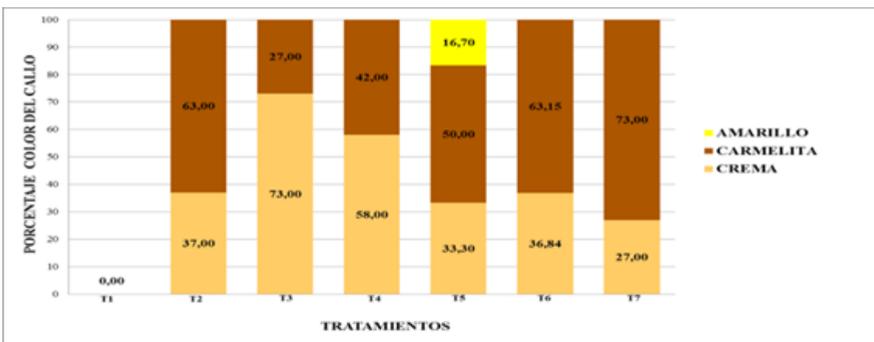


Figura 81. Porcentaje de color de callo de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.

7.3.5.4. Friabilidad del callo a los 50 días de evaluación

Para concluir la fase de inducción de callos de *C. officinalis* L., dentro de las variables se evaluó también la friabilidad del callo, que se define como la capacidad para disgregarse, en donde, en casi todos los tratamientos, a excepción del tratamiento T1 (0,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN), se obtuvo una friabilidad de callo del 100 % (Figura 82); es decir, todos los callos formados en cada uno de los tratamientos tuvieron consistencia homogénea y firme (Figura 83).

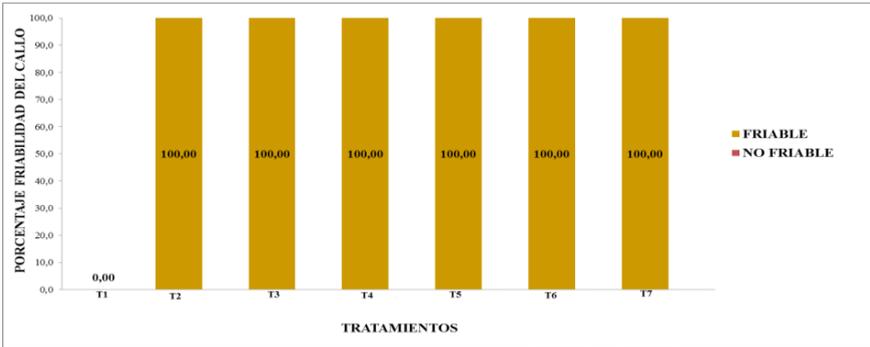


Figura 82. Porcentaje de friabilidad de los callos de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, hasta los 50 días de evaluación.

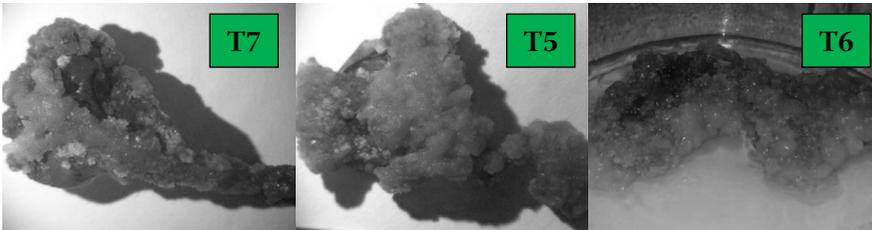


Figura 83. Friabilidad de los callos de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, hasta los 50 días de evaluación. T7 (3 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN), T5 (1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN), T6 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN).

7.3.6. Conclusiones

- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, el uso de la combinación hormonal auxina-citoquinina resultó adecuada, siendo el tratamiento T7 conformado por $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ KIN, el que obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos, con el 73,30 %.
- La utilización de la auxina 2,4-D, en concentraciones de 1,00; 2,00 y $3,00 \text{ mg L}^{-1}$, fue la que mejor resultados presentó en la inducción de callos friables.
- La inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero es factible realizarla, utilizando la concentración adecuada de auxinas; seleccionando y aplicando un tratamiento adecuado a los explantes *ex vitro* durante la permanencia en el invernadero, para evitar en la inoculación *in vitro* posibles focos de contaminación y oxidación fenólica de explantes.

7.3.7. Bibliografía

- Chamba, L. (2017). Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., partir de *in vitro* plantas, en la Argelia – Loja (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador. Recuperado de: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/18546/1/LORENA%20MELANIA%20CHAMBA%20GRANDA.pdf>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, E., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2008). InfoStat versión. Argentina: Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba.

CAPÍTULO 8.

8. Lecciones aprendidas

- Para lograr el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., es fundamental realizar la identificación y selección de árboles parentales en el campo, que permitan conocer la procedencia de la descendencia.
- Para obtener mayor porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., se debe realizar la siembra inmediatamente luego de realizada la colecta de los frutos fisiológicamente maduros.
- En la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., se recomienda usar el medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido giberélico (AG_3) para inducir un mayor número de semillas germinadas.
- En la fase de brotamiento de *Cinchona officinalis* L., se recomienda emplear el medio de cultivo de Murashige y Skoog suplementado con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.
- En la fase de enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., probar nuevas concentraciones hormonales de la interacción auxinas-citoquininas.
- En la fase de formación de callos "*in vitro*" de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas la combinación hormonal constituida por $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP y $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP presentaron los mejores resultados con valores de 50,8 % y 70,0 %.
- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, el uso de la combinación hormonal auxina-citoquinina $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ KIN resultó adecuada con el 73.30 % de formación de callo.
- En la fase de formación de callo una de las limitantes que se presentaron fue el elevado porcentaje de oxidación fenólica de los mismos, lo que dificulta continuar con las fases subsiguientes de la micropropagación.

Anexos

Anexo 1. Hoja de Registro de Laboratorio, Ensayo Desinfección *in vitro* de Semillas de *Cinchona officinalis* L.

CONTAMINACIÓN DE SEMILLAS														
No. Tratamientos:						No. de semillas /tubo de ensayo.....								
Fecha de siembra:						Evaluador:								
Tratamientos: T1=														
Tratamiento	Repetición	Tubo	Días									Total	Observaciones	
			No	%	H/B	1	2	3	4	5	6	7		8
T1	R1	1												
		2												
		3												
		4												
		5												
T1	R2	1												
		2												
		3												
		4												
		5												
T1	R3	1												
		2												
		3												
		4												
		5												

Anexo 2. Hoja de Registro de Laboratorio, Ensayo de Germinación *in vitro* de Semillas de *Cinchona officinalis* L.

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

No. Tratamientos:

No. de semillas /tubo de ensayo:

Fecha de siembra:

Evaluador:

Tratamientos: T1:

Tratamiento	Repetición	Tubo	Días								Total		Observaciones
			1	2	3	4	5	6	No	%	
T1	R1	1											
		2											
		3											
		4											
		5											
T1	R2	1											
		2											
		3											
		4											
		5											
T1	R3	1											
		2											
		3											
		4											
		5											

Anexo 3. Hoja de Registro de Laboratorio, ensayo de multiplicación o
Brotación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

BROTACIÓN DE SEMILLAS									
No. Tratamientos:					No. de explantes /frasco:				
Fecha de siembra:					Evaluador:				
Tratamientos: T1:									
Explante		No.			Longitud (cm)				
No.	Longitud	Brotes	Nudos	Hojas	Raíces	Brotes	Raíces	Observaciones	
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									
9.									
10.									
11.									
12.									
13.									
14.									
15.									
16.									

Anexo 4. Hoja de registro de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L.

CONTAMINACIÓN EXPLANTES

No. Tratamientos: No. de explantes/frasco:

Fecha de siembra: Evaluador:

Tratamientos: T1:

Tratamiento	Repetición	Frasco	Días							Total			Observaciones	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	No		%
T1	R1	F1												
		F2												
		F3												
		F4												
		F5												
		F6												
		F7												
		F8												
	R2	F1												
		F2												
		F3												
		F4												
		...												
R3	F1													
	F2													
	F3													
	F4													
		...												

Anexo 5. Hoja de registro de mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Tratamiento	Repetición	Frasco	Días									Total			Observaciones		
												No	%	H/B			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	...					
T1	R1	F1															
		F2															
		F3															
		F4															
		F5															
		F6															
		F7															
		F8															
	R2	F1															
		F2															
		F3															
		F4															
			...														
	R3	F1															
		F2															
		F3															
F4																	
		...															

Anexo 6. Hoja de registro para las variables: porcentaje de contaminación y mortalidad en fase de enraizamiento de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Especie:		Fecha de siembra:				
Fecha de evaluación:			Tratamiento Nro :			
Frasco	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Explante muerto	Explante contaminado	Explante muerto	Explante contaminado	Explante muerto	Explante contaminado

Anexo 7. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

INDUCCION DE CALLOS																														
FECHA DE SIEMBRA																														
SITIO DE EXPLANTES:																								# EXPLANTES						
TRATAMIENTO	REPETICION	N° FRASCO	N° EXPLANTE	% FORMACION DEL CALLO								COLOR DEL CALLO								APARIENCIA DEL CALLO										
				5	10	15	20	25	30	35	40	50	5	10	15	20	25	30	35	40	50	5	10	15	20	25	30	35	40	50
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T R I	F1		E.1																											
			E.2																											
	F2		E.1																											
			E.2																											
	F3		E.1																											
			E.2																											
	F4		E.1																											
			E.2																											
	F5		E.1																											
			E.2																											

FORMACION DE CALLO: 0= 0,00 % Sin formación 1= 50,00 %: regular (formado callo 1 explante) 2 = 100,00 %: muy bueno (formado callo 2 explantes).	COLOR:  CR= Crema C= Carmelita AMA=Amarillo	APARIENCIA: F= Friable NF= No Friable
---	---	--

Anexo 8. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

Sitio de colecta:														
Fecha de siembra:														
# de explantes:														
Sitio	N° de árbol	Tratamientos	Repetición	N° Frasco	N° Explante	N° días a la formación de callos (%)							Color	Friabilidad
						5	10	15	20	25	...	n		
				1	E.1									
					E.2									
			Tn	R1	2	E.1								
					E.2									
				3	E.1									
					E.2									
FORMACIÓN DE CALLO					COLOR			FRIABILIDAD						
0%: Sin formación					Crema			F: Friable						
25%: Pobre (callo en ¼ del explante)								NF: No friable						
50%: Regular (callo en ½ explante)					Carmelita - Marrón									
75%: Bueno (callos en ¾ del explante)														
100%: Muy bueno (callo formado en todo el explante)														



Universidad
Nacional
de Loja

Micropropagación de Cinchona, el árbol de la vida

La Cinchona o cascarilla, es una especie vegetal, que se caracteriza principalmente por el contenido de quinina; sustancia que se utilizó durante siglos para curar la malaria o paludismo; además, de múltiples beneficios como: estimular el apetito, tonificar el organismo, arritmias cardiacas, crecimiento del cabello y evitar la caída; se utiliza también, para combatir el estrés psíquico y físico; por lo tanto, es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica (Garmendia, 2005). En la provincia de Loja, el género *Cinchona* es considerado como uno de los géneros de mayor importancia, por el valor medicinal y cultural (Santos, 2010). Según Garmendia (2005), Anderson y Taylor (1994) *C. officinalis* L., es endémica del valle de Loja. En este contexto, el libro tiene por título: “MICROPROPAGACIÓN DE CINCHONA, EL ÁRBOL DE LA VIDA”, el mismo que fue elaborado por el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona*, que se ejecutó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja, en el que se incluyen ocho capítulos, en los que se describen los fundamentos básicos, descripción del género *Cinchona*, metodologías para la desinfección y germinación de semillas *in vitro*; multiplicación de explantes; enraizamiento de explantes; formación de estructuras callogénicas de *C. officinalis* L. Además, se incluyen algunas conclusiones y lecciones aprendidas, en el marco de los resultados obtenidos en el Proyecto de Investigación Cinchona, con la propósito de generar información científica, sobre las técnicas alternativas de propagación de la especie, por cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y difundir los mismos a los actores interesados

ISBN-13: 978-9978-355-90-9



9 789978 355909