



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA



**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA
INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE
VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL
DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”**

*Tesis de grado previo a la
obtención del Título de
Ingeniera Forestal*

Autora:

Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo

Director:

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc

Co-directora:

Ing. Julia Esther Minchala Patiño

**Loja – Ecuador
2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

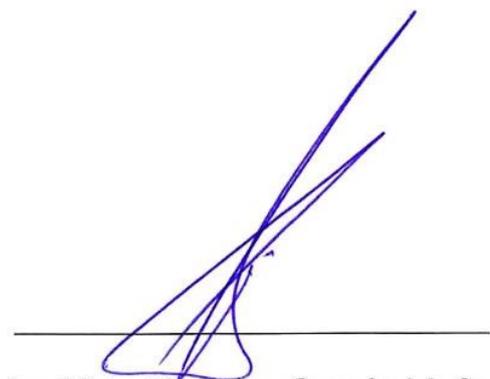
Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

En calidad de director de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA**”, de autoría de la señorita Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal, ha sido dirigida, revisada y desarrollada dentro del cronograma aprobado; por tal razón autorizó su presentación y publicación.

Loja, 20 de noviembre del 2017

Atentamente,



Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

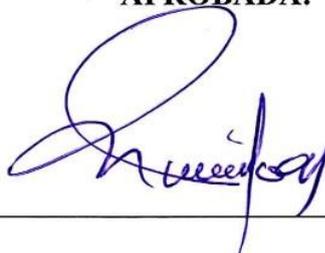
“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”.

TESIS DE GRADO

Presentada al tribunal Calificador como requisito parcial para la obtención de título de:

INGENIERA FORESTAL

APROBADA:



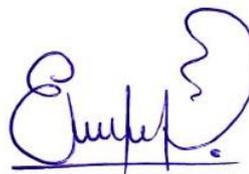
Ing. Nikolay Aguirre Mendoza, Ph. D.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL CALIFICADOR



Ing. Johana Muñoz Chamba, Mg. Sc.

VOCAL



Ing. Edwin Pacheco Pineda, Mg. Sc.

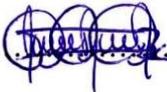
VOCAL

AUTORÍA

Yo, **Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizó a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

Autora: Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo

Firma: ... 

Cédula: 1104776164

Fecha: Loja, 12 de diciembre de 2017

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo, declaro ser la autora, de la tesis titulada **“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”**, como requisito para optar el grado de: Ingeniera Forestal, autorizó al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 12 días del mes de diciembre del dos mil diecisiete, firma el autor.

Firma: 

Autora: Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo

Número Cédula: 1104776164

Dirección: Loja; Cantón Catamayo; Parroquia El Tambo, Barrio San Francisco

Correo electrónico: karogonzalezvaldiviezo@gmail.com

Celular: 0979632831

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Codirectora de tesis: Ing. Julia Esther Minchala Patiño

Tribunal de Grado: Ing. Nikolay Aguirre Mendoza, Ph. D. Presidente

Ing. Johana Muñoz Chamba, Mg. Sc. Vocal

Ing. Edwin Pacheco Pineda, Mg. Sc. Vocal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por haberme guiado por el camino de la felicidad hasta ahora y haberme permitido culminar una de mis metas. Además, deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todos quienes participaron directa o indirectamente he hicieron posible la culminación de la presente investigación:

A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería Forestal y a todos los docentes por haber compartido sus conocimientos, su confianza, apoyo y sobre todo su amistad.

Al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, director de mi tesis, y a la Ing. Julia Minchala Patiño, co-directora, por haberme confiado este trabajo, por la paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo. Cuya sabiduría, experiencia y consejos han sido mi fuente de motivación durante estos años.

De igual forma a la Ing. Magaly Yaguana, Ing. José Moreno, y a todo el Equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal por su apoyo desinteresado, por la dedicación de su tiempo y haber compartido conmigo sus conocimientos, pues les estaré eternamente agradecido.

Así mismo, a los miembros del Tribunal Calificador por las valiosas sugerencias realizadas en la presente investigación.

Finalmente, a mis Padres, hermanas(os), por brindarme su apoyo incondicional y ser el motivo de mi superación, y a mis amigos/as quienes me apoyaron en el desarrollo de la presente investigación.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.....

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida, fortaleza, sabiduría y ser el forjador de mi camino, además de su infinita bondad y amor.

A mis Queridos padres *María D. Valdiviezo Chaunay y Luis A. Gonzalez Banda* por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, además por su esfuerzo, sacrificio y apoyo me motivaron constantemente para alcanzar esta meta dentro de mi formación profesional.

A mis hermanas *Bertha, Vicenta, Esperanza, Rosa, Ligia, Rosario, Isabel*, quienes me apoyaron directa o indirectamente; y mi hermano **Marco**, quien compartió estos duros años de esfuerzo, permitiéndome lograr esta importante meta.

A mis sobrinos y demás familiares, por apoyarme en la cristalización de mi formación profesional.

Y a dos compañeros y amigos: **Marco y Vladimir** que, gracias a su apoyo, y conocimiento hicieron de esta experiencia una de las más especiales.

¡Con Cariño!

Karina Gonzalez V.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pág.
CERTIFICACIÓN	ii
APROBACIÓN	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Descripción de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L.	3
2.1.1. Generalidades de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	3
2.1.2. Clasificación Botánica.....	3
2.1.3. Descripción Taxonómica.....	4
2.1.4. Reproducción de la especie	4
2.1.5. Usos de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L.....	5
2.2. Biotecnología vegetal	5
2.3. Micropropagación <i>in vitro</i>	6
2.4. Generalidades del cultivo <i>in vitro</i>	6
2.5. Morfogénesis Vegetal.....	7
2.6. Métodos de regeneración de plantas <i>in vitro</i>	7
2.6.1. Organogénesis	7
2.6.1.1. Formación de yemas axilares	8
2.6.1.2. Formación de yemas adventicias.....	8
2.6.2. Cultivo de callos	9
2.6.3. Embriogénesis somática	11
2.6.3.1. Características de la embriogénesis somática.....	12
2.6.3.2. Origen de la embriogénesis somática	13
2.6.3.3. Inducción de la embriogénesis somática	13
2.6.3.4. Embriogénesis somática indirecta	15
2.6.3.5. Embriogénesis somática directa	17

2.6.3.6.	Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática	18
2.7.	Medio de cultivo.....	22
2.7.1.	Compuestos inorgánicos.....	22
2.7.2.	Compuestos orgánicos.....	23
2.7.2.1.	Carbohidratos	23
2.7.2.2.	Vitaminas.....	24
2.7.2.3.	Reguladores de crecimiento	24
2.7.2.4.	Giberelinas.....	24
2.7.3.	Preparaciones naturales complejas	25
2.7.4.	Materiales inertes.....	25
2.8.	Explante.....	25
2.9.	Uso de soluciones desinfectantes para el establecimiento <i>in vitro</i>	26
2.9.1.	Hipoclorito de sodio	27
2.9.2.	Peróxido de hidrogeno.....	28
2.10.	Factores ambientales de incubación	29
2.10.1.	Luz.....	29
2.10.2.	Temperatura.....	29
2.10.3.	Humedad.....	29
2.10.4.	Oxigeno	29
3.	METODOLOGÍA.....	30
3.1.	Ubicación del área de estudio.....	30
3.2.	Metodología para probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.	30
3.2.1.	Selección de las semillas	31
3.2.2.	Preparación del medio de cultivo	31
3.2.3.	Desinfección de las semillas.....	32
3.2.4.	Inoculación <i>in vitro</i> de las semillas y condiciones ambientales de incubación.....	34
3.2.5.	Diseño experimental.....	34
3.2.5.1.	Especificaciones del Diseño experimental	35
3.2.6.	Unidad experimental y variables evaluados	35

3.2.7.	Hipótesis del modelo	36
3.2.8.	Análisis estadístico de datos de desinfección y germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	36
3.3.	Metodología para determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio.	37
3.3.1.	Fase de inducción de callos	38
3.3.1.1.	Obtención y selección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	38
3.3.1.2.	Preparación del medio de cultivo	38
3.3.1.3.	Desinfección de explantes	38
3.3.1.4.	Siembra <i>in vitro</i> y condiciones ambientales de incubación.....	38
3.3.1.5.	Diseño experimental para la fase de inducción de callos	39
3.3.1.6.	Unidad experimental y variables a evaluar.....	40
3.3.1.7.	Hipótesis del modelo	41
3.3.1.8.	Análisis estadístico de datos de inducción de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L.	41
3.3.2.	Fase de inducción de embriones somáticos.....	42
3.3.2.1.	Obtención y selección de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	42
3.3.2.2.	Preparación del medio de cultivo sólido.....	42
3.3.2.3.	Inoculación y condiciones ambientales de incubación.....	43
3.3.2.4.	Diseño experimental para la fase de inducción de embriones.....	43
3.3.2.5.	Unidad experimental y variables evaluadas	44
3.4.	Metodología para difundir los resultados de la investigación.	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja. ..	
4.1.1.	Porcentaje de contaminación de las semillas a los 30 días.....	46
4.1.2.	Porcentaje de germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	46
4.1.3.	Número de días a la germinación	47
4.2.	Determinación del balance hormonal adecuado en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio.....	48

4.2.1.	Fase de inducción de callos	48
4.2.1.1.	Porcentaje de contaminación de explantes	48
4.2.1.2.	Porcentaje de mortalidad de explantes	49
4.2.1.3.	Número de días a la mortalidad de explantes	50
4.2.1.4.	Porcentaje de formación de callos	51
4.2.1.5.	Número de días a la formación del callo	52
4.2.1.6.	Color del callo a los 80 días.....	53
4.2.1.7.	Apariencia del callo a los 80 días	54
4.2.2.	Fase de inducción de embriones.....	56
4.2.2.1.	Porcentaje de contaminación.....	56
4.2.2.2.	Porcentaje de formación de embriones somáticos.....	56
4.2.2.3.	Número de días a la formación de embriones somáticos	58
4.3.	Difusión de la información generada.....	58
5.	DISCUSIÓN	60
5.1.	Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja. ..	60
5.2.	Determinación del balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio.....	62
5.2.1.	Fase de inducción de callos	62
5.2.2.	Fase de inducción de embriones.....	65
6.	CONCLUSIONES	66
7.	RECOMENDACIONES	67
8.	BIBLIOGRAFÍA	68
9.	ANEXOS	84

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Pág.
Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog-MS (1962).....	23
Cuadro 2. Desinfección de semilla de <i>Cinchona officinalis</i> L., por tratamiento, en diferentes tiempos de inmersión.	33
Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la desinfección de semillas de <i>C. officinalis</i> L.....	35
Cuadro 4. Hoja de registro para la toma de datos de las variables porcentaje de contaminación y germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	36
Cuadro 5. Diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callos de la especie de <i>Cinchona officinalis</i> L.	37
Cuadro 6. Distintas concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de embriones somáticos de la especie de <i>C. officinalis</i> L.	37
Cuadro 7. Tratamientos que se evaluó la interacción auxinas – citoquininas en la inducción de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. ...	40
Cuadro 8. Hoja de registro para la toma de datos, en la fase de inducción de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	41
Cuadro 9. Descripción de los tres tratamientos para la inducción de embriones somáticos a partir de callos de <i>C. officinalis</i> L.....	44
Cuadro 10. Hoja de registro para la toma de datos de las variables contaminación y formación de embriones a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	45
Cuadro 11. Registro del porcentaje de contaminación de semillas de <i>C. officinalis</i> L.....	46
Cuadro 12. Resumen del porcentaje de germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	46
Cuadro 13. Registro del porcentaje de contaminación de explantes de <i>C. officinalis</i> L.....	48
Cuadro 14. Porcentaje de mortalidad de segmentos nodales de <i>C. officinalis</i> L. ...	49
Cuadro 15. Registro del porcentaje de formación de callos, a partir de segmentos nodales de <i>C. officinalis</i> L.	51

Cuadro 16. Registro de la variable color en la inducción de callos de <i>C. officinalis</i> L.....	53
Cuadro 17. Registro de la variable apariencia en la fase de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	55
Cuadro 18. Registro del porcentaje de formación de embriones somáticos a partir de callos de <i>C. officinalis</i> L.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Plántula de <i>C. officinalis</i> L. Proyecto <i>Cinchona</i>	3
Figura 2. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.	30
Figura 3. Selección de semillas de <i>C. officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	31
Figura 4. Selección de semillas de <i>C. officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	31
Figura 5. Visualización en el estereomicroscopio. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	31
Figura 6. Preparación del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	32
Figura 7. Ajuste del pH óptimo del medio del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	32
Figura 8. Distribución del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	32
Figura 9. Semillas colocadas en tules. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	33
Figura 10. Semillas agrupadas en tul y colocadas en solución jabonosa. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	33
Figura 11. Proceso de desinfección de la semilla de <i>Cinchona officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	33
Figura 12. Semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	34
Figura 13. Siembra de las semillas de <i>C. officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	34
Figura 14. Identificación de los tubos de ensayo y colocados en el cuarto de luces para su incubación. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.	34
Figura 15. Explantes diseccionados de <i>Cinchona officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	39
Figura 16. Siembra <i>in vitro</i> de los segmentos nodales de <i>C. officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	39
Figura 17. Identificación de los frascos y colocados en el cuarto de luces para su incubación. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	39
Figura 18. Elaboración del medio de cultivo sólido. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	42

Figura 19. Ajuste del pH óptimo del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	42
Figura 20. Formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	43
Figura 21. Siembra <i>in vitro</i> de callos, según tratamientos. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	43
Figura 22. Porcentaje promedio de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. officinalis</i> L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	47
Figura 23. Curva de germinación acumulativa de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	48
Figura 24. Contaminación de explantes (segmentos nodales) de <i>Cinchona officinalis</i> L. Gonzalez y Minchala. Loja-2017.	49
Figura 25. Porcentaje promedio de mortalidad de explantes de <i>C. officinalis</i> L., en la fase de inducción de callos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	50
Figura 26. Días a la mortalidad de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la fase de inducción de callo.	50
Figura 27. Porcentaje promedio de formación de callo a partir de explantes de <i>C. officinalis</i> L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	51
Figura 28. Formación de callos a partir de segmentos nodales de <i>C. officinalis</i> L. A. Callos obtenidos del T1 (1,0 mg/l 2, 4-D). B. Callos obtenidos del T2 (2,0 mg/l 2, 4-D). Callos obtenidos del T3 (3,0 mg/l 2, 4-D). Callos obtenidos del T4 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP). Callos obtenidos del T5 (2,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP) a los 80 días de evaluación. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	52
Figura 29. Días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L.	53
Figura 30. Color del callo a los 80 días de evaluación.	54
Figura 31. Formación de callos. A, B. Callos de color crema, apariencia homogénea- traslucido, (en los primeros días de evaluación); C, D. Callos de color carmelita, apariencia no homogénea- no traslucido, que	

no deja pasar la luz (a los 80 días de evaluación); E. Callos de color crema, apariencia homogénea- traslucido (a los 80 días de evaluación). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	54
Figura 32. Apariencia de los callos a los 80 días de evaluación.	55
Figura 33. Porcentaje promedio de formación de embriones, a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	57
Figura 34. Formación de embriones a partir de callos de <i>C. officinalis</i> L. A1, A2. Embriones obtenidos del T1 (Sin hormonas). B1, B2. Embriones obtenidos del T2 (,1 mg/l 2, 4-D). C1, C2. Embriones obtenidos del T3 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.	57
Figura 35. Días a la formación de embriones, a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	58
Figura 36. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico y docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido	Pág.
Anexo 1. Resultados obtenidos del ensayo germinación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	84
Anexo 2. Resultados obtenidos de la variable porcentaje de mortalidad de explantes en la fase de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L....	84
Anexo 3. Resultados obtenidos de la variable porcentaje de formación de callo de <i>Cinchona officinalis</i> L.	85
Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo de formación de embriones de <i>Cinchona officinalis</i> L.	85
Anexo 5. Imágenes de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	86
Anexo 6. Imágenes del ensayo inducción de callos, a partir de segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L.	86
Anexo 7. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis.	87

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE
CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis*
L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”.**

RESUMEN

Cinchona officinalis L., es una especie endémica del Valle de Loja en la Región Sur del Ecuador, fue considerada como uno de los principales productos forestales económicamente importante desde el punto de vista medicinal. En el siglo XVIII hasta XIX, debido a la sobre-explotación, comercialización y a la alteración de su ecosistema, las poblaciones de *Cinchona officinalis* L., fueron amenazadas; actualmente la regeneración natural de las poblaciones es baja, aunque todavía pueden encontrar individuos aislados en potreros, formando pequeños relictos boscosos, ubicados en pendientes pronunciadas. A través de la utilización de metodologías alternativas (procesos biotecnológicos), el cultivo de tejidos vegetales constituye una herramienta que puede dar solución a problemas naturales e inducidos que presentan algunas especies forestales, mediante la técnica de cultivo *in vitro* se puede propagar tejidos a gran escala e incrementar el número de plantas en menor tiempo; así como conservar recursos fitogenéticos que presentan dificultades para propagarse y mantenerse en su medio natural. En este contexto la propagación de *Cinchona officinalis* L., se realizó con el propósito de generar información sobre la germinación *in vitro* y la inducción de callos, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, como parte del proyecto marco **“Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro*”**.

Para la fase de implantación (desinfección y germinación), fase de inducción de callos y fase de inducción de embriones, se utilizó el medio de cultivo basal de MS (Murashige y Skoog, 1962), agregando diferentes reguladores de crecimiento. Para el ensayo de desinfección de semillas se aplicó hipoclorito de sodio al 50 % (NaClO) y peróxido de hidrogeno al 2 % (H₂O₂) en dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos), donde la utilización de 50 % de NaClO y 2 % de H₂O₂ durante 5 y 10 minutos respectivamente, controlaron eficientemente la contaminación (0,0%). Por otra parte, el efecto de desinfección con NaClO 50 % y H₂O₂ 2 % durante 5 minutos, más la adición de 1,0 mg/l de AG₃ al MS líquido, resultó efectivo sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., obteniendo resultados del 86,67 % y 80 % de germinación respectivamente.

Para la fase de inducción de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., los explantes se cultivaron en medio de MS sólido, suplementados con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: 2, 4-D en concentraciones de 1,0; 2,0 y 3 mg/l, y BAP en una concentración de 0,5 mg/l. Se observó que la combinación de dos sustancias de reguladores de crecimiento es necesaria para la obtención de mejores porcentajes de formación de callo. Así, con el uso solo de auxinas, se obtuvo un 51,67 % de formación de callos con una concentración de 1 mg/l de 2,4-D (T1). La combinación de auxinas y citoquininas resultó ser la más efectiva, obteniéndose 65,00 % de formación de callos con la combinación de 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP (T4); los resultados dependieron de la concentración de auxina/citoquinina empleada.

Para la fase de inducción de embriones a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., los callos se cultivaron en medio de MS sólido suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: 2, 4-D en una concentración de 1,0 mg/l, y KIN en una concentración de 0,5 mg/l. Se observó que la combinación de sustancias reguladoras del crecimiento es necesaria para la obtención de mejores porcentajes de formación de embriones. Pues, cuando los callos se cultivaron en MS sin hormonas (T1), la formación de embriones fue del 15,00 %. Cuando se añadieron auxinas (2,4-D) en una concentración 0,1 mg/l, la formación de embriones fue del 17,00 % (T2). Al combinar auxinas y citoquininas resultó ser la más efectiva, obteniéndose 28,33 % de formación de embriones con la combinación de 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg% KIN (T3).

Palabras claves: *Cinchona officinalis* L., desinfección, germinación *in vitro*, callos, embriones.

ABSTRACT

Cinchona officinalis L., is an endemic species of the Loja Valley in the Southern Region of the country, was considered as one of the main economically important forest products from the medicinal point of view. In the eighteenth century until the nineteenth century, due to over-exploitation, commercialization and the alteration of its ecosystem, the populations of *Cinchona officinalis* L., were threatened; currently, the natural regeneration of the populations is low, although isolated individuals can still be found in paddocks, forming small wooded relicts, located on steep slopes. Through the use of alternative methodologies (biotechnological processes), the cultivation of plant tissues is a tool that can provide a solution to natural and induced problems presented by some forest species, through the in vitro culture technique, tissues can be spread on a large scale and increase the number of plants in less time; as well as conserve phylogenetic resources that present difficulties to spread and stay in their natural environment. In this context, the propagation of *Cinchona officinalis* L. was performed with the purpose of generating information on in vitro germination and callus induction, from vitroplantas of *Cinchona officinalis* L., for conservation purposes.

The present investigation was developed in the Plant Micropropagation Laboratory of the National University of Loja, as part of the framework project "**Identification and description of the current status of *Cinchona officinalis* L., in the province of Loja and generation of protocols for in vivo and in vitro propagation.**"

For the phase of implantation (disinfection and germination), callus induction phase and embryo induction phase, the MS basal culture medium was used (Murashige and Skoog, 1962), by adding different growth regulators. For the seed disinfection test, 50% sodium hypochlorite (NaClO) and 2% hydrogen peroxide (H₂O₂) were applied in two immersion times (5 and 10 minutes), where 50% NaClO and 2% H₂O₂ were used during 5 and 10 minutes respectively, efficiently controlled contamination (0.0%). On the other hand, the effect of disinfection with 50% NaClO and 2% H₂O₂ during 5 minutes, plus the addition of 1.0 mg / l of AG3 to the MS liquid, was effective on the germination percentage of *Cinchona officinalis* L. seeds, obtaining results of germination of 86.67% and 80% respectively.

For the callus induction phase starting from nodal segments of *Cinchona officinalis* L., the explants were cultured in solid MS medium, supplemented with auxins and cytokinins

in different concentrations: 2, 4-D in concentrations of 1.0; 2.0 and 3 mg / l, and BAP in a concentration of 0.5 mg / l. It was observed that the combination of two substances of growth regulators is necessary to obtain better percentages of callus formation. So, with the use of auxins only, 51.67% callus formation was obtained with a concentration of 1 mg / l of 2,4-D (T1). Combining auxins and cytokinins turned out to be the most effective, obtaining 65, 00% of callus formation with the combination of 1.0 mg / l 2,4-D + 0.5 mg / l BAP (T4); the results depended on the concentration of auxin / cytokinin employed.

For the induction of embryos phase starting from callus of *Cinchona officinalis L.*, the calluses were cultured in solid MS medium supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations: 2, 4-D at a concentration of 1.0 mg / l, and KIN in a concentration of 0.5 mg / l. It was observed that the combination of growth regulating substances is necessary to obtain better percentages of embryo formation. Therefore, when the calluses were cultured in MS without hormones (T1), the formation of embryos was 15.00%. When auxins (2, 4-D) were added in a concentration of 0.1 mg / l, the formation of embryos was 17.00% (T2). By combining auxins and cytokinins turned out to be the most effective, obtaining 28.33% of formation of embryo with the combination of 1 mg / l 2,4-D + 0.5 mg% KIN (T3).

Key words: *Cinchona officinalis L.*, disinfection, *in vitro* germination, callus, embryos.

1. INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L. “cascarilla o quina”, simboliza la planta nacional del Ecuador y fue considerada como uno de los principales productos forestales económicamente importante desde el punto de vista medicinal. La Región Sur del Ecuador es el hábitat de muchas plantas útiles y entre ellas *C. officinalis* L., la cual ha sido sobre-explotada y comercializada hacia otras partes del mundo (Acosta-Solís, 1947, 1989; Madsen, 2002).

C. officinalis L., (Rubiácea) es endémica de la provincia de Loja; sin embargo, la ocurrencia de esta especie también está registrada en Colombia y Perú a lo largo de la cordillera oriental y central de los Andes en los bosques montanos, desde los 2800 hasta los 3100 msnm (McComb, 1946; Harling, 1986; Garmendia, 2005; Missouri Botanical Garden, 2017). Se distribuye en "manchas" a diferentes altitudes y está asociada a otras especies que son usadas para detectar su presencia (Acosta-Solís, 1947).

El hábitat potencial de *C. officinalis* L., en la provincia de Loja abarca aproximadamente 9.836 km², de los cuales el 78,45% del hábitat se ha perdido y solo el 17,88% se encuentra protegido dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Parque Nacional Podocarpus y Yacuri) (Espinosa & Ríos, 2017). Según Acosta-Solís (1947); la cascarilla por sus propiedades medicinales contra la malaria contribuyó durante más de dos siglos a las industrias de Europa y América (Hobhouse, 1985). Debido a esto, hizo que las poblaciones de *C. officinalis* L., en la provincia de Loja fueran sobre-explotadas y comercializadas desde el siglo XVIII hasta el siglo XIX.

No obstante, actualmente en ecosistemas de la provincia de Loja todavía pueden encontrarse individuos aislados en potreros, formando grupos numerosos de arbustos grandes y rebrotes vegetativos, distanciados unos de otros, ubicados en suelos con poca cantidad de materia orgánica y pendientes pronunciadas (Garmendia, 2005). Sin embargo, actividades antrópicas como la agricultura, ganadería y deforestación, han tenido un impacto mucho más significativo en la destrucción de su hábitat que la propia extracción de la corteza (Madsen, 2002). Posiblemente la reducción del hábitat de *C. officinalis* L., esté afectando la germinación y reclutamiento de individuos en las poblaciones remanentes (Reaka-Kudla, Wilson, & Wilson, 1996; Rentería, 2002). Por tal razón, otras especies de *Cinchona* comparten la misma historia de sobre-explotación y comercialización debido a sus propiedades medicinales como: *C. calisaya* en Bolivia y Perú, *C. pitayensis* y *C. lancifolia* en Colombia (Cuvi, 2009).

El futuro de *C. officinalis* L., en el Ecuador es incierto, ya que en que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración; y está catalogada como una especie en peligro de extinción; además, el país posee la mayor tasa de deforestación de la región, por lo que son urgentes los esfuerzos para la conservación eficiente de la especie (MacDicken et al., 2016). Bajo esta perspectiva, por medio de la presente investigación se contribuirá a generar información relevante sobre la propagación masiva (germinación *in vitro* e inducción de callos) de *Cinchona officinalis* L., a través de la utilización de metodologías alternativas (procesos biotecnológicos), y así aportar al manejo sustentable de la especie, asegurando su permanencia en los frágiles ecosistemas naturales; siendo entonces, el cultivo de tejidos vegetales una herramienta biotecnológica que puede dar solución a problemas naturales e inducidos que presentan algunas especies forestales.

La presente investigación a nivel de pregrado se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal desde octubre de 2016 a julio de 2017, y fue parte del macro proyecto “**Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro***”; con el auspicio económico de la Universidad nacional de Loja a través de la Dirección de Investigaciones y del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, con la finalidad de emprender programas de forestación y reforestación para recuperar los ecosistemas nativos degradados de la región sur del Ecuador.

Objetivo General:

- Contribuir a la generación de información sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., y la inducción de callos, a partir de vitroplantas producidas a nivel de laboratorio, con la finalidad de aportar a la conservación de la especie en la provincia de Loja.

Objetivos específicos:

- Probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.
- Determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción de la especie *Cinchona officinalis* L.

2.1.1. Generalidades de *Cinchona officinalis* L.

La *Cinchona*, planta nacional del Ecuador, simboliza el origen histórico del “Árbol de la Vida”; conllevando a la contribución más importante para la humanidad salvando del azoteo de las fiebres palúdicas.



Figura 1. Plántula de *C. officinalis* L. Proyecto *Cinchona*.

En la provincia de Loja, fueron conocidos los primeros ejemplares, a los que el fundador de la nomenclatura botánica Carlos Linneo, científicamente, denominó el nombre de *Cinchona officinalis* L. (Figura 1) dedicándole a la condesa de Chinchón que vivía en Perú quien se había curado de la malaria (Madsen, 2002; Acosta-Solís, 1947) atribuyéndose su origen y principal centro de producción al nudo de Cajanuma (Buitrón, 1999).

Otro inicio, para que esta especie se siga explotando, fue después de la segunda guerra mundial con el fin de combatir la malaria, conduciendo casi a la extinción; esto conlleva a que se roben plantas de Ecuador, para realizar plantaciones de quinina en Java, siendo a la vez una salvación para los bosques de quinina para que no se sigan explotando.

Hasta el siglo XIX esta planta en los bosques andinos de Loja fue la más sobreexplotada, debido a sus propiedades medicinales y curativas que se hallan en la corteza (Nieto, 2000). Actualmente, esta especie que se encuentra en los bosques del Valle de Loja se halla en la categoría de amenazada, pese a que ya no se la extrae (Valencia et al., 2000). Las poblaciones naturales de esta especie se están reduciendo principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria y explotación de la madera (Mejía et al., 2012).

2.1.2. Clasificación Botánica

ORDEN: Rubiales

FAMILIA: Rubiaceae

GÉNERO: *Cinchona*

ESPECIE: *officinalis*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Cinchona officinalis* L.

NOMBRE COMÚN: Cascarilla, quina o quinina (Missouri Botanical Garden, 2017)

2.1.3. Descripción Taxonómica

La especie *Cinchona officinalis* L., es un árbol de 11 a 15 m de alto; fuste cilíndrico de 30 a 40 cm de diámetro; ramificación simpodial; copa globosa irregular, bastante densa (Andersson & Taylor, 1994; Andersson, 1999). La corteza externa es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. Hojas coriáceas con grandes nervios de 1,8, a 2,7 cm de largo, de color verde oscuro; algunas son pubescentes y otras lisas; simples, opuestas y recusadas; de forma elíptica-ovalada; pecioladas; hojas de 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho (Andersson, 1999; Garmendia, 2005).

Las flores se agrupan en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, con corola blanca o roja, tubular de 8 a 13 mm de longitud, son hermafroditas, actinomorfas. Frutos en capsulas cilíndricas de color marrón oscuro, de forma elipsoide, dehiscente con tres a cuatro semillas. Las semillas son fusiformes, redondeadas por un ala membranosa, son de 7-10 mm de largo, 2-3 mm de ancho y son ligeras para su tamaño, puesto que un gramo puede contener más o menos 9,000 (ANACAFE, 2004; Garmendia, 2005; Galeano, 2009; Martínez, et al., 2013).

El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los arboles 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 (ANACAFE 2004; Álvarez, 2014).

2.1.4. Reproducción de la especie

Su propagación se da por semillas. Las plantas que se obtienen por semilla tienen un desarrollo muy lento. El tipo de germinación es epigea y el principal agente dispersante es el viento y el agente polinizador son las aves (Loján, 1992).

Actualmente, las poblaciones de *Cinchona* son pequeñas (Garmendia, 2005) encontrándose solo en lugares donde se dan condiciones específicas para la germinación y el desarrollo de las plántulas.

2.1.5. Usos de la especie *Cinchona officinalis* L.

La madera de esta especie se utiliza para postes, puntales, vigas, leña y carbón (Loján, 1992). La corteza, que tiene aplicaciones medicinales por los compuestos metabólicos (Ulloa & Jorgensen, 2000), por tal motivo la *Cinchona* se explotó en varios países, principalmente en el Ecuador, constituyéndose en el primer fármaco-terapéutico que aportó América a la Farmacopea Universal.

La corteza de cascarilla produce un metabolito conocido como “quinina”, que tiene propiedades antimaláricas para combatir fiebres provenientes del paludismo; además, se le atribuye su uso para, estimular el apetito, tonificar el organismo, estimular el crecimiento del cabello, curar neumonías, desordenes del ritmo cardiaco, y también sirve como depurativa ya que favorece la eliminación de toxinas por medio de la piel y orina (Garmendia, 2005; Lopera et al., 2005)

Su 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 de su descubrimiento como tónico medicinal andino, regrese a nuestros países también en forma de tónico, esta vez gaseoso, para su deleite en cócteles (Ulloa, 2006; Russell, 2012).

2.2. Biotecnología vegetal

La biotecnología vegetal, es una extensión de la tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante, por ende, permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada (Monsanto, 2011).

Por consiguiente, en base a las nuevas tecnologías desarrolladas están las técnicas de aislamiento de células, tejidos y órganos de plantas y el crecimiento de estos bajo condiciones controladas (*in vitro*). De allí, que el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes) sobre medios sintéticos en condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras.

En sí, es una herramienta nueva que se está desarrollando en distintos campos, en forma creciente y a escala global. En el sector forestal, cumple con dos objetivos básicos: el uso de los recursos genéticos y su mejoramiento en las plantaciones forestales, y el

mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación (Soto et al., 2010).

2.3. Micropropagación *in vitro*

La Micropropagación es la técnica que permite el desarrollo masivo de nuevas plantas en medios artificiales (medio de cultivo), bajo condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas madres (embriones, segmentos, tallos, polen, etc.) con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. También se puede decir, que es el resultado de la proliferación de brotes, que son multiplicados en condiciones asépticas y elementos químicos para su desarrollo ideal (Abdelnour & Escalant, 1994; Castillo, 2008; Díaz, 2012).

Por ende, forma uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, usándose en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, ornamentales y forestales, etc. (Frid, 2009; Segretín, 2010).

2.4. Generalidades del cultivo *in vitro*

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustenta todas las técnicas del cultivo *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 (Bucks-Husemann et al., 1970; Reinert et al, 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células.

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Nash & Davies, 1972; Komamine et al., 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel & 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 por los países desarrollados de 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 en el mundo con una producción de más de 500 millones de unidades por año (Vasil, 1994).

Los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas se han visto beneficiados también por el desarrollo del cultivo de tejidos y la principal limitante para su utilización en un mayor número de especies ha sido la no disponibilidad de sistemas de regeneración eficientes para los genotipos de mayor importancia comercial.

2.5. Morfogénesis Vegetal

La morfogénesis conduce a la embriogénesis somática y la organogénesis. La organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, por ende, es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos y que dependen básicamente de la actividad y expresión de ciertos genes (Olmos et al., 2004).

2.6. Métodos de regeneración de plantas *in vitro*

2.6.1. 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.

2.6.1.1. 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 & 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.

Su 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 bioreactores (Takayama & Akita, 1996) y sistemas de inmersión temporal de los explantes (Alvard et al., 1993; Jiménez et al., 1997).

2.6.1.2. Formación de yemas adventicias

Es la formación de estructuras de novo de yemas a partir de meristemas 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 & 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 su 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.

2.6.2. 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 & 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 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 sus 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 de el 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, pues consiste en solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina “potente” (2,4-diclorofenóxiacético, Dicamba, picloram); sin embargo, lograr multiplicarlo con buen crecimiento 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 & 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, con diferencias superiores en cuanto a crecimiento y apariencia de los callos a las concentraciones de 4 y 6 g/l 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). Pudo comprobarse 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.

2.6.3. 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 embriónía adventicia, por primera vez descrita por Strasburges en 1878. Aunque fueron Reinert et al., 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. Sus 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

2.6.3.1. 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); Escalant & 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 proembrión, fase globular, corazón torpedo 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

2.6.3.2. 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 & 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 & 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 de esto tenemos que 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).

2.6.3.3. 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 & 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 correlacionada 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).

2.6.3.4. 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. (1958) citado por Pérez (1998).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (E.S.B.F.) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (E.S.A.F.).

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 arabica* (café), al cual se refirió anteriormente, así como en los bananos y *Musa sp* (plátanos).

a. 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.

- Medio de inducción (división celular y redeterminación)
- Medio de acondicionamiento (diferenciación)
- Rescate del embrión (aislamiento)
- Germinación del embrión (crecimiento del brote y de la raíz)
- Fortalecimiento de la planta
- Transferencia a suelo

Se han identificado, varios factores generales que controlan este proceso:

- Los tejidos donantes (especies vegetales o variedades, la fuente del explante y el pretratamiento del explante)
- El medio de cultivo (constituyentes orgánicos e inorgánicos, concentraciones y tipos de reguladores del crecimiento y osmolaridad total)
- Las condiciones de crecimiento (calidad, intensidad y duración de la luz, rango de temperatura, intercambio gaseoso, régimen de subcultivos y la selección de tejidos durante los subcultivos)

Otra forma de embriogénesis indirecta son los cultivos de suspensiones celulares, los cuales son establecidos generalmente por la transferencia de fragmentos de callos indiferenciados o embriones somáticos en estadios jóvenes a medio de cultivo líquido, los cuales después son agitados durante todo el periodo de cultivo. Ellas son ampliamente usadas como un sistema modelo para estudiar los caminos de la producción de metabolitos secundarios, inducción de enzimas y expresión de genes, representando la base para el escalado del cultivo en los Biorreactores.

Existen algunos problemas que limitan la producción de embriones somáticos a partir del cultivo de células en suspensión:

- Bajo índices de la mitosis en las células
- Agregados celulares grandes
- Potencial embriogénico

Se plantea por varios autores que, durante el cultivo, el potencial morfológico disminuye con el tiempo y se incrementa la producción de estructuras anormales (Street, 1977; Denchev, 1987).

2.6.3.5. Embriogénesis somática directa

Esta ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es producto de la función realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante. la embriogénesis somática directa ofrece un numero de aplicaciones potenciales:

- Clonado directo de híbridos comerciales F1 para especies donde el material puede ser vendido como plantas jóvenes para trasplante a campo. El sistema ideal debe tener una continua embriogénesis directa desde los embriones sexuales F1 con un periodo de cosecha de los embriones somáticos obtenidos para lograr su crecimiento y desarrollo en plantas.
- Clonado rápido de un material (stock) de apreciado valor para el mejoramiento, en el estado más temprano posible de su ciclo de vida después del cruzamiento.
- Selección *in vitro* y mejoramiento de genotipos para diferentes caracteres de plantas completas en el estado más temprano posible de su ciclo de vida.
- Generación de plantas jóvenes de clones de especies fuera del mejoramiento donde cada semilla representa un genotipo diferente.
- Mecanización y automatización de la propagación microclonal mediante el uso del sistema de Bioreactores.

Un gran empeño se ha hecho en los momentos actuales para estudiar diferentes fuentes de explantes y su efecto en la producción de embriones somáticos. Los embriones somáticos pueden ser obtenidos desde varias fuentes de cultivo tales como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, peciolos, entre otros. La reacción del explante para la embriogénesis está determinada por la edad de este, así como la concentración de auxina empleada. Una fuerte correlación ha sido establecida entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de desdiferenciación y diferenciación *in vitro* (Denchev & Atanassov, 1989; Denchev et al., 1990).

2.6.3.6. Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática

a. Fases de la embriogénesis somática

Detalles morfológicos observados han revelado la existencia de 4 fases: La fase 0, 1, 2 y 3, pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis, en el sistema descrito por Fujimura & Komamine (1980) en la *D. carota* (zanahoria).

Durante la fase 0, la competente célula aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos (estado 1), con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En este tiempo, los agregados de células formadas desde las células aisladas ganan la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio, dando lugar al estado 1 de agregado celular anteriormente señalado.

La siguiente fase, la fase 1 es inducida por la transferencia de los agregados celulares en estado 1 a el medio libre de auxina. Durante esta fase la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los 3 días después de transferido a medio sin auxina. Después de la fase 1 ocurre una rápida división a los 3 o 4 días de cultivo en ciertas partes del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en estado globular, esta fase es designada fase 2, donde el tiempo de división de una célula es de solamente 6,3 horas en relación a la fase 1 donde es de 51 horas. En esta fase ocurre una rápida división celular en ciertas partes del agregado producto de la polarización de la síntesis de ADN, dando lugar al embrión globular y su suspensor en la zona que no ocurrió división.

En la fase final, fase 3, continua el continuo desarrollo del embrión al estado de corazón y torpedo. Como se señaló anteriormente esto es específico para el caso de la zanahoria,

especie dicotiledónea donde se diferencian los diferentes estados de desarrollo del embrión somático.

Para las monocotiledóneas existen las fases 0,1 y 2; pero la fase 3 no, pues no se diferencian los estados de corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición, en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por el estadio de coleoptilar.

b. Fase de proliferación de los embriones somáticos

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkle et al., 1996). Los procesos de multiplicación han recibido varios términos como embriogénesis secundaria, recurrente o repetitiva.

La proliferación de células embriogénicas es aparentemente influenciada por un número de factores, algunos de los cuales pueden ser controlados durante el proceso y otros que todavía no han sido definidos, siendo muchos de estos los mismos que afectan el proceso de inducción de la embriogénesis anteriormente señalados. El más fuerte factor asociado con la continua proliferación de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo, parece ser que el efecto de esta fitohormona no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos, una vez que un grupo de células embriogénicas han sido obtenidas, la presencia continuada de esta inhibe el normal desarrollo y maduración del embrión somático, pero si el nivel de auxina es bastante alto, un nuevo ciclo de producción de embriones somáticos es iniciado.

El rol exacto de la auxina es el estímulo de la proliferación en oposición al desarrollo del embrión es desconocido. Además, los niveles de auxina necesarios para mantener la embriogénesis repetitiva varían entre especies. Si los niveles de la fitohormona bajan demasiado o es eliminada se produce el desarrollo y maduración de los embriones somáticos.

Un grupo de especies de plantas, incluido un número de leguminosas como la *Medicago sativa* L. (alfalfa) y otras especies como la nuez de nogal, solo requieren recibir el estímulo con auxina durante un período crítico, el cual puede ser de unos pocos días permitiendo lograr la embriogénesis repetitiva, la cual es iniciada y mantenida

indefinidamente en un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. Sin embargo, en otras especies de plantas es necesaria la ausencia de la auxina para lograr una autoembrionía producto de los altos niveles de citocinina endógena que la planta presenta (Bonnelle et al., 1990).

c. Fase de maduración del embrión somático

La fase de maduración es el periodo en el desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula y la acumulación de sustancias de reserva (Bewley & Black, 1985). En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesaria el suplemento con nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3 - 6 % son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una total maduración y evita la germinación precoz (Merkle et al., 1996).

La correcta acumulación de reservas y correspondiente incremento en el peso seco de los embriones somáticos pueden indicar una alta calidad en el vigor lo cual influye positivamente en su posterior germinación (Fuji et al., 1990).

Diferentes patrones en la acumulación de sustancias de reserva en el embrión somático pueden dirigir las modificaciones de diferentes protocolos que pudieran elevar el desarrollo y posterior rendimiento de la planta. Varios estudios han sido realizados usando como marcadores de la calidad del desarrollo del embrión somático distintas sustancias de reserva tales como la acumulación de proteínas, lípidos y almidón, aunque este último menos estudiado.

d. Fase de germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos

Varios autores al pasar embriones de las condiciones de maduración a germinación directamente han alcanzado pobres resultados (Parrot et al., 1988; Roberts et al., 1990 citado por Pérez, 1998). Estos resultados sugieren que un tratamiento postmaduración es requerido, aunque no es necesario en todas las especies de plantas.

Se ha podido comprobar que, en muchos casos en el embrión somático durante la maduración puede artificialmente inducirse dormancia (Gray & Purohit, 1991) para romper la misma se puede emplear tratamientos con frío o aplicaciones de ácido giberélico, lo cual provoca una aceleración en la germinación y crecimiento del embrión, así como el tratamiento con otros reguladores del crecimiento como las citoquininas.

La adición de concentraciones de ácido abscísico (ABA) durante la etapa de maduración de los embriones somáticos promueve la acumulación de sustancias de reserva. Esto seguido de un apropiado tiempo de secado puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. La desecación, es requerida para la correcta transición de embrión maduro a la germinación (Kermode, 1990 citado por Pérez, 1998). La imposición de un tratamiento de secado parcial a total al embrión somático, aumenta su posterior germinación y crecimiento, normalizando y sincronizando la germinación; además, de dar una mejor sincronización del crecimiento de las raíces y el brote.

La tolerancia a la desecación puede ser inducida por la aplicación de ABA, prolina y tratamientos con calor (Merkle et al., 1996). La maduración del embrión con altos niveles de ABA promueve la acumulación de sustancias de reserva y, seguido de un apropiado tiempo de secado se puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo. Sin embargo, en algunas especies no es necesario la desecación para lograr una buena germinación (Arcioni & Mariotti, 1982).

La desecación o deshidratación de los embriones somáticos hasta un 10 – 15 % de humedad, incrementa la conversión *in vitro* en muchos cultivos. Esta puede ser lograda al transferir los embriones después de maduros en un medio libre de hormonas, a un envase cerrado y seco por una semana. Una vez pasados estos de nuevo a un medio de cultivo, los embriones somáticos germinan de forma rápida y uniforme en solo 2 semanas (Parrott et al., 1988). Este proceso constituye una parte normal del desarrollo de la semilla botánica y parece jugar un rol importante en la preparación del embrión cigótico para la germinación.

En la mayoría de los trabajos realizados, los autores hacen poca distinción entre los procesos de germinación y conversión (Merkle et al., 1996). Sin embargo, la germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o el brote, mientras que la conversión es definida por Trickland & Stuart (1984) citado por Pérez (1998) como la sobrevivencia y desarrollo en fase de propágulos en condiciones ambientales *ex vitro* o sea en suelo. Muy a menudo se reporta por los autores la habilidad del embrión somático para la germinación, pero se ofrecen muy pocos datos sobre su conversión. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro*.

Pocos análisis bioquímicos y fisiológicos han sido hechos comparando los patrones de germinación de embriones cigóticos y somáticos. Las reservas de proteína y lípidos en el embrión somático declinan sustancialmente a partir del primer día en condiciones de imbibición o bien antes de la elongación de la raíz (Cry et al., 1991). La degradación tan rápida de las sustancias de reserva en el embrión somático, la cual es diferente en un embrión cigótico es probablemente el resultado de la falta del tejido nutritivo que rodea a la semilla, lo cual explica porque a veces las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las de semillas. Fuji et al. (1990) reporta que 25 días de tratamiento con ABA durante la maduración del embrión estimulo el aumento del peso seco, la acumulación de almidón y la conversión de 5 % a 80 %. Todo lo anteriormente señalado apoya lo planteado sobre la necesidad de la acumulación de abundantes sustancias de reserva durante la maduración del embrión somática, para lograr una buena germinación y conversión. También juega un papel importante en la germinación la adición de citoquininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por la auxina durante la inducción y proliferación.

2.7. Medio de cultivo

El éxito del cultivo *in vitro* principalmente está influenciado por la naturaleza del medio de cultivo usado. El medio de cultivo es una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes, y puede estar compuesto por sales minerales, compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y mataría inerte (Roca & Mroginski, 1991).

Con el medio de cultivo se logra abastecer de nutrimentos necesarios al tejido, células u órganos que se desarrollan en él; esta alimentación exógena que requiere el explante es necesaria por el hecho de que las células son heterótrofas (George & Sherrington, 1984).

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 & Escalant, 1994).

2.7.1. Compuestos inorgánicos

Compuestos de las sales minerales del medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962), conocida como medio MS (Cuadro 1); las sales minerales se dividen en macro y micro

nutrientes (sulfato de manganeso, zinc, cobre y fierro; ácido bórico; yoduro de potasio; molibdato de sodio; cloruro de cobalto, etilendiaminotetraacético de sodio).

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

Solución Madre	Componentes	Cantidad mg/l	Macro/microelementos
NITRATOS	Nitratos de amonio	1 650,00	*
	Nitratos 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	**

Fuente: Murashige y Skoog, 1962. * Macroelementos; ** Microelementos

2.7.2. Compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos están conformados por: carbohidratos, vitaminas, hormonas o reguladores de crecimiento (Abdelnour & Escalant, 1994; Lluna, 2006).

2.7.2.1. Carbohidratos

En los medios de cultivo se utiliza normalmente la sacarosa, también se puede usar glucosa y en menos medida fructuosa, dependiendo mucho del tipo del material vegetal (Pierik 1990; Muñoz de Malajovich, 2012).

2.7.2.2. Vitaminas

Se ha demostrado importante en el cultivo de tejidos la tiamina (vitamina B1). Sin embargo, para estimular procesos específicos han utilizado las vitaminas, B1, B2, B6, vitamina H y E, biotina, ácido nicotínico, ácido fólico, piridoxina, pantotenato y riboflavina; entre otras (Pierik, 1990; Lluna, 2006; Muñoz de Malajovich, 2012).

2.7.2.3. Reguladores de crecimiento

a. Auxinas: promueven la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callos), formación de raíces adventicias e inhibición de la formación de brotes adventicios y axilares; a veces inhiben la embriogénesis. Tienen dos orígenes, auxinas naturales-AIA y auxinas sintéticas como el ácido indolbutírico-AIB, ácido naftalenacético-ANA y ácido diclorofenoxiacético-2,4-D (Roca, 1991; Muñoz de Malajovich, 2012).

b. 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 (Roca, 1991; Davies, 1995; Muñoz de Malajovich, 2012). Tiene dos orígenes: natural (Zeatina-ZEA) y sintéticos (Benzilaminopurina-BAP y Kinetina-KIN).

2.7.2.4. Giberelinas

Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*; asimismo, pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990; Muñoz de Malajovich, 2012).

Por otra parte, Margara (1998); Celis & Gallardo (2008) señalan que las giberelinas funcionan como reguladores de crecimiento al estar asociadas al crecimiento de tallos, la inducción de la brotación de yemas, interrumpen el periodo de latencia de las semillas y promueven el desarrollo de los frutos.

Las giberelinas son un grupo de hormonas que desempeñan un papel significativo en la fisiología de la semilla, en muchas semillas el ácido giberélico (GA3) mejora la velocidad

de germinación, el porcentaje de germinación y el crecimiento inicial de las plántulas (Hartmann & Kester, 1997). Según Moore & Janick (1988), muchos reguladores de crecimiento como las giberelinas pueden inhibir o promover la germinación dependiendo del caso.

Existen varios tipos de giberelinas, las comunes están AG1, AG3, AG4, AG7 y AG9. El AG3 ha demostrado ser necesaria para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Rosales et al., 2004).

2.7.3. Preparaciones naturales complejas

Según Abdelnour (1994) y Muñoz de Malajovich (2012) menciona que existen un sinnúmero de variedades de sustancias de composición indefinida que han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas están el extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada, jugo de naranja y tomate.

2.7.4. Materiales inertes

Son compuestos gelificantes que actúan como agentes de soporte, como el agar, gelrite y fitogel; lana de vidrio, y, papel filtro (Lozada, 2010; Muñoz de Malajovich, 2012).

2.8. Explante

Explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, como un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales. Con excepción de los óvulos y el polen los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas (Narváez, 2009; Ramos, 2012).

Según Suarez (2011), el manejo de los explante se realiza de dos formas:

a). Preparación del explante: una vez seleccionada la parte de la planta, se limpia y lava cuidadosamente, se elimina parte del tejido externo y se procede a la desinfección superficial.

b). Escisión del explante: una vez lavado el tejido se puede colocar sobre un papel filtro y luego proceder al aislamiento del explante que se desea cultivar e introducir en el medio

de cultivo destinado para su desarrollo; este proceso se debe realizar dentro de la cámara de flujo y con todo el material esterilizado.

El éxito en el cultivo *in vitro*, en parte está influenciado por factores inherentes al explante, incluido el tamaño, el estado de desarrollo de la planta, la edad fisiológica del explante, la fuente del órgano o tejido y el genotipo (Conger, 1981; George & Sherrington, 1984).

El estado fisiológico, sanitario y edad de la planta donante o madre de donde proviene el explante influyen significativamente en su capacidad morfogénica. Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Roca & Mroginski, 1991; Roca, 1991; Mroginski et al., 2002.).

Los explantes cultivados *in vitro* pueden dar dos tipos de respuesta: una de diferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogénica por la cual o se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática) (López, 1996).

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración; mientras que, con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (Villalobos & García, 1982). Por otra parte, cuanto más grande sea el explante, mayores serán las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello es posible que traiga aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos.

2.9. Uso de soluciones desinfectantes para el establecimiento *in vitro*

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo (Roca, 1991).

Para establecer cultivos asépticos es conveniente; trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivos más comúnmente en la autoclave a una presión de 15 lb. Durante 15 a 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente

121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida; desinfectar los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y realizar los cultivos con ciertas normas de asepsia. (Roca,1991).

Existen una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes; los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO) del 1 % al 3 %, hipoclorito de calcio (CaClO) de 6 % a 12 %, peróxido de hidrogeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH), y bicloruro de mercurio (HgCl₂) de 0,1 % a 1,5 %, entre otros. Los tres primeros se emplean en tiempos de 10 a 20 minutos; el alcohol se usa generalmente al 70 % y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es altamente tóxico y no es fácilmente removible del explante, se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0,1 % a 1,5 % durante 1 a 3 minutos). De estos desinfectantes el hipoclorito de sodio ha sido el más usado por los investigadores en el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales a concentraciones y tiempos diferentes (Roca, 1991; Roca & Mroginski, 1993).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween - 20 (0,01 % al 0,1 %) con el objetivo de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante; pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol al 70%; asimismo, es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante. Terminado el tiempo de inmersión del explante en las soluciones desinfectantes se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar restos del mismo, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos (Roca, 1991).

Por otra parte, el uso de antibióticos en el medio de cultivo durante esta fase también es frecuente, aunque no siempre surte el efecto deseado (Phillips et al., 1981; Pierik, 1987; Pariani, 2015).

2.9.1. Hipoclorito de sodio

El Hipoclorito de sodio (NaClO) (ajax cloro) en cultivo de tejidos es muy utilizado, porque proporciona la muerte de microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, permitiendo que exista un mayor índice de establecimiento en el material vegetal (Borges et al., 2009).

El NaClO es un producto efectivo, de bajo precio y de fácil adquisición en el mercado, son probablemente los compuestos liberadores de halógenos mejor conocidos y figuran entre los desinfectantes más antiguos. Sin embargo, dependiendo del tipo de tejido, su procedencia y otros factores, se tendrá un mayor o menor grado de éxito cuando los explantes se sometan al proceso de desinfección. Son extremadamente efectivos frente a todo tipo de microorganismos, pero pierden gran parte de su actividad en presencia de materia orgánica.

2.9.2. Peróxido de hidrogeno

En cuanto a la utilización del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se ha comprobado que es bactericida y fungicida, previniendo la proliferación de algunos hongos (HRM, 1993; Muñoz et al., 2009; Mas I Gisbert et al., 2011). Barnett (1976); Barnett (1998) recomienda el uso de peróxido de hidrógeno como un buen desinfectante de semillas forestales, incluso como estimulante de la germinación en algunas semillas de pino, porque ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno, facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para movilización de componentes celulares involucrados en el crecimiento de la raíz (Flores, 2008); el peróxido de hidrógeno parece tener un efecto favorecedor en la germinación de las semillas de todas las especies.

El H_2O_2 tiene más capacidad de oxidante energético que el cloro o el dióxido de cloro debido a sus fuertes propiedades oxidativas, por lo que se emplea como agente desinfectante; sus moléculas son degradables en agua puesto que liberan oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Barnett, 1998; Iáñez, 1998; Lenntech, 2003; ASTRE, 2004); a la vez que favorecería la absorción en los tejidos el hipoclorito de sodio, desinfectantes que se utilicen en combinación (Mas I Gisbert et al., 2011).

En concentraciones del 10-20 % de H_2O_2 produce quemaduras a los tejidos expuestos (ASTRE, 2004). Un factor importante cuando se aplica H_2O_2 es la agitación de la semilla puesto que se minimiza la demanda química del oxígeno (Rodríguez et al., 2004), la velocidad de agitación es importante pues asegura un suministro adecuado del oxígeno (Sánchez, 2004). Cuando se hace la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por bacterias (Riofrío, 2004).

2.10. Factores ambientales de incubación

Los principales factores importantes para la incubación son los siguientes: luz, temperatura, humedad y oxígeno.

2.10.1. Luz

La luz juega un papel principal tanto en calidad, intensidad y fotoperiodo; dado que influyen en el desarrollo y en el metabolismo de varios cultivos. Se considera la duración del día, irradiación y composición espectral; la duración del día se establece entre 14 y 16 horas, aunque también se usa luz continua, y pueden influir en la síntesis y acumulación de ciertas sustancias; para la composición espectral de la luz, se utiliza tubos fluorescentes del tipo blanco frío (Pierik, 1990; Barba et al., 2001; Ramos, 2012)

2.10.2. Temperatura

La temperatura se mantiene constante de 24 a 26°C, dependiendo de la especie de la cual se obtienen los explantes; se elige una temperatura más baja 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28 a 29 °C para especies tropicales (Pierik 1990; Serrano & Piñol, 1991).

2.10.3. Humedad

De lo que se conoce, la humedad dentro de los cultivos *in vitro* es alta por la condensación de las paredes de los tubos o frascos, y por lo general la planta *in vitro* no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica como ceras, estomas, cutículas, etc. (Abdelnour & Escalant, 1994).

La humedad del aire del área de incubación solo influirá en la pérdida de agua de los tubos o frascos (Pierik, 1990). En cambio, Roca & Mroginski (1991) señalan que la humedad dentro del área de incubación puede ser de 70 - 80%.

2.10.4. Oxígeno

Para el crecimiento de células y tejidos, la buena aireación es un factor importante. El oxígeno que el explante obtiene es de las moléculas de agua que se encuentra en el medio de cultivo (Díaz, 2012).

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del área de estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja –UNL (Figura 2); ubicado al sur de la ciudad de Loja a 3 km del centro de la ciudad de Loja, situado entre las siguientes coordenadas geográficas: latitud 04° 00' 00" S y longitud 79° 12' 00" O (Quichimbo & Cisne, 2012).

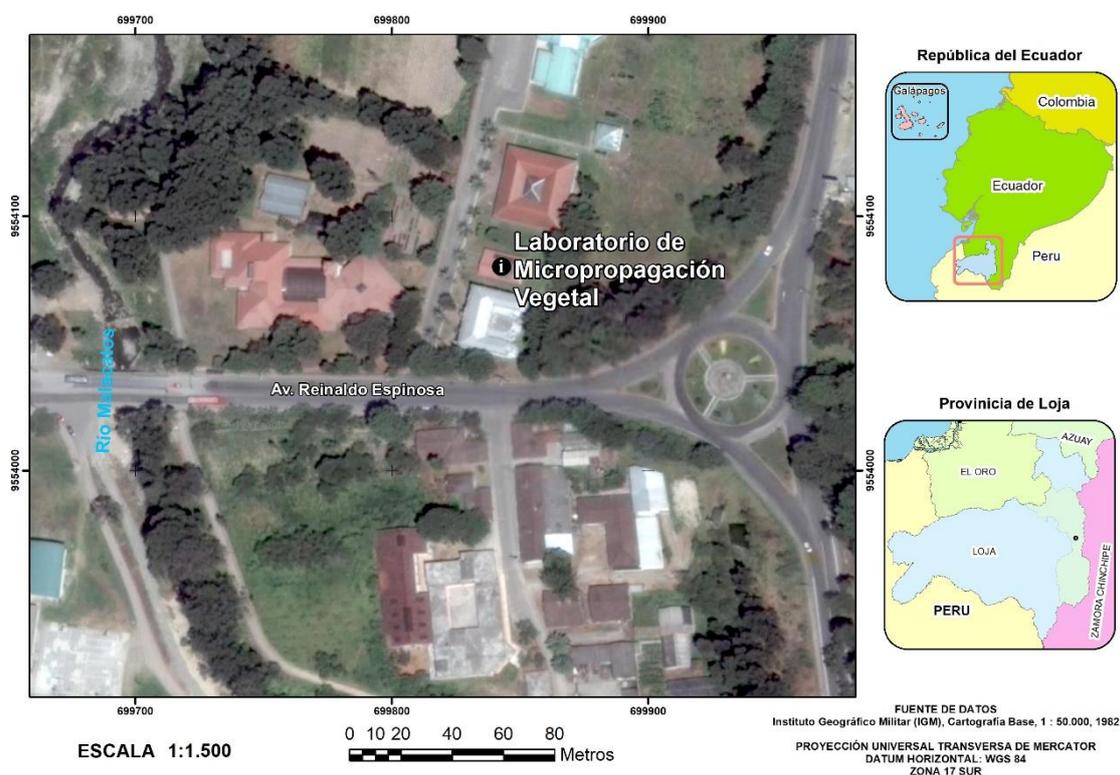


Figura 2. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

3.2. Metodología para probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.

Para el ensayo de desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., se aplicó en base a la metodología utilizada por Lima (2016) el cual logró buenos resultados de las variables contaminación y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., con la aplicación de hipoclorito de sodio (Ajax cloro) al 50 % en diferentes tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min.) + la adición de 1,0 mg/l de ácido giberélico (AG3); logrando un porcentaje

promedio de contaminación de 0,0 % y un porcentaje promedio de germinación de 74,44 % (Lima, 2016).

El objetivo de esta fase fue probar el efecto de dos desinfectantes: hipoclorito de sodio al 50 % y peróxido de hidrógeno al 2 %, en tiempos de 5 y 10 minutos, con el propósito de reducir la contaminación de semillas de *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos.

3.2.1. Selección de las semillas

La semilla fue obtenida de un relicto boscoso ubicado en el sector Uritusinga, cantón Catamayo, provincia de Loja; las mismas que fueron colectadas de frutos de árboles seleccionados de características fenotípicas sobresalientes como: forma, tamaño, color, madurez fisiológica y buenas condiciones fitosanitarias. Se eliminó las impurezas y con apoyo del estereomicroscopio se seleccionó las mejores semillas (Figura 3, 4 y 5).



Figura 3. Selección de semillas de *C. officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016

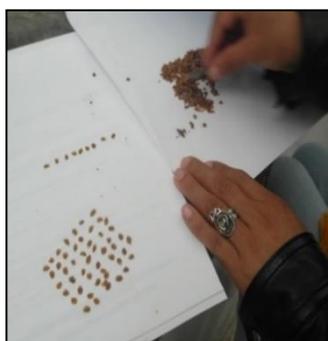


Figura 4. Selección de semillas de *C. officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

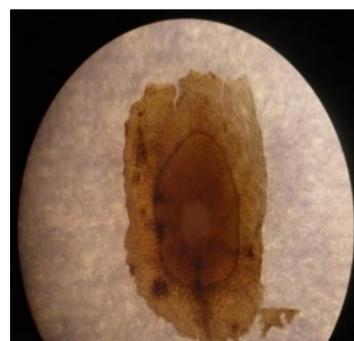


Figura 5. Visualización en el estereomicroscopio. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

3.2.2. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo basal con las sales minerales de MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado con tiamina 1 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, sacarosa como fuente de carbono al 2,0 %; y, ácido giberélico (AG_3) 1,0 mg/l (Figura 6); se ajustó el pH a 5.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCL) 1N (Figura 7).



Figura 6. Preparación del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.



Figura 7. Ajuste del pH óptimo del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

Se distribuyó el medio de cultivo líquido aproximadamente la cantidad de 4 ml en cada tubo de ensayo, luego fue esterilizado en la autoclave a 120°C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos (Figura 8).



Figura 8. Distribución del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

3.2.3. Desinfección de las semillas

Las semillas seleccionadas de *Cinchona officinalis* L., para su desinfección se colocaron en tela tul conteniendo aproximadamente 30 semillas, se las amarró formando pequeños grupos debido al tamaño de las mismas para su manipulación al momento de la siembra *in vitro* (Figura 9). Posteriormente, las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio con agua corriente más jabón líquido (Figura 10).



Figura 9. Semillas colocadas en tules. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.



Figura 10. Semillas agrupadas en tul y colocadas en solución jabonosa. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

La desinfección de las semillas se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia, seguido de inmersión en alcohol al 70 % por unos segundos, para luego sumergirlas en dos soluciones: hipoclorito de sodio (ajax cloro) y peróxido de hidrogeno durante diferentes tiempos de exposición (Cuadro 2), finalmente, se eliminó la solución desinfectante; y, luego de cada inmersión se realizó de 2 a 3 aclareos con agua destilada estéril (Figura 11).

Cuadro 2. Desinfección de semilla de *C. officinalis* L., por tratamiento, en diferentes tiempos de inmersión.

Tratamientos	Desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de inmersión de las semillas (minutos)
T1	Hipoclorito de sodio	50	5
T2	Hipoclorito de sodio	50	10
T3	Peróxido de hidrógeno	2	5
T4	Peróxido de hidrógeno	2	10

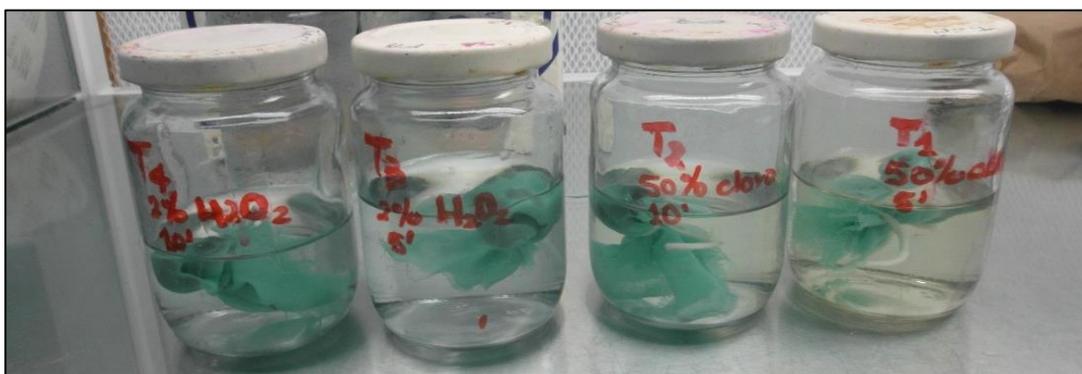


Figura 11. Proceso de desinfección de la semilla de *C. officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016

3.2.4. Inoculación *in vitro* de las semillas y condiciones ambientales de incubación

La inoculación *in vitro* de las semillas de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones completamente asépticas dentro de la cámara de flujo laminar (Figura 12), se sembró 2 semillas en 60 tubos de ensayo, dando un total de 120 semillas (Figura 13).

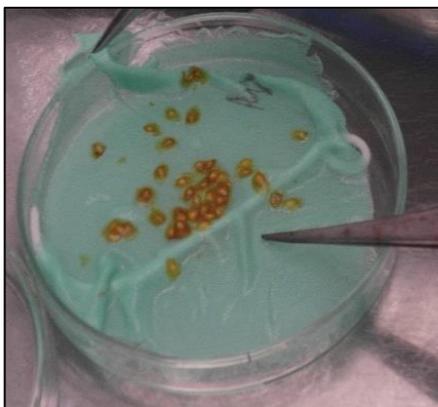


Figura 12. Semillas de *Cinchona officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.



Figura 13. Siembra de las semillas de *C. officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

Se identificó cada tubo según el tratamiento y se procedió a ubicarlos en el cuarto de luces o cuarto de incubación, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 14).



Figura 14. Identificación de los tubos de ensayo y colocados en el cuarto de luces para su incubación. Gonzalez y Minchala, Loja-2016.

3.2.5. Diseño experimental

Se utilizó un diseño complementa al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones.

ELEMENTOS	CONCENTRACIONES
A. Soluciones desinfectantes.	Hipoclorito de sodio 50 % - NaClO (A1) Peróxido de hidrógeno 2 % - H ₂ O ₂ (B1)
B. Tiempo de inmersión (min).	05 min (M1) 10 min (M2)

En el Cuadro 3, se muestran los tratamientos que se aplicó en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., usando hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno en diferentes tiempos de inmersión.

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la desinfección de semillas de *C. officinalis* L.

TRATAMIENTO (T)	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
T1	50 % NaClO + 5 min. de inmersión	T1: A1M1
T2	50 % NaClO + 10 min. de inmersión	T2: A1M2
T3	2 % H ₂ O ₂ + 5 min. de inmersión	T3: B1M1
T4	2 % H ₂ O ₂ + 10 min. de inmersión	T4: B1M2

3.2.5.1. Especificaciones del Diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	5
Número de tratamientos	4
Numero de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de unidades experimentales del ensayo	12
Numero de semillas por unidad experimental	10
Número total de semillas	120
Número total de tubos de ensayo	60

3.2.6. Unidad experimental y variables evaluados

La unidad experimental fue el conjunto de cinco tubos de ensayo, conformada por 30 semillas en cada tratamiento, a razón de 2 semillas por tubo, dando un total de 120 semillas. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 75 días, cada 3 días después de realizada la siembra *in vitro*. Las variables que se evaluó fueron:

porcentaje de contaminación, número de días a la contaminación, porcentaje de germinación y número de días a la germinación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Hoja de registro para la toma de datos de las variables porcentaje de contaminación y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L.

Ensayo:													
Fecha de siembra:# de semillas /tubo de ensayo:													
Variable:													
# Tratamiento	Repetición	# tubos de ensayo	Días								Total	%	Observaciones
			3	6	9	12	15	18			
T _n	R1	F1											
		F2											
		F3											
		F4											
		F5											
	R2	..											
		..											
		..											
	R3	..											
		..											
		F15											

3.2.7. Hipótesis del modelo

H₀. La utilización de dos desinfectantes hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno en diferentes tiempos de inmersión, no permiten controlar la contaminación de las semillas de *Cinchona officinalis* L., inoculadas *in vitro*.

H_i. La utilización de dos desinfectantes hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno en diferentes tiempos de inmersión, permiten controlar la contaminación de las semillas de *Cinchona officinalis* L., inoculadas *in vitro*.

3.2.8. Análisis estadístico de datos de desinfección y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L.

Para evaluar el efecto de los desinfectantes en diferentes tiempos de inmersión de las semillas de *Cinchona officinalis* L., se manipularon los datos de las diferentes variables

evaluadas y el software InfoStat versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016); se realizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.3. Metodología para determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

El objetivo de este ensayo, fue determinar el balance hormonal adecuado de auxinas: 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y citoquininas: BAP (Benzilaminopurina), en diferentes concentraciones (Cuadro 5), con el propósito de inducir la formación de callos de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Cuadro 5. Diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callos de la especie de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES (mg/l)	
	2,4-D	BAP
T1	1,0	0
T2	2,0	0
T3	3,0	0
T4	1,0	0,5
T5	2,0	0,5
T6	3,0	0,5

Adicionalmente, se probó el 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y KIN (Kinetina) en distintas concentraciones (Cuadro 6), con el fin de inducir la formación de embriones a partir de callos de *Cinchona officinalis* L.

Cuadro 6. Distintas concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de embriones somáticos de la especie de *C. officinalis* L.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES (mg/l)		
	Sin Hormonas	2,4-D	KIN
T1	0	0	0
T2	0	0,1	0
T3	0	0,1	0,5

3.3.1. Fase de inducción de callos

3.3.1.1. Obtención y selección de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Para esta fase, como explantes se utilizó los segmentos nodales con sus hojas a partir de las vitroplantas de una altura promedio de 4 cm.

3.3.1.2. Preparación del medio de cultivo

Se elaboró el medio de cultivo con las sales minerales de MS, suplementado con tiamina 1mg/l, mio-inositol 100 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 2 mg/l, glicina 1 mg/l, y, ergostin 1,5 ml/l, sacarosa al 2, 0 % como fuente de carbohidratos, agar 0,6 %; también se adicionó auxinas: 2,4-D y citoquininas: BAP, en diferentes concentraciones. Se ensayó seis tratamientos con tres repeticiones cada uno (Cuadro 5). El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con NaOH 1N o HCL 1N.

Se distribuyó el medio de cultivo en los 90 frascos de vidrio, aproximadamente la cantidad de 25 ml en cada uno, luego fue esterilizado en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos, conjuntamente con todo el material de vidriería, disección y fungible, listos para la siembra *in vitro*.

3.3.1.3. Desinfección de explantes

Los segmentos nodales provenientes de vitroplantas, no recibieron tratamiento alguno de desinfección, por ser material aséptico.

3.3.1.4. Siembra *in vitro* y condiciones ambientales de incubación

La inoculación *in vitro* de los segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones completamente asépticas dentro de la cámara de flujo laminar; para ello, con la ayuda de un bisturí y unas pinzas se eliminó las partes necrosadas, y, luego, sobre una caja petri se disecciono el material vegetal con el fin de obtener los segmentos nodales, los cuales se constituían de un par de hojas con parte de tallo (Figura 15); sembrándose 2 explantes por frasco (Figura 16).



Figura 15. Explantes diseccionados de *Cinchona officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

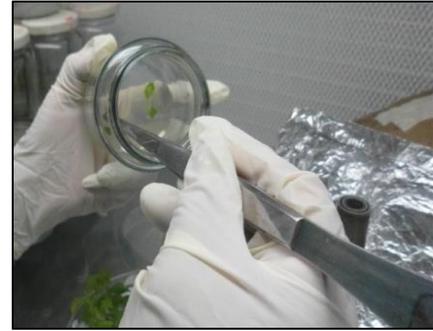


Figura 16. Siembra *in vitro* de los segmentos nodales de *C. officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

Se identificó los frascos y se procedió a ubicarlos en el cuarto de incubación o luces, donde se mantuvieron a una la temperatura de $\pm 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en total oscuridad (Figura 17).



Figura 17. Identificación de los frascos y colocados en el cuarto de luces para su incubación. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

3.3.1.5. Diseño experimental para la fase de inducción de callos

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 6 tratamientos y 3 repeticiones.

HORMONAS	CONCENTRACIONES
A. Nivel de concentración de Auxinas (2, 4-D)	1 mg/l
	2 mg/l
	3 mg/l
B. Nivel de concentración de Citoquininas (BAP)	0,5 mg/l

En el Cuadro 7, se muestra los tratamientos realizados en la interacción hormonal auxinas – citoquininas en la inducción de callos, a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

Cuadro 7. Tratamientos que se evaluó la interacción auxinas – citoquininas en la inducción de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO (T)	CONCENTRACIÓN	CÓDIGO
T1	1,0 mg/l 2, 4-D	T1: 1 (2, 4-D)
T2	2,0 mg/l 2, 4-D	T2: 2 (2, 4-D)
T3	3,0 mg/l 2, 4-D	T3: 3 (2, 4-D)
T4	1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP	T4: 1 (2, 4-D + BAP)
T5	2,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP	T5: 2 (2, 4-D + BAP)
T6	3,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP	T6: 3 (2, 4-D + BAP)

a. Especificaciones del diseño experimental.

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	6
Numero de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de unidades experimentales del ensayo	18
Numero de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes del ensayo	180
Número total de frascos	90

3.3.1.6. Unidad experimental y variables a evaluar

La unidad experimental constó de un conjunto de cinco frascos, conformado por 30 segmentos nodales en cada tratamiento, a razón de 2 explantes por frasco, dando un total de 180 explantes. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 80 días, cada 5 días después de realizada la siembra. Los variables que se evaluó fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de mortalidad de explantes, número de días a la formación del callo, porcentaje de formación de callos, color, y, apariencia (Cuadro 8).

Para la evaluación de contaminación y mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L. se tomaron registros cada cinco días durante el lapso de 50 días, a partir de la siembra.

Cuadro 8. Hoja de registro para la toma de datos, en la fase de inducción de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Ensayo: Fecha de siembra: variable # de explantes/frasco:											
Tratamientos (T)	# de Repetición (R)	# de frasco	DÍAS							Total (%)	Observaciones
			5	10	15	n		
Tn	R1	F1									
		F2									
		F3									
		F4									
		F5									
	R2	..									
		..									
		..									
	R3	..									
		..									
		F15									
FORMACIÓN DE CALLO: - = 0 % Sin formación += 25 %: pobre (formado en ¼ del explante) ++= 50 %: regular (formado en ½ del explante) +++= 75 %: bueno (formado en ¾ del explante) ++++ = 100 %: muy bueno (formado en todo el explante).					COLOR:  CR= Crema C= Carmelita o marrón			APARIENCIA: H= Homogénea NH= No Homogénea T= Traslucido NT= No translucido - no deja pasar la luz			

3.3.1.7. Hipótesis del modelo

Ho: La aplicación de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones, no promueven la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

Hi: La aplicación de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones, promueven la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

3.3.1.8. Análisis estadístico de datos de inducción de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

Para evaluar el efecto hormonal de auxinas: 2,4-D y citoquininas: BAP en la fase de inducción de callos, se manipularon los datos de las diferentes variables evaluadas y el

software InfoStat versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016); se realizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.3.2. Fase de inducción de embriones somáticos

Independientemente del medio en que se cultivaron los callos, y debido a la presencia de embriones, se cambió a un nuevo medio de cultivo de MS, suplementado con 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y KIN (Kinetina) en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,5 mg/l respectivamente; con el propósito de inducir la formación de embriones. Así mismo, se realizó el mismo procedimiento descrito en la fase de inducción de callos en lo referente a la desinfección de explantes, puesto que, por provenir de material aséptico no recibieron ningún tratamiento de desinfección.

3.3.2.1. Obtención y selección de callos de *Cinchona officinalis* L.

Para la inducción de embriones somáticos se utilizó material proveniente de la fase de inducción de callos.

3.3.2.2. Preparación del medio de cultivo sólido

Se elaboró el medio de cultivo con las sales minerales de MS, suplementado con tiamina 1mg/l, mio-inositol 100 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 2 mg/l, y, glicina 1 mg/l), sacarosa al 2,0 % como fuente de carbohidratos, agar 0,6 %; se adicionó auxinas (2,4-D) y citoquininas (KIN), en diferentes concentraciones (Figura 18, Cuadro 9); se ensayó tres tratamientos con tres repeticiones cada uno. Se ajustó el pH a $5,8 \pm 0,2$ con NaOH 1N o HCL 1N (Figura 19).



Figura 18. Elaboración del medio de cultivo sólido. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.



Figura 19. Ajuste del pH óptimo del medio de cultivo. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

Se distribuyó el medio de cultivo sólido en 45 frascos de vidrio, aproximadamente la cantidad de 25 ml en cada uno, luego fue esterilizado en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos.

3.3.2.3. Inoculación y condiciones ambientales de incubación

La inoculación *in vitro*, de callos de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones completamente asépticas dentro de la cámara de flujo laminar (Figura 20); se sembró 2 explantes por frasco (Figura 21), luego se los ubico en el cuarto de incubación o cuarto de luces, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 20. Formación de callos de *Cinchona officinalis* L. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.



Figura 21. Siembra *in vitro* de callos, según tratamientos. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

3.3.2.4. Diseño experimental para la fase de inducción de embriones

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 3 tratamientos y 3 repeticiones.

HORMONAS	CONCENTRACIONES
A. Sin Hormonas	0,0 mg/l
B. Auxinas (2, 4-D)	0,1 mg/l
C. Citoquininas (KIN)	0,5 mg/l

En el Cuadro 9, se muestra la descripción respectiva de los tres tratamientos evaluados, en la fase de inducción de embriones somáticos, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Cuadro 9. Descripción de los tres tratamientos para la inducción de embriones somáticos a partir de callos de *C. officinalis* L.

TRATAMIENTO (T)	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
T1	Sin Hormonas	T1: SH
T2	0,1 mg/l de 2, 4-D	T2: 2, 4-D
T3	1,0 mg/l de 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN	T3: 2, 4-D + KIN

a. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	3
Numero de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de unidades experimentales del ensayo	9
Numero de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes del ensayo	90
Número total de frascos	45

3.3.2.5. Unidad experimental y variables evaluadas

La unidad experimental fue el conjunto de cinco frascos, conformado por 30 callos en cada tratamiento, se sembró 2 callos por frasco, dando un total de 90 explantes. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 90 días, cada 5 días después de realizada la siembra. Los variables que se evaluó fueron: porcentaje de contaminación, número de días a la contaminación, y, porcentaje de formación de embriones (Cuadro 10). Cabe recalcar que, para la evaluación de la variable contaminación, se tomaron registros por un lapso de 30 días, a partir de la siembra.

Cuadro 10. Hoja de registro para la toma de datos de las variables contaminación y formación de embriones a partir de callos de *Cinchona officinalis* L.

Ensayo: Fecha de siembra: variable # de explantes/frasco:											
Tratamientos (T)	# de Repetición (R)	# de frasco	DÍAS							Total	Observaciones
			0	5	10	15	n		
Tn	R1	F1									
		F2									
		F3									
		F4									
		F5									
	R2	..									
		..									
		..									
	R3	..									
		..									
		F15									
	FORMACIÓN DE EMBRIONES: - = 0 % Sin formación += 25 %: pobre (formado en ¼ del callo) ++= 50 %: regular (formado en ½ del callo) +++= 75 %: bueno (formado en ¾ del callo) ++++ = 100 %: muy bueno (formado en todo el callo)										

3.4. Metodología para difundir los resultados de la investigación.

Para la difusión de los resultados de la investigación se efectuó lo siguiente:

- Se socializó los resultados al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal a través de una exposición magistral.
- Se elaboró un tríptico y un folleto técnico informativo, con el fin de dar a conocer los resultados obtenidos de la presente investigación.
- Se elaboró un artículo científico denominado: Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., Loja, Ecuador, con el fin de difundir los resultados de la investigación.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.

4.1.1. Porcentaje de contaminación de las semillas a los 30 días

En la fase de implantación o desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., el porcentaje de contaminación fue del 0 % para el T1 (50 % NaClO + 5 min.); T2 (50 % NaClO + 10 min.); T3 (2 % de H₂O₂ + 5 min.); y, T4 (2 % de H₂O₂ + 10 min.). En el Cuadro 11, se observa que, a los 30 días de evaluación en los cuatro tratamientos, se logró obtener un 100 % de semillas libres de contaminantes (vitropatógenos: hongos, bacterias y levaduras).

Cuadro 11. Registro del porcentaje de contaminación de semillas de *C. officinalis* L.

Tratamiento	N° de días										Total
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4.1.2. Porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L.

En este ensayo se logró la germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados (Anexo 5); a los 75 de evaluación el T1 y T3 obtuvieron el mayor porcentaje de germinación con el 86,67 % y 80,00 % respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resumen del porcentaje de germinación de semillas de *C. officinalis* L.

Tratamiento	N° de días													Total
	3	9	15	21	27	33	39	45	51	57	63	69	75	
T1	0,00	0,00	23,33	46,67	56,67	63,33	76,67	83,33	83,33	86,67	86,67	86,67	86,67	86,67
T2	0,00	0,00	40,00	53,33	56,67	63,33	63,33	66,67	66,67	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
T3	0,00	0,00	13,33	36,67	53,33	60,00	70,00	70,00	73,33	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
T4	0,00	0,00	0,00	13,33	16,67	16,67	20,00	26,67	33,33	40,00	43,33	46,67	46,67	46,67

Según el análisis de varianza existe diferencia estadística entre tratamientos con un p-valor de 0,0580; y según la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % si arroja rangos

de significación: en el rango A, se encuentra el T1 y T3 que presentaron los porcentajes más elevados de semillas germinadas; mientras que el T4 con el menor porcentaje de germinación (46,67 %) se encuentra en el rango B (Figura 22; Anexo 1).

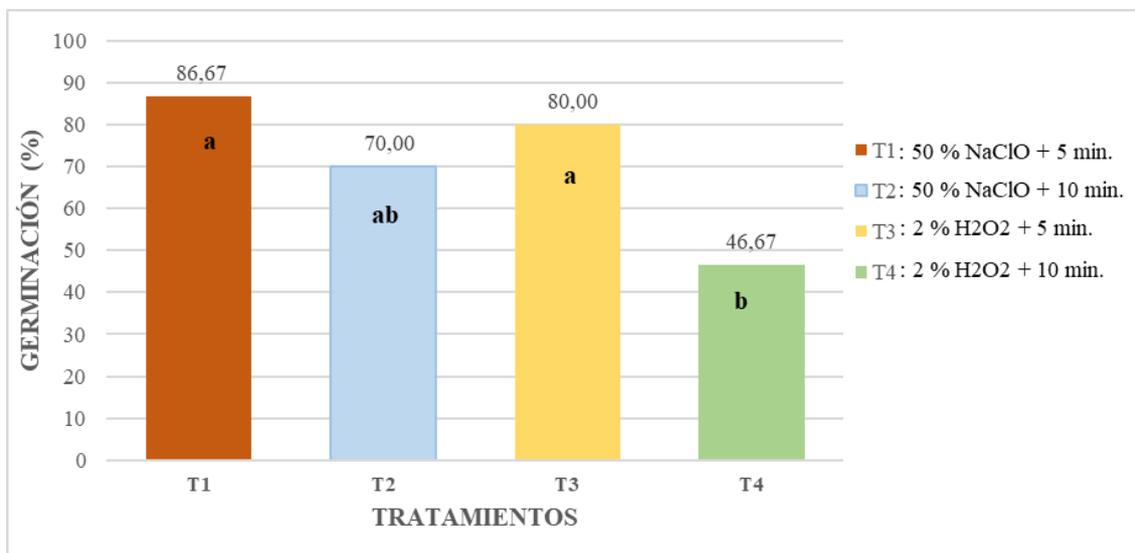


Figura 22. Porcentaje promedio de germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.1.3. Número de días a la germinación

La germinación *in vitro* de las semillas empezó a los 15 días para el tratamiento T1, T2 y T3 con porcentajes de 23,33 %; 40,00 %; 13,33 %, estabilizándose a los 57 días con porcentajes de 86,67 %; 70,00 %; 80,00 %, durante el tiempo de evaluación; mientras que en el T4 se inició a los 21 días de instalado el ensayo con un porcentaje de germinación de 13,33 %, estabilizándose a los 66 días con un porcentaje 46,67 %, durante el tiempo de evaluación (Cuadro 12). En la Figura 23, se observa la curva de germinación acumulativa de cada uno de los tratamientos durante la investigación.

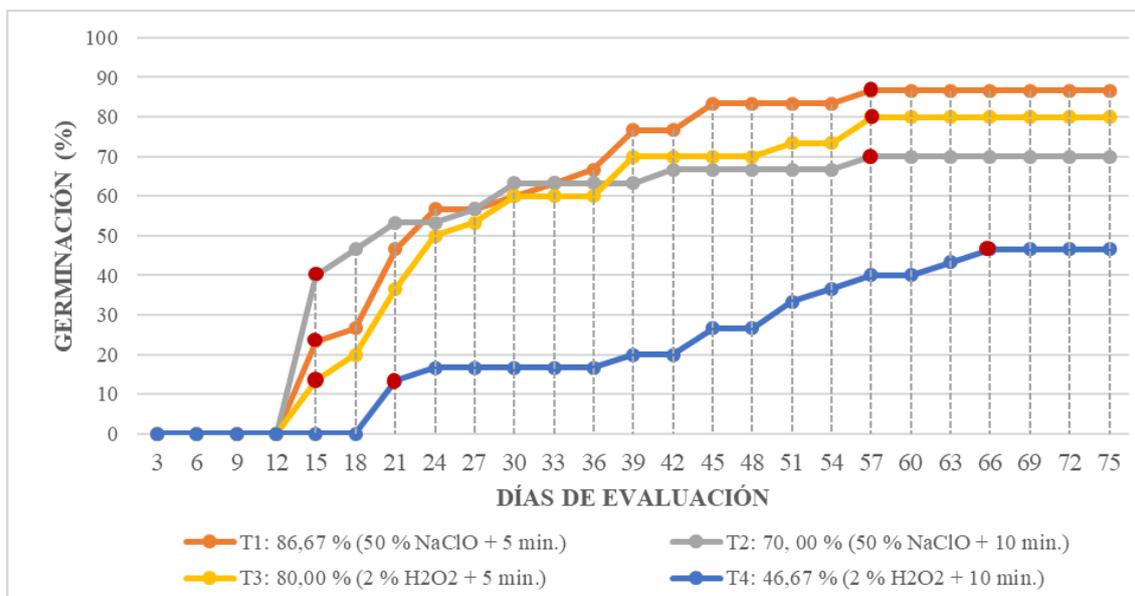


Figura 23. Curva de germinación acumulativa de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.2. Determinación del balance hormonal adecuado en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

4.2.1. Fase de inducción de callos

4.2.1.1. Porcentaje de contaminación de explantes

Los segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., provenientes de vitroplantas, no recibieron desinfección, por ser material aséptico; sin embargo, el T2 presentó el 6,67 % de contaminación en el medio de cultivo (Figura 24); en los tratamientos T1, T3, T4, T5 y T6, no se presentó contaminación alguna durante los 50 días de evaluación (Cuadro 13).

Cuadro 13. Registro del porcentaje de contaminación de explantes de *C. officinalis* L.

Tratamientos	N° de días										Total
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	
T1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
T3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Figura 24. Contaminación de explantes (segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L. Gonzalez y Minchala. Loja-2017.

4.2.1.2. Porcentaje de mortalidad de explantes

En lo que respecta a la variable porcentaje de mortalidad, el T3 obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de explantes con el 60, 00%; en comparación al T6 que obtuvo el menor porcentaje con el 3,33 % (Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de mortalidad de segmentos nodales de *C. officinalis* L.

Tratamientos	N° de días										Total
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	
T1	0,00	0,00	3,33	16,67	26,67	30,00	36,67	43,33	43,33	43,33	43,33
T2	0,00	0,00	6,67	23,33	36,67	46,67	53,33	53,33	53,33	53,33	53,33
T3	0,00	0,00	3,33	23,33	43,33	56,67	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
T4	0,00	0,00	3,33	10,00	20,00	26,67	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
T5	0,00	0,00	0,00	6,67	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33
T6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33

Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,0457 (Anexo 2), donde el T3 presentó el mayor porcentaje de mortalidad de explantes, en comparación a los tratamientos T5 y T6 que presentaron una mortalidad de 13,00 % y 3,33 % (Figura 25).

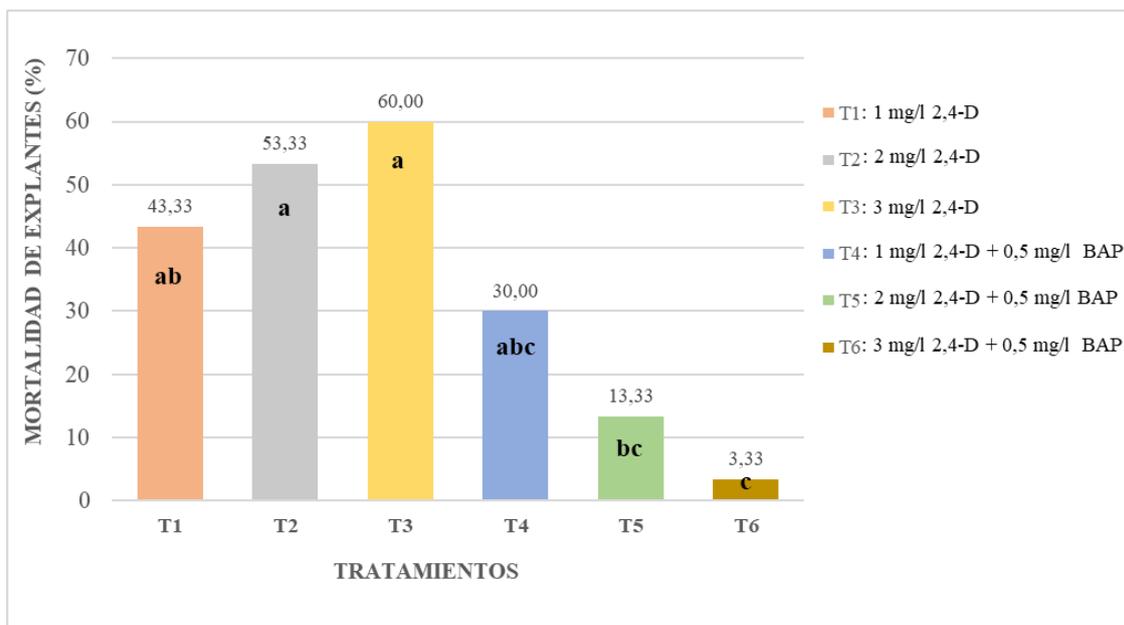


Figura 25. Porcentaje promedio de mortalidad de explantes de *C. officinalis* L., en la fase de inducción de callos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.2.1.3. Número de días a la mortalidad de explantes

La aparición de mortalidad se evidenció a los 15 días para el tratamiento T1, T2, T3 y T4 con porcentajes de 3,33 %; 6,67 %; 3,33 %; y 3,33 %, estabilizándose a los 40 y 35 días con valores de 43,33 %; 53,33 %; 60,00 %; y 30,00 %; en el T5 a los 20 días de la siembra presentó un porcentaje de mortalidad del 6,67 %, estabilizándose a los 25 días con un porcentaje de 13,33; y, finalmente el T6 a los 30 días de evaluación presentó un porcentaje de 3,33 % valor que se mantuvo durante el tiempo de evaluación (Figura 26, Cuadro 14).

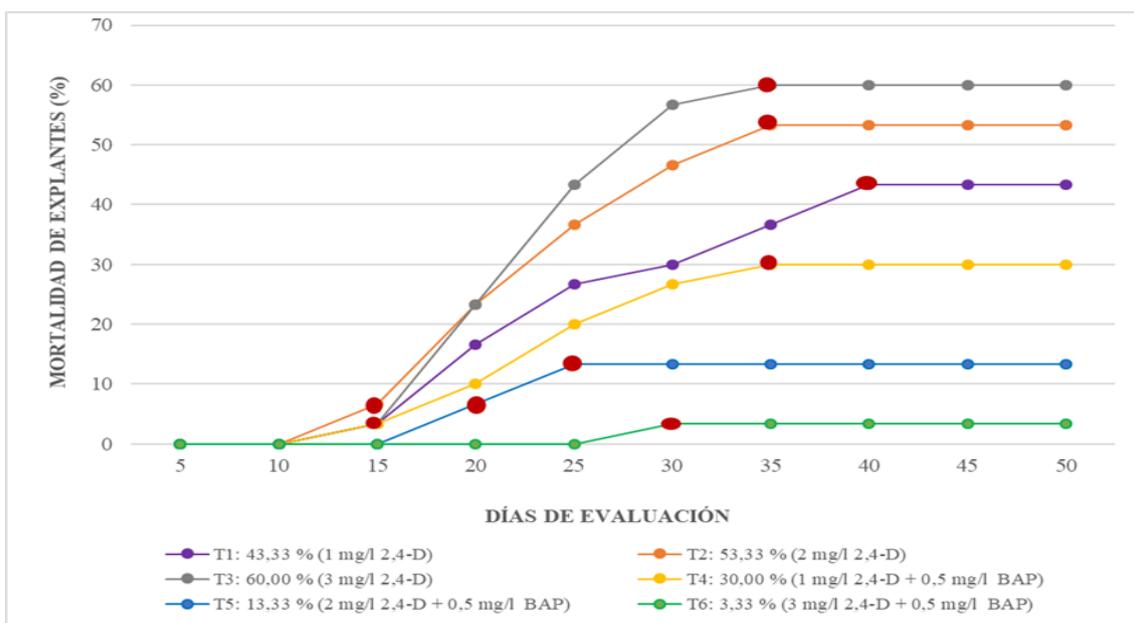


Figura 26. Días a la mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L., en la fase de inducción de callo.

4.2.1.4. Porcentaje de formación de callos

En este ensayo se logró la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados (Figura 28); a los 80 días de evaluación el T4 alcanzó el mayor porcentaje de formación de callos con el 65,00 %; seguido del T6 con un porcentaje de 53,33 %; en comparación al T3 que presentó el menor porcentaje de formación de callo con un valor de 13,33 % (Cuadro 15).

Cuadro 15. Registro del porcentaje de formación de callos, a partir de segmentos nodales de *C. officinalis* L.

Tratamiento	N° de días																Total
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	
T1	0,00	0,00	13,33	20,00	30,00	38,33	38,33	38,33	40,00	41,00	46,33	45,00	45,00	50,00	51,67	51,67	51,67
T2	0,00	0,00	15,00	16,67	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67
T3	0,00	0,00	10,00	11,67	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33
T4	0,00	0,00	18,33	23,33	35,00	36,67	43,33	45,00	45,00	46,67	59,33	62,67	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
T5	0,00	0,00	10,00	20,00	31,67	31,67	36,67	36,67	45,00	45,00	45,00	46,00	47,00	47,67	48,33	48,33	48,33
T6	0,00	0,00	20,00	25,00	30,00	31,67	40,00	41,67	41,67	43,33	47,67	49,33	50,33	50,33	50,33	53,33	53,33

Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,0173 (Figura 27, Anexo 3).

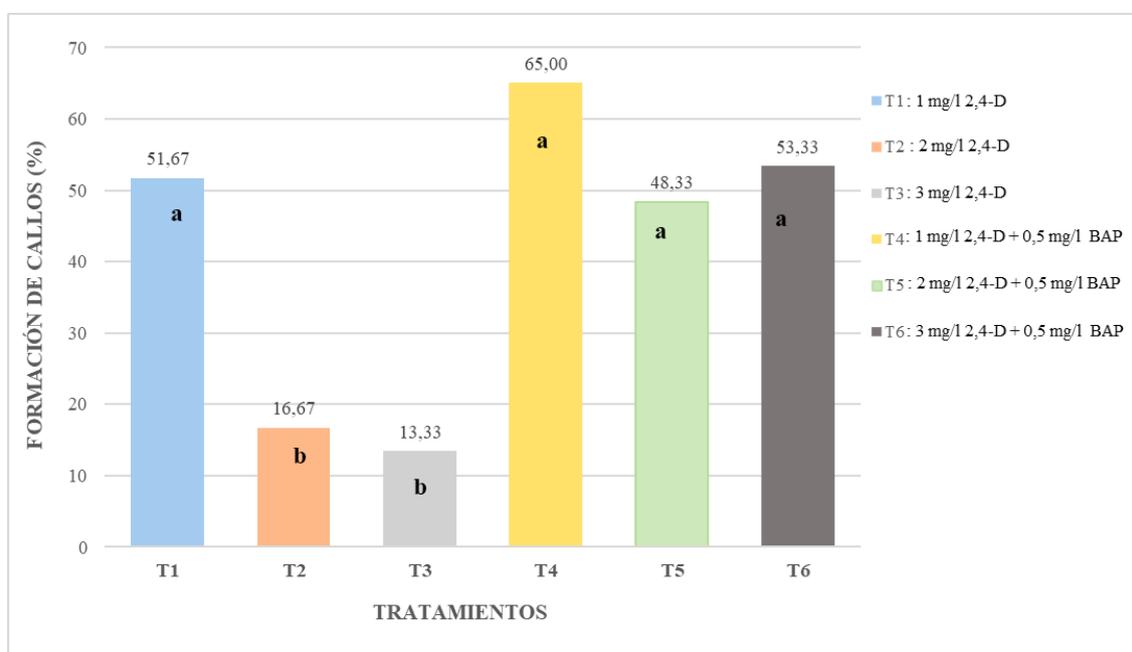


Figura 27. Porcentaje promedio de formación de callo a partir de explantes de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

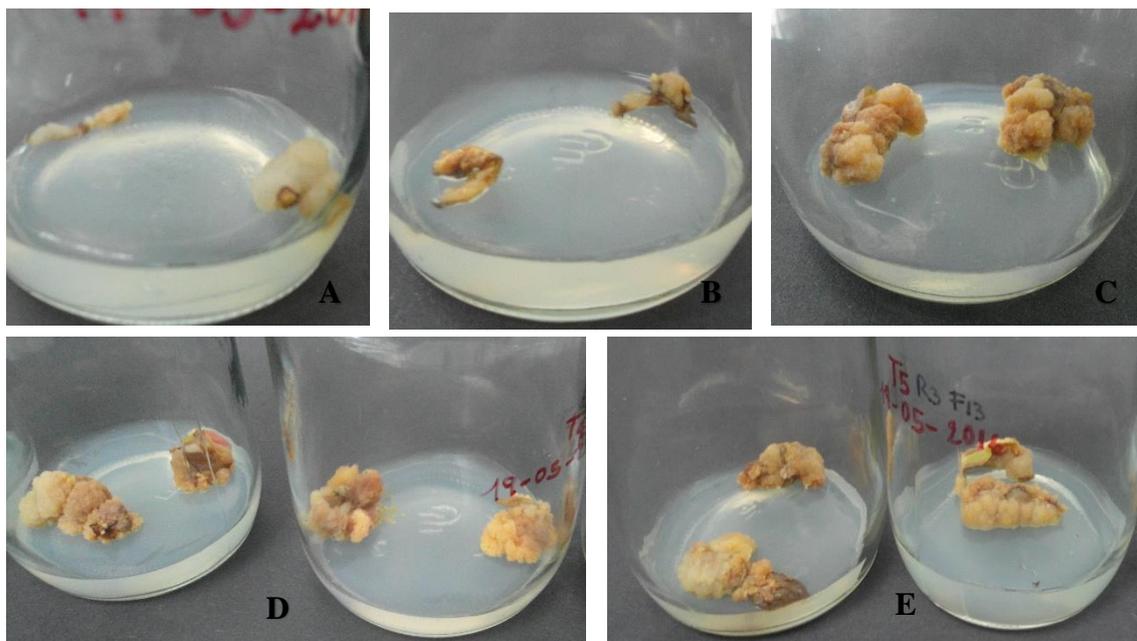


Figura 28. Formación de callos a partir de segmentos nodales de *C. officinalis* L. A. Callos obtenidos del T1 (1,0 mg/l 2, 4-D). B. Callos obtenidos del T2 (2,0 mg/l 2, 4-D). Callos obtenidos del T3 (3,0 mg/l 2, 4-D). Callos obtenidos del T4 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP). Callos obtenidos del T5 (2,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP) a los 80 días de evaluación. Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

4.2.1.5. Número de días a la formación del callo

La formación de callos inició a los 15 días de evaluación para el tratamiento T1, T2, T3, T4, T5, y T6 con porcentajes de 13, 33 %; 15,00 %; 10,00 %; 18,33 %; 10,00 %; y, 20, 00 %. El tratamiento T1 y T5 se estabilizaron a los 75 días de evaluación con porcentajes de 51,67 % y 48,33 %; el tratamiento T4 se estabilizó a los 65 días con un valor de 65,00%; el tratamiento T2 se estabilizó a los 55 días de evaluación con un porcentaje de 16,67 %; el tratamiento T3 se estabilizó a los 25 días de establecido el ensayo con un porcentaje de 13,33; y finalmente, el tratamiento T6 se estabilizó a los 65 días con valor de 53,33 % (Figura 29).

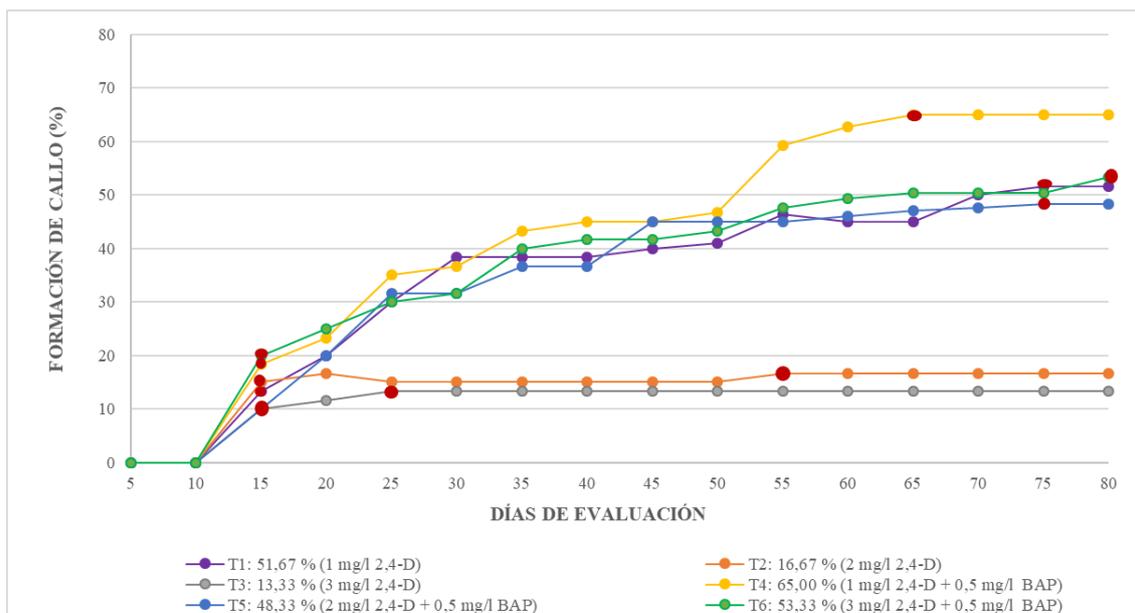


Figura 29. Días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1.6. Color del callo a los 80 días de evaluación

En el Cuadro 16, se muestra que a los 80 días de evaluación los callos obtenidos presentaron coloraciones distintas.

Cuadro 16. Registro de la variable color en la inducción de callos de *C. officinalis* L.

Tratamiento	N° de explantes que formaron callo	N° de explantes de color		Porcentaje de explantes de color (%)		
		Carmelita (C)	Crema (Cr)	Carmelita (C)	Crema (Cr)	Total
T1	17	13	4	76	24	100
T2	14	14	0	100	0	100
T3	12	12	0	100	0	100
T4	21	17	4	81	19	100
T5	26	24	2	92	8	100
T6	29	29	0	100	0	100

En la Figura 30, se observa que el tratamiento T2, T3 y T6 obtuvieron el más alto porcentaje de callos de color carmelita con el 100 % (callos no friables); en comparación a los demás tratamientos que obtuvieron dos tipos de tonalidades, el T5 obtuvo un 92 % de callos de coloración carmelita y un 8 % de coloración crema (callos friables), el T4 con el 81 % de color carmelita y 19 % color crema (Cr), y finalmente el T1 con el 76 % y 24 % (Figura 31 C, D, E). Cabe mencionar que todos los callos adquirieron una misma coloración en los primeros días de evaluación (Figura 31 A, B).

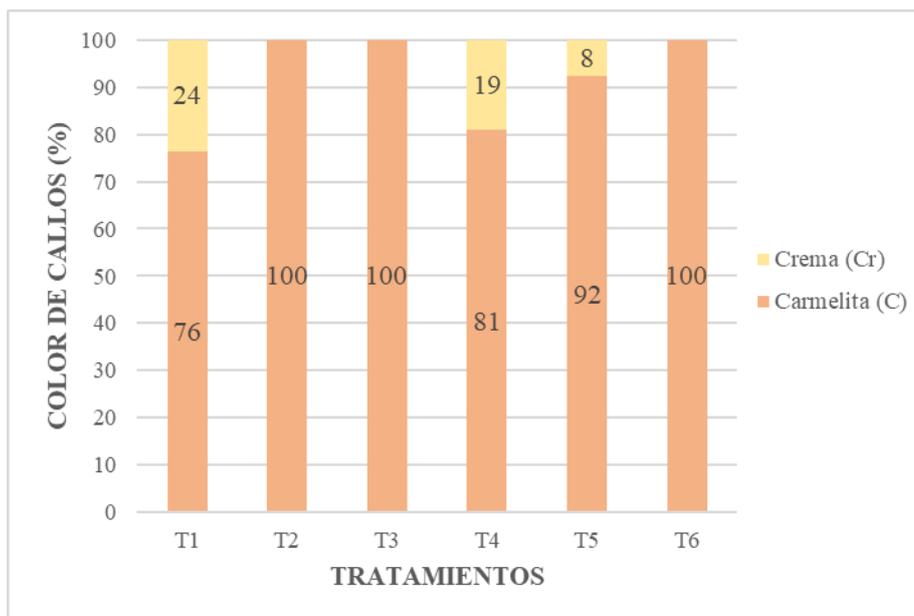


Figura 30. Color del callo a los 80 días de evaluación.

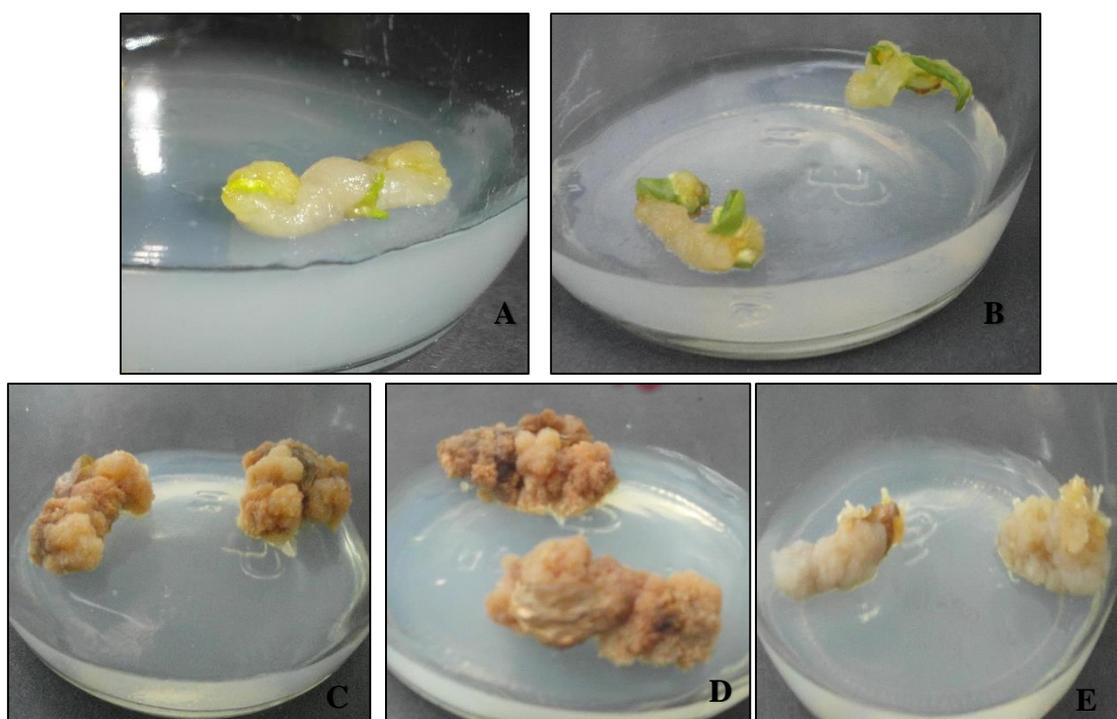


Figura 31. Formación de callos. A, B. Callos de color crema, apariencia homogénea- traslucido, (en los primeros días de evaluación); C, D. Callos de color carmelita, apariencia no homogénea- no traslucido, que no deja pasar la luz (a los 80 días de evaluación); E. Callos de color crema, apariencia homogénea- traslucido (a los 80 días de evaluación). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

4.2.1.7. Apariencia del callo a los 80 días de evaluación

En el Cuadro 17, se muestra que a los 80 días de evaluación los callos obtenidos presentaron una apariencia distinta.

Cuadro 17. Registro de la variable apariencia en la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L.

Tratamiento	N° de explantes que formaron callo	N° de callos con apariencia		Porcentaje de explantes con apariencia (%)		
		Homogénea-Traslucido (H-T)	No Homogénea – No Traslucido (NH-NT)	Homogénea - Traslucido (H-T)	No Homogénea – No Traslucido (NH-NT)	Total
T1	17	4	13	24	76	100
T2	14	0	14	0	100	100
T3	12	0	12	0	100	100
T4	21	4	17	19	81	100
T5	26	2	24	8	92	100
T6	29	0	29	0	100	100

En la Figura 32, se observa que el tratamiento T2, T3 y T6 obtuvieron el más alto porcentaje de callos con apariencia no homogénea - no traslucido (NH-NT) con el 100 %; mientras que en los restantes tratamientos los callos obtuvieron dos tipos de apariencia, el T5 obtuvo un 92 % de callos con apariencia NH-NT y un 8 % con apariencia homogénea - traslucido (H-T), el T4 con el 81 % con apariencia NH-NT y 19 % con apariencia H-T, y finalmente el T1 con el 76 % y 24 % (Figura 31 C, D, E). Cabe aludir que en los primeros días de evaluación los callos adquirieron una apariencia homogénea – traslucido, es decir, que deja pasar la luz (Figura 31 A, B).

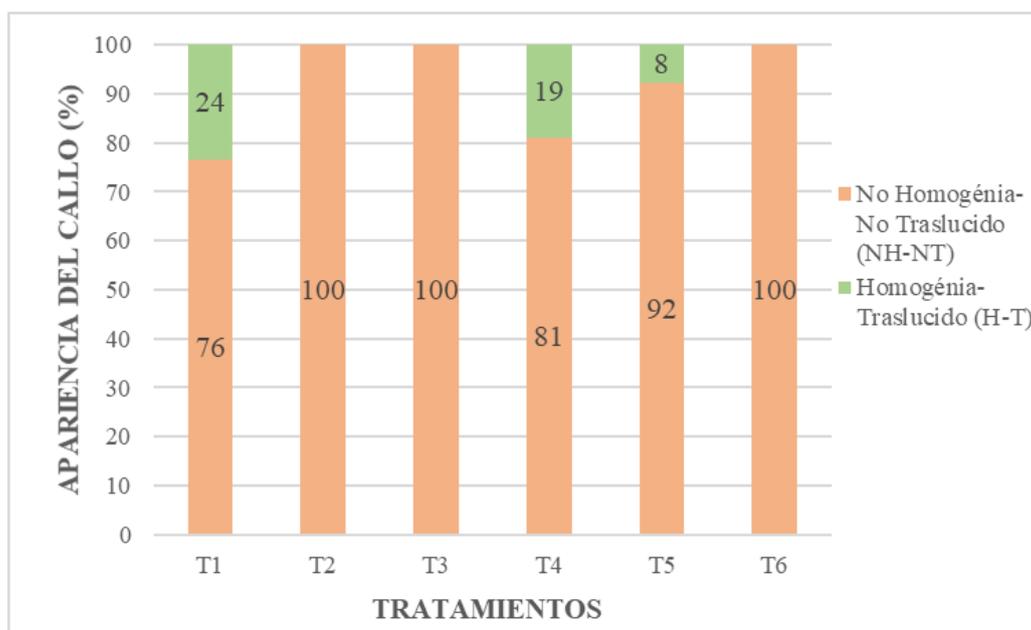


Figura 32. Apariencia de los callos a los 80 días de evaluación.

4.2.2. Fase de inducción de embriones

Independientemente del tratamiento en que se cultivaron y con el fin de aumentar la tasa de formación de embriones, los callos con o sin embriones se transfirieron a otro medio de cultivo.

4.2.2.1. Porcentaje de contaminación.

No se registró ningún porcentaje de contaminación para el T1: Sin Hormonas, T2: 0,1 mg/l de 2, 4-D; y, T3: 1,0 mg/l de 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN, ya que, el material (callo) que se utilizó fue aséptico.

4.2.2.2. Porcentaje de formación de embriones somáticos

En este ensayo se logró la formación de embriones somáticos de *C. officinalis* L., con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados (Figura 34); a los 90 días de evaluación el T3 alcanzó el mayor porcentaje con 28,33 %; seguido del T2 con un porcentaje de 17,00 %; en comparación al T1 que presentó el menor promedio de formación de embriones con un valor de 15,00 % (Cuadro 18). Por otro parte, en el T3 a los 80 días de evaluación, se obtuvo la formación de dos hojas, tal como se muestra en la Figura 35, C2.

Cuadro 18. Registro del porcentaje de formación de embriones somáticos a partir de callos de *C. officinalis* L.

Trata- mientos	N° de días																			Total
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	
T1	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	3,00	3,00	6,33	7,00	7,00	7,00	9,00	10,67	11,00	12,33	14,67	15,00	15,00	15,00
T2	2,67	2,67	2,67	2,67	3,33	4,00	4,00	4,67	6,33	8,67	10,33	10,00	11,33	12,00	13,00	15,00	17,00	17,00	17,00	17,00
T3	2,67	3,00	3,67	4,00	5,00	5,33	7,33	8,00	11,00	11,67	12,33	13,33	14,00	17,33	20,00	23,33	28,33	28,33	28,33	28,33

Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % no existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,1072 (Figura 33, Anexo 4).

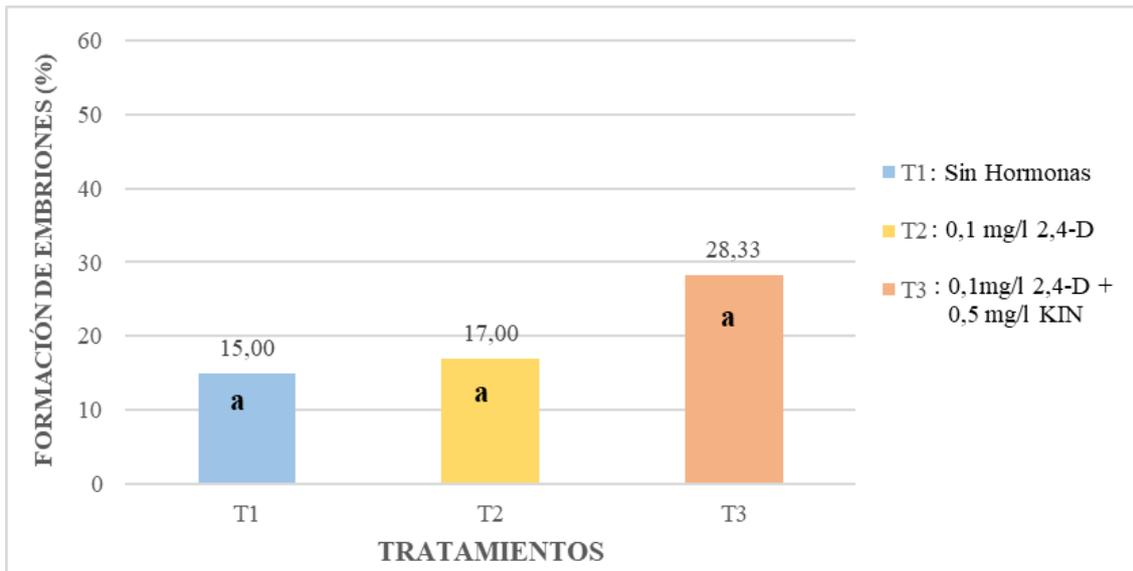


Figura 33. Porcentaje promedio de formación de embriones, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

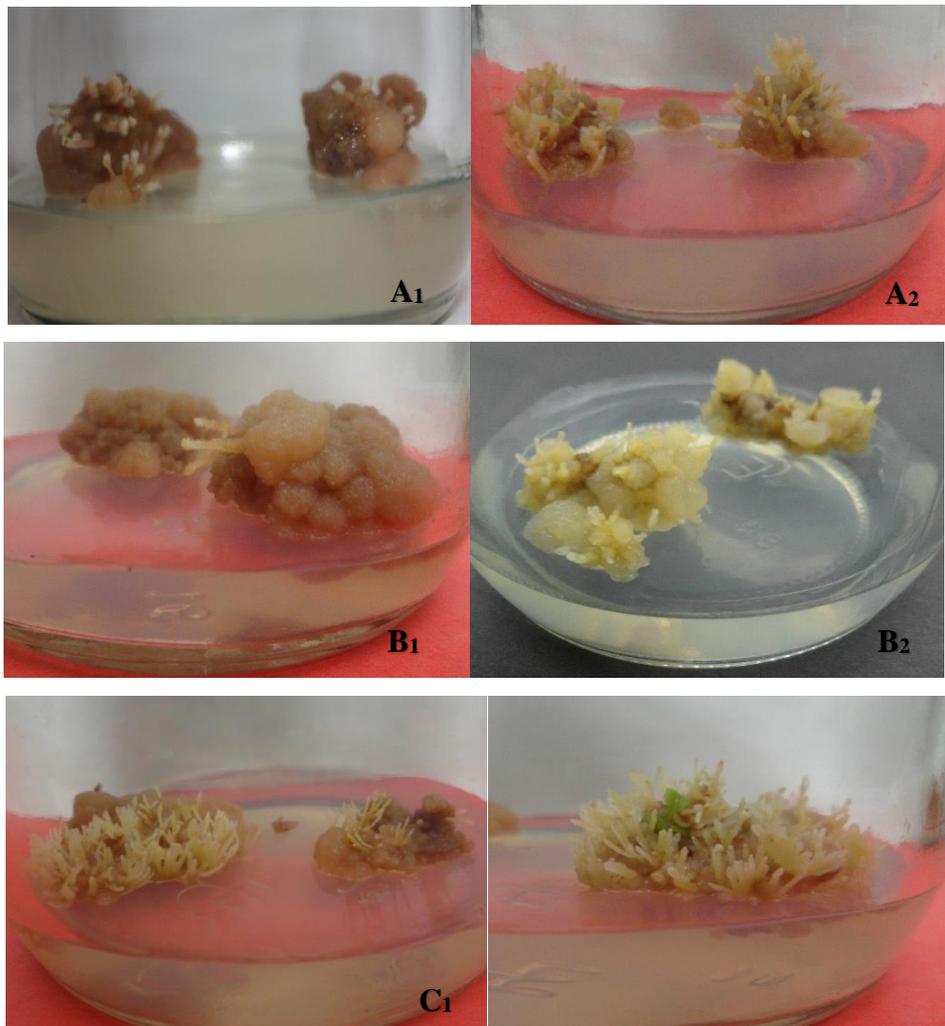


Figura 34. Formación de embriones a partir de callos de *C. officinalis* L. A1, A2. Embriones obtenidos del T1 (Sin hormonas). B1, B2. Embriones obtenidos del T2 (,1 mg/l 2, 4-D). C1, C2. Embriones obtenidos del T3 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

4.2.2.3. Número de días a la formación de embriones

Debido a que los tratamientos ensayados ya presentaban embriones somáticos (Cuadro 18); el T1 inició con un valor de 1,67 % estabilizándose a los 85 días con un valor promedio de 15,00 %; el T2 inició con el 2,67 %, estabilizándose a los 80 días con un valor de 17,00 %; y, finalmente, el T3 inició con el 2,67 % estabilizándose a los 80 días con un valor promedio de 28,33 % durante el tiempo de evaluación (Cuadro 18, Figura 35).

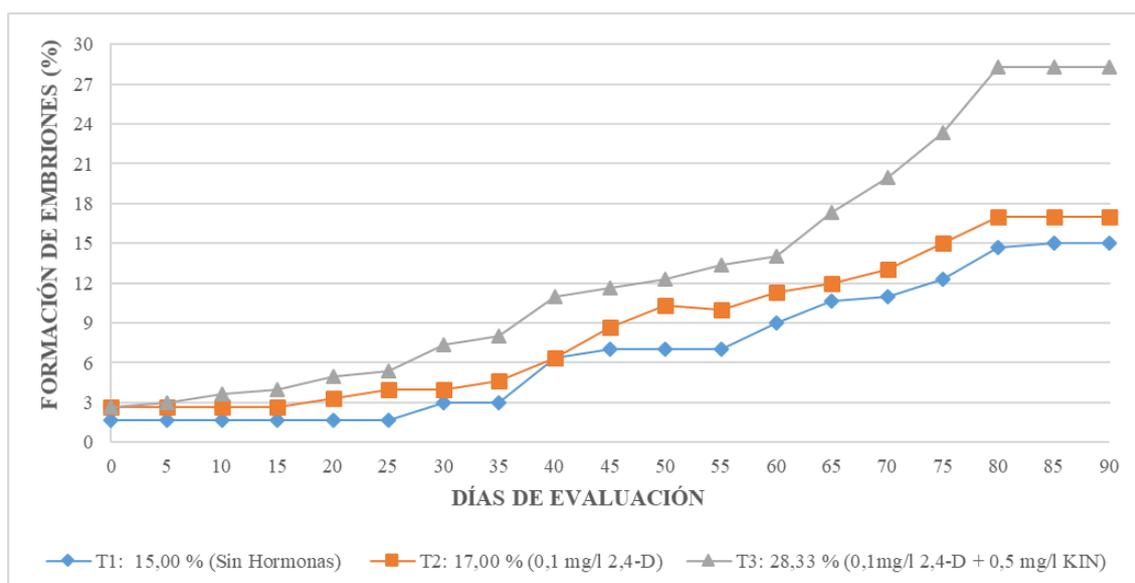


Figura 35. Días a la formación de embriones, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L.

4.3. Difusión de la información generada.

Dada la importancia de información generada sobre este tema, la socialización de los resultados del proyecto de tesis se realizó al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal donde se aportó con algunas recomendaciones para futuras investigaciones con esta especie (Figura 36). Además, se elaboró y entregó un tríptico divulgativo para dar a conocer los resultados de la investigación (Anexo 7).

Finalmente, se elaboró un folleto técnico informativo y un artículo científico de la tesis, con el propósito de difundir la información a actores interesados en la temática para su conocimiento y aplicación.



Figura 36. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico y docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.

La técnica de desinfestación de la semilla para la siembra *in vitro* es una técnica prometedora para inducir rápida germinación y plántulas libres de patógenos (Medel - Narváez, 2000; García et al., 2009). La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; pero en la práctica, generalmente se establecen experimentalmente por ensayo y error (Villalobos & Thorpe, 1991). Entre las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH) y bicloruro de mercurio (HgCl₂); García et al. (2009), menciona que el hipoclorito de sodio ha sido el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores obteniendo buenos resultados en la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes.

En la presente investigación, los tratamientos aplicados en la fase de desinfección de las semillas de *C. officinalis* L.; se demostró que el NaClO y H₂O₂ en diferentes tiempos juegan un papel importante para controlar la contaminación de las semillas, observándose que para el T1 (50 % NaClO + 5 min.), T2: (50 % de NaClO + 10 min.), T3 (2 % de H₂O₂ + 5 min.), y, T4 (2 % de H₂O₂ + 10 min.), presentaron 0 % de contaminación; resultados que se corroboran con los obtenidos por Lima (2016) quien al utilizar concentraciones similares de NaClO (50%) en diferentes tiempos de inmersión (5 min., 10 min., y 15 min) en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., obtuvo 0 % de contaminación. Sin embargo, el mismo autor (Lima, 2016) al utilizar concentraciones bajas de NaClO, obtuvo un porcentaje de 13,33 % de contaminación al aplicar 15 % de NaOCl durante 5 min., y 10 min., y un 6,67 % con el 25 % NaOCl durante 5 min., y 15min.

Con ello se deduce que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio disminuye el porcentaje de contaminación, lo cual concuerda con lo mencionado por Conde (2015); quien al utilizar concentraciones de NaOCl al 50 % disminuyó el porcentaje de contaminación en semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Así mismo, en el presente estudio se evidencio que los tratamientos (T3 y T4) en los que se aplicó H₂O₂ dio buenos resultados con un porcentaje de contaminación de 0 %; demostrando que es un buen agente desinfectante. Varios autores han corroborado esto, ya que al utilizar similares concentraciones de H₂O₂ aplicadas en diferentes especies no obtuvieron ningún porcentaje de contaminación (Flores et al., 2008); demostrando que, a más de tener una efectiva capacidad de esterilización en semillas forestales, también incrementa la germinación de algunas semillas (pino) (Barnett, 1998).

Por otra parte, el efecto de desinfección con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno más la adición de 1,0 mg/l de ácido giberélico (AG₃), sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., se muestra en la Figura 22. El mayor porcentaje de germinación 86,67 % se encontró en las semillas tratadas con hipoclorito de sodio al 50 % durante 5 minutos (T1), y el menor 70,00 % en el T2 con mayor tiempo (10 min.). De acuerdo con estos resultados, se puede decir el porcentaje de germinación es relativamente alto y posiblemente ligado al uso del hipoclorito de sodio durante la desinfección superficial de las semillas de *C. officinalis* L.

Los resultados descritos en el párrafo anterior son similares e incluso mayores o menores a los obtenidos por Lima (2016), quien al utilizar una concentración de NaClO al 50 % mas 1,0 mg/l de AG3 encontró un porcentaje de germinación de 74,44 %; pues, autores como Araya et al., (2000); Rännbäck (2007); Vasudevan & Staden (2010) manifiestan que esto se debe a que el NaClO escarifica la cubierta de las semillas y promueve la germinación de varias especies; también han observado un efecto aditivo con el ácido giberelico o con tratamientos de frío (Watkinson & Pill, 1998). Por ello, se puede observar que a mayor tiempo de inmersión de las semillas en la solución de NaClO se obtiene menor porcentaje de germinación y viceversa.

De igual forma, en un estudio realizado en *C. officinalis* L., por ANACAFE (2004), en el cual utilizaron AG3 en concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/l obtuvieron un porcentaje de germinación de 88,67 % y 83,33 % respectivamente; mientras que, Campos (2014), en estudios realizados en *Cinchona pubescens* obtuvieron valores bajos de germinación con 33,34 %, al utilizar una concentración de 1000 mg/l AG3 y NaClO al 2 % durante 2 minutos; lo que difiere con los resultados obtenidos en la presente investigación.

De igual manera, al aplicar H₂O₂ en tiempos de 5 y 10 minutos, el T3 (2 % de H₂O₂ + 5 min.) obtuvo el valor más alto de germinación con un 80,00 %, resultado que es similar

al alcanzado por Armijos & Pérez (2016) en investigaciones realizadas sobre *C. officinalis* L., con un 72,2 % y 86,7 % de germinación con un fotoperiodo de 12 y 24 horas respectivamente, en la cual utilizo H₂O₂ al 100 % durante 1 minuto. Por el contrario, el porcentaje más bajo de germinación (46,67 %) se logró con la aplicación de 2 % de H₂O₂ durante 10 minutos, valor que se encuentra dentro de los rangos obtenidos (35,6 % y 62,2 % de germinación en un fotoperiodo de 12 y 24 horas respectivamente) por Armijos & Pérez (2016) en *C. pubescens.*, en la cual utilizo H₂O₂ al 100 % durante 1 minuto, la cual llevo a la conclusión de que el peróxido de hidrógeno en *C. pubescens* causó daño a la capa de la semilla y a los embriones. Según Verkhoturov & Frantenko (2006); Bailly et al., (2008); Lu et al., (2013), esto puede deberse a que el peróxido de hidrógeno es un rompedor de la latencia de las semillas o estimulador de la germinación, debido a que incrementa la actividad en el embrión y estimula el proceso de oxidación durante la germinación.

Con ello, se deduce que la aplicación de H₂O₂ al 2 % en tiempos de inmersión bajos, son excelentes para la germinación, y en tiempos de exposición altos aparentemente causo daños en los embriones de las semillas, motivo por el cual se obtuvo menor porcentaje de germinación.

Finalmente, respecto a los días a la germinación *in vitro*, esta se inició a los 15 días en el T1, T2 y T3 estabilizándose a los 57 días de sembradas, dichos resultados son casi similares a los obtenidos por Lima (2016), pues en su investigación, la germinación *in vitro* se inició a los 15 días y se estabilizo a los 45 días.

5.2. Determinación del balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

5.2.1. Fase de inducción de callos

La formación de tejido callogénico en diferentes explantes puede ser estimada por una variedad de auxinas, siendo la más frecuentemente utilizada 2,4-D a diferentes concentraciones, en muchos casos se hace necesario la interacción con una citoquinina para romper el balance hormonal endógeno y estimular una mayor formación de tejido callogénico (Montoya, 1991; Urrea et al., 2001).

En la presente investigación en el ensayo de inducción de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., al combinar 1,0 mg/l de 2,4-D y 0,5 mg/l BAP (T4) resultó la más efectiva, obteniéndose 65,00 % de formación de callos con la combinación de 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP (T4); seguido del T6 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) con 53,33 %; con auxinas solas, se obtuvieron un 51,67 % de formación de callos con una concentración de 1 mg/l 2,4-D (T1), los resultados dependieron de la concentración de auxina/citoquinina empleada. Teniendo en cuenta que de acuerdo al análisis ANOVA para estos tres tratamientos, el porcentaje de formación de callo, no mostró diferencias significativas, pero sí con los otros evaluados (Figura 27). A los 15 días comenzó el proceso de dediferenciación de los tejidos en todos los tratamientos ensayados; así también se visualizó que el callo se inició en la herida y posteriormente se extendió al resto del explante.

Estos resultados son menores a los obtenidos por Félix & Armijos (2006) quienes al utilizar un medio B5 (Gamborg, et al., 1998) combinado con 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP, para la formación de callo a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., obtuvieron un 91,7 %; un 70,00 % en la combinación de 3,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l BAP; y un 56,7 % al utilizar 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP. Es decir, que la interacción entre auxina-citoquininas es fundamental en la formación de tejido callogénico (Artiga, 2012). Por otra parte, Armijos & Pérez (2016), quien realizó estudios en formación de callo de *Cinchona officinalis* L., en medio B5, en la combinación con 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP; y, 5,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP también obtuvo altos porcentajes de formación de callos con 68,2 % y 90,8 % respectivamente; además, en el mismo estudio al combinar 0,2 mg/l KIN con 1,0 mg/l de 2,4-D obtuvo la tasa más alta de formación de callos (100%).

De manera general, se puede deducir que de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, la combinación hormonal (1,0 mg/l de 2,4-D y 0,5 mg/l BAP) resultó ser la más efectiva, permitiendo el mayor porcentaje de formación de callos; sin embargo, estudios como los de Félix & Armijos (2006); Armijos & Pérez (2016) en *Cinchona officinalis* L., mostraron un mayor porcentaje de formación de callos con la utilización del medio B5 (Gamborg, 1968) y la aplicación de auxina-citoquinina en concentraciones mayores. Posiblemente, esto se deba a que muchos estudios para el cultivo *in vitro* de *Cinchona* informaron el uso de medio B5, aunque no dan ninguna explicación para el uso del mismo, pues se sabe que este tiene un contenido mineral más

bajo que el medio MS (Koblitz et al., 1983, Wijnsma et al., 1985, Allan & Scragg, 1986, Khouri et al., 1986, Walton et al., 1987, Giroud et al., 1991, Geerlings et al., 1999; Han et al., 2002).

El color y apariencia de los callos en los tratamientos ensayados, se visualizó que en los primeros días de evaluación obtuvieron una apariencia homogénea-traslucido de coloración crema; mientras que los callos visualizados a los 80 días presentaron una coloración carmelita o marrón y crema; así el T2, T3 y T6 obtuvieron el mayor porcentaje de callos con apariencia no homogénea-no translucido y de coloración carmelita (100 %); mientras que los tratamientos T5, T4 y T1 obtuvieron callos con apariencia homogénea-traslucido de coloración crema con el 8 %, 19 % y 24 % respectivamente (Figura 30, 31, y 32). Sin embargo, en el estudio realizado por Félix & Armijos (2006) los callos obtenidos de *C. officinalis* presentaron una estructura friable y color verde; mientras que Armijos & Pérez (2016) en la combinación 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP reporto callos friables y de coloración rojiza.

No obstante, Pierik (1990) señala que los callos no friables son de color marrón y los de tipo friable son de color blanquecino, apareciendo con pigmentos verdes y rojos, este tipo de consistencia del callo es adecuado para realizar suspensiones celulares; así también, Pérez (1990) citado por Herrera (2017); Paredes, et al. (2017) mencionan que un callo friable es de apariencia seca, coloración amarillo-blanquecino, compacta; y que se puede determinar de manera visual. En igual forma, Luciani et al. (2006); Pacheco et al. (2007) manifiestan que los callos de consistencia friable (desmenuzables) tienen tendencia a producir embriones somáticos, tallos y para regenerar plantas; y que la pérdida de viabilidad de los callos no friables (duros) y su causa del color marrón característico de este tipo de callos, puede ser debida a la pérdida de etileno producido por el propio callo durante su cultivo (Mao et al. 2006).

Finalmente, se puede decir que los callos visualizados en la investigación que presentan una coloración carmelita, aparentemente sean callos no friables y los de coloración crema sean callos friables.

5.2.2. Fase de inducción de embriones

Al igual que en la inducción de callo, el balance entre una auxina y citocinina son considerados un factor clave en la iniciación de embriogénesis somática (Samson et al., 2006).

En los tratamientos evaluados no se visualizó contaminación. El mayor porcentaje se obtuvo al combinar auxina-citoquininas, obteniéndose un promedio de 28,33 % de formación de embriones con la combinación de 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg% KIN (T3); así mismo, a los 80 días de evaluación se obtuvo la formación de dos hojas (Figura 35, C2). Cuando se añadieron auxinas (2,4-D) en una concentración 0,1 mg/l, la formación de embriones fue del 17,00 % (T2). Mientras tanto, el tratamiento T1 sin la adición de hormonas presentó el menor porcentaje de formación de embriones somáticos con un valor promedio de 15,00 %. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la investigación, no existen diferencias significativas entre tratamientos (Figura 33), posiblemente se deba a la coloración de los callos, como se mencionó anteriormente. Por otra parte, no se registró contaminación en los tratamientos ensayados. Estos resultados obtenidos, se constituyen como uno de los pioneros en esta fase de investigación, y servirán de guía para orientar nuevos trabajos de investigación.

6. CONCLUSIONES

- En la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., el hipoclorito de sodio (50 %) y peróxido de hidrógeno (2 %) controlaron eficientemente la contaminación, en 5 y 10 minutos de inmersión.
- En la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., el tratamiento T1 (50 % NaClO + 1mg/l AG3) y T3 (2 % H₂O₂ + 1mg/l AG3) presentaron el mayor porcentaje de germinación durante un tiempo de inmersión de 5 minutos.
- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de segmentos nodales, el uso de reguladores de crecimiento resultó beneficioso para el tratamiento T4 (1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) logrando el mayor porcentaje de formación de callos.
- En la fase de inducción de embriones, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., la combinación hormonal 2,4-D + KIN, alcanzó un máximo de formación de embriones en el tratamiento T3 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN).

7. RECOMENDACIONES

- En la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., se recomienda utilizar como desinfectantes el hipoclorito de sodio al 50 % + 1mg/l de ácido giberélico; y, peróxido de hidrógeno al 2 % + 1mg/l de ácido giberélico para obtener un mayor porcentaje de semillas germinadas.
- Para la formación de callos, los segmentos nodales (explantes) tienen que comprender el par de hojas con parte del tallo, ya que sin estas características el explante muere antes de iniciar el proceso de desdiferenciación celular.
- Para la formación de callos en explantes (segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando diferentes o similares concentraciones de auxinas/citoquininas a las utilizadas en la presente investigación (1,0; 2,0; y 3,0 mg/l 2,4-D; y 0,5 mg/l BAP).
- Para la formación de embriones somáticos en *Cinchona officinalis* L, se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando auxinas y citoquininas en concentraciones iguales o diferentes a las utilizadas en la presente investigación (0,1 mg/l 4-D; y 0,5 mg/l BAP).
- Consolidar una alianza estratégica entre la Universidad Nacional de Loja, instituciones públicas, privadas y ONG's con interés en proyectos de investigación en micropropagación vegetal de *Cinchona officinalis*, con la finalidad de promover la conservar la especie y recuperar ecosistemas degradados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 38.
- Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas* del Ecuador. Quito: Editorial del Ecuador. Retrieved from <http://www.biodiversitylibrary.org/item/146652>
- Acosta-Solís, M. (1989). La *Cinchona* o quina planta nacional del Ecuador. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat, 17(65), 305–311.
- Akita, M., Shigeoka, T., Koizumi, Y., & Kawamura, M. (1994). Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports, 13(3), 180-183.
- Allan, E., & Scragg, A. (1986). Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 liter air-lift bioreactors. Biotechnology Letters 8(9):635-638.
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant cell, tissue and organ culture, 32(1), 55-60.
- Álvarez, P. (2014). Área Biológica. Identificación de Hongos Micorrízicos Orbiculares en plantas de *Cinchona* spp., en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja. Tesis previa a la obtención de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. 44.
- ANACAFE-Asociación Nacional del Café. (2004). Cultivo de Quina: Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera.
- Anderson, L. (1999). A revisión of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchonae). Memories of the New York Botanical Garden, Volumen 6 (80), 1-75.
- Andersson, L., & Taylor, C. (1994). Rubiaceae-Cinchonaceae-coptos apelteae. En Harling G. Andersson L (Eds), Flora of Ecuador N° 50.
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido

- giberelico sobre la germinación *in vitro* de *Alnus acuminata*. *Agronomía Costarricense*, enero-junio, 75-80.
- Arcioni, M., & Mariotti, D. (1982). Tissue culture and plant regeneration in the frpäge legumes *Onobrychis corniculatus* L., *Plant Tissue Culture*. Fujiwara. A. De., Japanese Association for plant Tissue Culture. 107.
- Armijos, R., & Pérez, C., (2016). *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). Capítulo 1. 36-59. En Armijos, R. (2016). Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo. Doctoral dissertation, Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Artiga, M. (2012). Efecto del BAP y 2, 4-D en la inducción *in vitro* de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos peciolares y vitro-explantos hipocotiledores y radiculares de *Moringa oleífera* (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana).
- ASTRE (Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Atlanta). (2004). Peróxido de hidrogeno. Atlanta, GA.
- Bachs-Husemann, D; & Reinert, J. (1970). Embryubildung durch isoilierte einzelzellen aus gewebwkulturen von *Daucus carota*. *Protoplasma*. 70:49-60
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C.R Biologies* 331:806-814.
- Barba, A., Luna, B., & Romero, J. (2001). Micropropagación de plantas. Primera edición. México. Trillas. 107.
- Barnett, J. P. (1976). Sterilizing southern pineseeds with hydrogen peroxide. *Tree Planters 'Notes* 27(3):17-19.
- Barnett, J. P. (1998). Desinfecting seeds with hydrogen peroxide. <http://www.sfws.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 3 pp.
- Bewley, J., & Black, M. (1985). *Seed physiology of development and germination*.

Plenum, New York. 101.

Bonnelle, C., Lejeune, F., Fournier D., & Tourte, Y. (1990). Infraestructurax des cellules cotyledonaires en culture chez deux leguminucuses: relations avec l'acquisition de potentialites embryogenes. Paris. 310.

Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L, clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología, 11 (2), 127.

Buitrón, G. (1999). Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. Ecuador: TRAFFIC International.

Campos Ruiz, J. (2014). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl. "quina". Revista Científica de Estudiantes. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4265>

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.

Celis, L & Gallardo I. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. p 159.pdf. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Trópica. 969. <https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&lpg=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

Conde, V. (2015). Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 125.

Conger, B. (1981). Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Florida. 273. <http://trove.nla.gov.au/work/9939002?selectedversion=NBD1771775>

- Cry, D., Webster, F., & Roberts, D. (1991). Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex). *Seed. Sct. Res.* (1), 91.
- Cuvi, N. (2009). Ciencia e imperialismo en América Latina. La misión de *Cinchona* y las estaciones agrícolas cooperativas. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Davies, P.J. (1995). The plant hormones: Their nature, occurrence, and function. En: *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. P.J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 1-12.
- Denchev, P. (1987). Development of an experimental model for *In vitro* selection of herbicide resistance in *Medicago falcata* (alfalfa). Thesis. Inst. Genetics, ANS. Moscow.
- Denchev, P., & Atanassov, A. (1989). Effect of atrazine on the viability and embryo formation. *European Societies of Plant Physiology*. Yugoslavia. 1407.
- Denchev, P., Velcheva, M., dragijska, R., Kuklin, A., & Atanassov, V. (1990). Somatic embryogenesis in *Medicago*. *Biotekhnol.* 5-6, 66-77.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., M. Balzarini, González L., M. Tablada, Robledo C.W. (2016). InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias-FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 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., & 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.
- Espinosa, C. I., & Ríos, G. (2017). Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis in vitro* y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1-2), 73-82.

- Evans, D., Sharp, W., & Flick, C. (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In *Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture*. By Thorpe, T. New York. 45-113.
- Félix, C., & Armijos, R. (2006). *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). Memorias del III Congreso peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Capítulo 1. Apéndice 2. 56-59. En Armijos, R. (2016). Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo. Doctoral dissertation, Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Flores, A., Álvarez, J. G., Rodríguez, J. L., & Corona, A. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (HBK) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2), 27-33.
- Frid, D. (2009). Reproducción de plantas *in vitro* y sus beneficios para la agricultura. <http://tecnocienciaysalud.com/plantas-in-vitro>
- Fuji, J., Slade, D., Olsen, R., Ruzin, S., & Redenbaugh, K. (1990). Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant. Sci.* 72, 93.
- Fujimura, T., & Komamine, A. (1980). The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Physiol.* 64, 162-164.
- Galeano, V. (2009). Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades. AHYAT, Ed., 223.
- Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- García, M., Abeal, E., Rodríguez, I., & Rodríguez, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127.
- Garmendia, A. (2005). El árbol de la Quina (*Cinchona* sp.). Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura (Vol. 187). Editorial Universidad Técnica Particular de Loja.
- Geerlings, A., Hallard, D., Martinez, A., Lopes, I., Van der Heijden, R., Verpoorte, R.

- (1999). Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* "Ledgeriana" hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 19(2), 191-196.
- George, E., & Sherrington, P. (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd; Basingstoke; England; 475.
- Giroud, C., Van der Leer, T., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., Heeremans, C., Niessen, W., Van der Greef, J. (1991). Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures. *Planta Medica*, 57 (2),142-148
- Gómez, R. K. (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.
- Gray, D., & Purohit, A. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical reviews in Plant sciences*. 10, 33-61.
- Haccius, B. (1978). Question of unicelular origen of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*, (28), 74-81.
- Han, Y-S., Van der Heijden, R., Vepoorte, R. (2002). Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. *Biotechnology Letters* 24(9):705-710
- Harling, G. (1986). Flora of Ecuador. Current Scandinavian botanical research in Ecuador. Department of Systematic Botany, University of Göteborg, Section for Botany, Riksmuseum.
- Hartmann, H., & Kester, D. (1997). Propagación de Plantas; principios y prácticas. México. CECSA. (2), 790.
- Hartweek, L., Lazzeri, P., Gui, D., Collins, G., & Willians, E. (1988). Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In vitro Cell Dev. Biol.* 24, 821.

- Heinz, D., & Mee G. (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop. Sci.* (9), 346-348.
- Herrera, L. E. (2017). Implementación de un protocolo para la obtención en masa de embriones somáticos de *Coffea canephora* a partir de callos con interés comercial (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2017.).
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303(5914), 209-213.
- Hobhouse, H. (1985). *Seeds of Change. Five plants that transformed mankind.*
- HRM- Hospital Ramos Mejía, Argentina. (1993). Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes.
- Hu, C. V., & 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.
- Iáñez, P. (1998). Metabolismo energético. *Curso de microbiología general.* Univ. Facultad de Ciencias Agrarias. Nal. del Nordeste. Arg.
- Jiménez, E., Capote, A., Pérez, N., Quiala, E., de Feria, M., Barbon, R., & Pérez, J. C. (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.
- Khouri, H., Ibrahim, R., & Rideau, M. (1986). Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 5(6):423-426
- Kitto, S. L. (1997). Commercial micropropagation. *HortScience*. 32(6).
- Koblitz, H., Koblitz, D., Schmauder, H., & Gröger, D. (1983). Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports* 2(2):95-97
- Komamine, A.; Morigaki, T. M.; & Fujimura, T. (1982). Metabolim in synchronous

- growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. En: Frontiers of plant tissue culture. Thorpe, T.A. (ed). Calgary, Canada. p. 159-168.
- Lenntech. (2003). Peróxido de hidrógeno. Lenntech Agua residual y purificación del aire. México.
- 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. 64.
- Litz, E. R., & Jarret, R. L. (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.
- Lluna, R. (2006). Hormonas vegetales; crecimiento y desarrollo de la planta. http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh196_2/22_27.pdf.
- Loján, L. (1992). El verdor de los Andes: Árboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal altoandino. FAO. Proyecto de desarrollo forestal participativo en los Andes. Quito, Ecuador, 217.
- Lopera, P., Gómez, I., Muñoz, L. & 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_UC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- López, M. (1996). Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Universidad complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España.
- 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.
- Lu, J., Li, X., Yang, Y., Jia, L., You, J., & Wang, W. (2013). Effect of hydrogen peroxide

- on seedling growth and antioxidants in two wheat cultivars. *Biología Palntarum* 57(3):487-494.
- Luciani, G.F., Mary, A.K., Pellegrini, C., & Curvetto, N.R. (2006). Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*. 87:139-143.
- MacDicken, K., Jonsson, Ö. Piña, L., Maulo, S., Contessa, V., Adikari, Y., D'Annunzio, R. (2016). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015: cómo están cambiando los bosques del mundo?
- Madsen, J. E. (2002). Historia cultural de la cascarilla de Loja. *Botánica Austroecuatorial: Estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*, 385–399.
- Mao, J. Q., Zaidi, M. A., Arnason, J. T., & Altosaar, I. (2006). *In vitro* regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(2), 121-125.
- Margara, J. (1998). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Madrid- España. 232.
- Martínez, A., Guallart, R., Fernández, F., Gómez, M., & Martínez, J. (2013). Quino / *Cinchona officinalis* / el árbol de la Quina. <http://elarbormiamigo-encinarosa.blogspot.com/2013/01/quino-cinchona-officinalis-elarbol-de.html>
- Mas I Gisbert, H., Pérez-Laorga, E., Pitxer, M., Veintimila, P., & Campos, E. (2011). c. Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- McComb, A. L. (1946). *Cinchona Officinalis* in the Colombian Andes. *Journal of Forestry*, 44(2), 92–97.
- Medel-Narváez, A. (2000). Técnicas de desinfectación y siembra *in vitro* de embriones maduros del falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) Schumann), (Cactaceae).
- Mejía, F., Suni, M., & 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. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxi/cap07.pdf.
- Merkle, S., Parrott, W., & Flinn, B. (1996). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. Thorpe, T. *In vitro* embryogenesis in plant. 155-203.
- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin 108. 87.
- 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>
- Monsanto. (2011). Conceptos básicos de biotecnología vegetal. <http://www.monsanto.com/global/es/productos/pages/conceptos-basicos-de-biotecnologia-vegetal.aspx>.
- Montoya, L. (1991). Cultivos de Tejidos Vegetales. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77.
- Moore & Janick, J. (1988). Métodos geotécnicos en frutales. Editorial Calipso, S.A. México. 606.
- Morel, G. & Martin, C. (1955). Guérison de pomme de terre de maladies à virus. C.R. Acad. Sci. Paris. p. 1315-1324.
- Mroginski, E., Rey, H., & Mroginski, L. (2002). Establecimiento *in vitro* de Explantes y Regeneración de plantas de *Toona ciliata*. www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-003.pdf
- Muñoz de Malajovich, M. (2012). Biotecnología. - 2a ed. - Bernal: Universidad Nacional de Quilmes. 448. pdf. <https://es.scribd.com/doc/209343561/Biotecnologia-2ed>
- Muñoz, C., Cuervo, E., Ampudia, M., Gastón, A., Peñuelas, J., Iglesias, S., & Herrero, N. (2009). Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en semillas del genero *Pinus*. In Actas del 5 Congreso Forestal Español-Carga final.
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). A revised médium for rapid growt and bioassays

- with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1992, vol. 15., 473-497.
- Narváez, S. (2009). Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de Rosa, Variedad Akito (*Rosa* sp. Var Akito). Departamento de Ciencias de La Vida Carrera de Ciencias Agropecuarias – I.A.S.A. Gral. Carlo Magno Andrade Paredes.
- Nash, D. T., & Davies, M. E. (1972). Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 23(1), 75-91.
- Nieto M. (2000). Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. 184-232.
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2004). Métodos de propagación y conservación de Germoplasma. *Echenique*, V. 650., 353-363.
- Pacheco, G., Gagliardi R. F., Carneiro L. A., Callado C. H., Valls J.F.M., & Mansur, E. (2007). The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from sections *Erectoides* and *Procumbentes*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 88:121-126.
- Paredes, G., Peña, C., & Jadán, M. (2017). Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34(1-2), 63-83.
- Pariani, S. (2015). La incubadora: Condiciones ambientales de cultivo y asepsia. Capítulo 4. En: Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Parrot, W. (1993). Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. Costa Rica. Proceedings. Montpellier, Francia. 183-191.
- Parrot, W., Dryden, G., Vogt, S., Hildebrand, D., Collins, G., & Williams, E. (1988). Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell*. 24, 817.
- Payán, A., Carmen, H., & 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. N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 1; 13-16; 400.

Pérez, P. J., Jiménez, E. G., & Gómez, R. K. (1998). Field performance of selected sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) mutants. En: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. S.M.Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 425-445).

Phillips, R., Arnott, S. M., & Kaplan, S. E. (1981). Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters*, 21(3), 235-240.

Pierik R. L. (1987). *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 343 p.

Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España. 209-226.

Polito, V., McGranahan, G., Pinney, K., & Leslie, C. (1989). Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Junglans regia* L.) implications for *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant cell Rep.* 8, 219.

Quichimbo, D.; Del Cisne, G. (2012). Procesos morfogénicos *in vitro* de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma.

Ramos, J. (2012). Avances de la micropagación *in vitro* de plantas leñosas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Bogotá. 83. pdf. <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2515/1/17127974>.

Rännbäck, L. M. (2007). Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp (Doctoral dissertation, slU). Dept. of Crop Science, SLU. Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme.

2007:1.

- Reaka-Kudla, M. L., Wilson, D. E., & Wilson, E. O. (1996). Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources. Joseph Henry Press.
- Reinert, J. (1958). Untersuchungen über die morphogenese und gewebekulturen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 71:15.
- Reinert, J., Backs-Husemann, D., & Zerban, H. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. Cool. Natl. C.N.R.S. (París):261-268.
- Rentería, J. L. (2002). Ecología y manejo de la cascarilla (*Cinchona pubescens* Vahl), en Santa Cruz, Galápagos. Área Agropecuaria Y de Recursos Naturales Renovables. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja, 1–89.
- Reuveni, O., Israeli, Y., Degani, H., & Eshdat, Y. (1986). Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. IBPGR Final Report. 36p.
- Riofrío, M. (2000). Growing peppers in the Home Garden. Ohio State University Extension.
- Roca, W. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. Palmira. Valle.
- Roca, W., Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Rodríguez, M.S; García, R.O., & Muñoz, M.R. (2004). Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de Moringa Lam, tropicalizada en Cuba.
- Rosales, F., Pérez, G., & Santizo, M. (2004). Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de *Allium sativum* L. (Ajo).
- Russell, J. (2012). *Cinchona Officinalis*. (B. o. Demand, Ed., 1 p). <http://www.loot.co.za/product/jesse-russell-cinchona-officinalis/wzvd-2307-g330>.

- Samson, P., Campa, C., Le Gal, L., Noirot, M., Thomas, G., Lokeswari, T., & De Kochko, A. (2006). Effect of primary culture medium on high frequency somatic embryogenesis in different Coffee species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(1), 37-45.
- Sánchez, Y. J. M. (2004). Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*.
- 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., & Hinchee, M. (1993). Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports*. 12, 408-413.
- 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. 6.
- Serrano, M., & Piñol, T. (1991). Biotecnología vegetal. Ciencias de la vida. Editorial SINTESIS. S. A. España. 285.
- Söndahl, M., Nacamura, T., & Sharp, W. (1991). Propagación *in vitro* del café. 27, 621-642.
- Soto, B., Valverde, L., Rojas, A., & Gómez, A. (2010). Establecimiento *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* Standl. *Tecnología en Marcha*, Vol. 23, N.º 4. 66-73.
- Steward, F., Mapes, M., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45, 705-708.
- Strasburges, E. (1878). Über polyembryonie. *Jenaische Z. Naturwiss.* (12), 647.
- Street, H. (1977). Cell (suspensión) culture techniques. En Roca, W., & Mroginski, L. a. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. 8, 173-210.
- Street, H., & Withers, L. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture. In *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London. New York. 71.
- Suarez, F. (2011). "Micropropagación *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merrill (Piña).

Híbrido Md-2, A Partir de Cortes de Yemas Laterales y Apicales". Previa a la Obtención de Grado Académico o Título. Escuela Politécnica del Ejército. 82.

Takayama, S., & Akita, M. (1996). Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. In Cost 822 Workshops on Somatic Embryogenesis, Artificial Seeds and Bioreactors (p. 2).

Tisserat, B., Esan, E., & Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1, 1-78.

Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. En: M. Moraes R., B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev (Eds.), Botánica económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 319.

Ulloa, C., & Jorgensen, P. (2000). Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador. 2da edición. Ed. AbyA-YALA. Quito Ecuador.

Urrea, A., Veitía, N., & Bermúdez, I. (2001). Selección *in vitro* de callos de papa (*Solanum tuberosum*) var. diacol capiro empleando el filtrado crudo de *Phytophthora infestans* (mont) de bary. *Actualidades Biológicas*, 23(74), 5-13.

Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez S., & Jorgensen, P. (2000). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, EC. 489.

Vasil, I. (1987). Developing cell and tissue cultur systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology*. 128, 193-218.

Vasil, I. K. (1994). Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2), 105-108.

Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia horticultrae*, 123(4), 496-504.

Verkhoturov, V., & Frantenko, V. (2006). Effect of hydrogen peroxide on anti- and prooxidant status of barley seeds during germination. *Russian Agricultural Sciences* 34(1):11-13.

- Villalobos & García, 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos, *Agrociencia*. 48: 107-118.
- Villalobos, V., & 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. & De Langhe, E., (1985). Feasibility of *in vitro* propagation of banana and plantains. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 62, 323-328.
- Walton, N., Parr, A., Robins, R., & Rhodes, M. (1987). Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports* 6(2):118-121.
- Watkinson, J. I., & Pill, W. G. (1998). Gibberellic acid and presowing chilling increase seed germination of Indiangrass *Sorghastrum nutans* (L.) Nash.]. *Hort Science*, 33(5), 849-851.
- Wijnsma, R., Go., Van Weerden, I., Harkes, P., Verpoorte, R., & Svendsen, A. (1985). Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of sp. *Plant Cell Reports*, 4(5), 241-244.
- Williams, E., & Maheswaran, M. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57, 443-462.
- Withers, L. A. (1985). Cryopreservation and storage of germplasm. En: *Plant cell culture: a practical approach*. R.A. Dixon. IRL Press, Oxford 169-191.

9. ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos del ensayo germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de variación			
% de germinación	12	21,95			
Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo.	2758,33	3	919,44	3,8	0,0580
Tratamiento	2758,33	3	919,44	3,8	0,0580
Error	1933,33	8	241,67		
Total	4691,67	11			
TEST: LSD FISHER					
Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rangos	
T1	86,67	3	8,98	A	
T3	80,00	3	8,98	A	
T2	70,00	3	8,98	A B	
T4	46,67	3	8,98	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 2. Resultados obtenidos de la variable porcentaje de mortalidad de explantes en la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de variación			
% de mortalidad	18	64,12			
Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo.	7561,11	5	1512,22	3,20	0,0457
Tratamiento	7561,11	5	1512,22	3,20	0,0457
Error	5666,67	12	472,22		
Total	13227,78	17			
TEST: LSD FISHER					
Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rangos	
T3	60,00	3	12,55	A	
T2	53,33	3	12,55	A	
T1	43,33	3	12,55	AB	
T4	30,00	3	12,55	ABC	
T5	13,00	3	12,55	BC	
T6	3,33	3	12,55	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 3. Resultados obtenidos de la variable porcentaje de formación de callo de *Cinchona officinalis* L.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de variación			
% de formación de callo	18	42,62			
Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo.	6756,94	5	1351,39	4,34	0,0173
Tratamiento	6756,94	5	1351,39	4,34	0,0173
Error	3733,33	12	311,11		
Total	10490,28	17			
TEST: LSD FISHER					
Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rangos	
T4	65,00	3	10,18	A	
T6	53,33	3	10,18	A	
T1	51,67	3	10,18	A	
T5	48,33	3	10,18	A	
T2	16,67	3	10,18	B	
T3	13,33	3	10,18	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo de formación de embriones de *Cinchona officinalis* L.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de variación			
% de formación de embriones	9	34,01			
Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo.	310,22	2	155,11	3,32	0,1072
Tratamiento	310,22	2	155,11	3,32	0,1072
Error	280,67	6	46,78		
Total	590,86	8			
TEST: LSD FISHER					
Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rangos	
T3	28,33	3	3,95	A	
T2	17,00	3	3,95	A	
T1	15,00	3	3,95	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 5. Imágenes de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.



Figura 1. Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., a los 75 días de evaluación.

Anexo 6. Imágenes del ensayo inducción de callos, a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.



Figura 2. Mortalidad de explantes (segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L.

Anexo 7. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis.

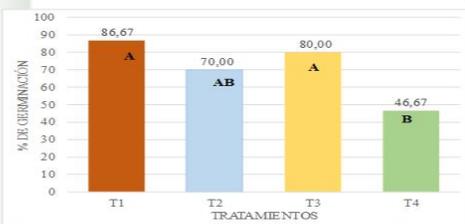


Figura 1. Porcentaje promedio de germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

2. Determinación del balance hormonal adecuado en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *C. officinalis* L.

Fase de inducción de callos

En este ensayo con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados; a los 80 días de evaluación el T4 alcanzó el mayor porcentaje de formación de callos con el 65,00 %. Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,0173 (Figura 2).



Figura 2. Porcentaje promedio de formación de callos a partir de explantes de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Fase de inducción de embriones somáticos

En este ensayo con la aplicación de los diferentes

tratamientos evaluados; a los 90 días de evaluación el T3 alcanzó el mayor porcentaje de formación de embriones con el 28,33 %. Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % no existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,1072 (Figura 3).



Figura 3. Porcentaje promedio de formación de embriones somáticos, a partir de callos de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección de semillas de *C. officinalis* L., el NaClO (50 %) y H₂O₂ (2 %) en tiempos de inmersión de 5 y 10 minutos controlaron eficientemente la contaminación.
- En la fase de germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L., el tratamiento T1 (50% NaClO + 1mg/1 AG3) y T3 (2 % H₂O₂ + 1mg/1 AG3) presentaron el mayor porcentaje (86,67%; 80,00 %) de germinación durante un tiempo de inmersión de 5 minutos.
- En la fase de inducción de callos de *C. officinalis* L., a partir de segmentos nodales, el uso de reguladores de crecimiento resultó beneficioso para el tratamiento T4 (1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) logrando el mayor porcentaje (65%) de formación de callos.
- En la fase de inducción de embriones, a partir de callos de *C. officinalis* L., la combinación hormonal 2,4-D + KIN, alcanzó un máximo de formación de embriones del 28,33% en el tratamiento T3 (1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l KIN).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE
RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERIA FORESTAL
LABORATORIO DE MICROPROPAGACION
VEGETAL

“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”.



RESPONSABLE: Karina C. Gonzalez Valdiviezo
DIRECTOR: Ing. Victor Hugo Eras Guamán Mg.Sc.
CO-DIRECTORA: Ing. Julia E. Minchala Patiño.

Loja – Ecuador
 2017

Cara Anterior

INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., es una especie endémica del Valle de Loja en la Región Sur del país, fue considerada como uno de los principales productos forestales económicamente importante desde el punto de vista medicinal. En el siglo XVIII hasta XIX, debido a la sobre-explotación y comercialización y a la alteración de su ecosistema, las poblaciones de *C. officinalis* L. fueron amenazadas. El futuro de *C. officinalis* L. en el Ecuador es incierto, ya que en que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración natural; aunque todavía se pueden encontrar individuos aislados en potreros, formando pequeños relictos boscosos; por lo que son urgentes los esfuerzos para la conservación eficiente de la especie.

Bajo esta perspectiva, por medio de la presente investigación se contribuirá a generar información relevante sobre la propagación masiva de *C. officinalis* L., a través de la utilización de metodologías alternativas (procesos biotecnológicos), y así aportar al manejo sustentable de la especie, asegurando su permanencia en los frágiles ecosistemas naturales;

OBJETIVOS

General

Contribuir a la generación de información sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., y la inducción de callos, a partir de vitroplantas producidas a nivel de laboratorio, con la finalidad de aportar a la conservación de la especie en la provincia de Loja.

Específicos

- Probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja.
- Determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja –UNL.

2. Metodología para probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L.

Se probaron cuatro tratamientos, empleando hipoclorito de sodio al 50 % (NaClO) y peróxido de hidrogeno al 2 % (H₂O₂) con dos tiempos de inmersión (5 y 10 min.), en el medio de cultivo liquido de MS se adicionó 1,0 mg/l de AG3 (Cuadro 1). Se evaluó el % de contaminación y % de germinación.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la desinfección y germinación de semillas de *C. officinalis* L.

Tratamiento (T)	Descripción	Ácido giberético (AG ₃)
T1	50 % NaClO + 5 min. de inmersión	
T2	50 % NaClO + 10 min. de inmersión	1,0 mg/l
T3	2 % H ₂ O ₂ + 5 min. de inmersión	
T4	2 % H ₂ O ₂ + 10 min. de inmersión	

3. Metodología para determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de segmentos nodales de *C. officinalis* L.

Fase de inducción de callos

Como explantes se utilizó los segmentos nodales con sus hojas a partir de las vitroplantas de una altura promedio de 4 cm. Se empleó el medio de cultivo sólido de MS, suplementado con auxinas: ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y citoquininas: Benzilaminopurina (BAP), en diferentes concentraciones (Cuadro 2). Se evaluó % de contaminación, % de mortalidad de explantes, número de días a la formación del callo, % de formación de callos, color, y, apariencia.

Cuadro 2. Tratamientos que se evaluó en la inducción de callos a partir de explantes de *C. officinalis* L.

Tratamiento (T)	Descripción
T1	1,0 mg/l 2, 4-D
T2	2,0 mg/l 2, 4-D
T3	3,0 mg/l 2, 4-D
T4	1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP
T5	2,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP
T6	3,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP

Fase de inducción de embriones somáticos

Como explantes se utilizó material proveniente de la fase de inducción de callos. Se empleó el medio de cultivo sólido de MS, suplementado con auxinas: ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y citoquininas: Kinetina (KIN), en diferentes concentraciones (Cuadro 3). Se evaluó % de contaminación, número de días a la contaminación, y, % de formación de embriones.

Cuadro 3. Tratamientos para la inducción de embriones somáticos a partir de callos de *C. officinalis* L.

Tratamiento (T)	Descripción
T1	Sin Hormonas
T2	0,1 mg/l de 2, 4-D
T3	1,0 mg/l de 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN

RESULTADOS

1. Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, en la fase de germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L.

Desinfección de semillas

Las semillas de *C. officinalis* L., a los 30 días de evaluación en los cuatro tratamientos, se logró obtener un 0 % de semillas libre de contaminantes.

Germinación *in vitro*

En este ensayo a los 75 de evaluación el T1 obtuvo el mayor porcentaje de germinación con el 86,67 %. Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,0580 (Figura 1).