



Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional de Loja

## Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

### Carrera de Ingeniería Forestal

Proceso morfogénico para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

Trabajo de Integración Curricular,  
previo a la obtención del título de  
Ingeniera Forestal

#### AUTORA:

Sayda Nidia Ramon Abad

#### DIRECTOR:

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Loja - Ecuador

2023

Educamos para **Transformar**

## Certificación

Loja, 03 de agosto de 2023

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

### Certifico:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Proceso morfogénico para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad**, de autoría la estudiante **Sayda Nidia Ramon Abad**, con **cédula de identidad Nro. 1105095275**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Forestal**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación para la respectiva sustentación y defensa.



Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

## **Autoría**

Yo, **Sayda Nidia Ramon Abad**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.



**Firma:**

**Cédula de identidad:** 1105095275

**Fecha:** 08 de septiembre de 2023

**Correo electrónico:** sayda.ramon@unl.edu.ec

**Teléfono:** +593988883693

**Carta de autorización por parte de la autora, para consulta de producción parcial o total y/o publicación electrónica de texto completo del Trabajo de Integración Curricular.**

Yo, **Sayda Nidia Ramon Abad**, declaro ser la autora del Trabajo de Integración Curricular, titulado: **Proceso morfogénico para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad**, como requisito para optar al grado de: **Ingeniera Forestal**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

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

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo en la ciudad de Loja a los ocho días del mes de septiembre de dos mil veintitres.



**Firma:**

**Autora:** Sayda Nidia Ramon Abad

**Cédula de identidad:** 1105095275

**Dirección:** parroquia La Argelia, barrio Los Ciprés, provincia de Loja

**Correo electrónico:** ramon.sayda.1994@gmail.com/ sayda.ramon@unl.edu.ec

**Teléfono:** +593988883693

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director del Trabajo de Integración Curricular:** Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg.Sc.

## **Dedicatoria**

Con mucho amor a mis dos luceritos Stalin y Roycer Ramon Abad, especialmente a mis padres Martina Abad y Rogelio Ramon, quienes con su ejemplo de perseverancia, esfuerzo y valentía han hecho posible que alcance esta meta.

¡Con gratitud y cariño!

***Sayda Nidia Ramon Abad***

## **Agradecimiento**

Agradezco a Dios, por haberme concedido sabiduría, fortaleza en las dificultades y perseverancia para alcanzar el presente Trabajo de Integración Curricular. Asimismo, a la Universidad Nacional de Loja por brindarme el financiamiento y a los servicios que me brindaron en Bienestar estudiantil.

Agradezco infinitamente al Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona, por abrirme las puertas y permitirme formar parte del mismo, al docente Investigador de la FARNR PhD. Darlin González; de forma particular al Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc., director de mi Trabajo de Integración Curricular y a la Analista del Laboratorio de Micropropagación Vegetal Ing. Agr. Magaly Yaguana, extraordinarios seres humanos, quienes, con su predisposición, vocación, me brindaron desinteresadamente el apoyo logístico, técnico para la ejecución y culminación de la presente investigación. Además, sobre todo agradezco por la paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y haberme compartido su sabiduría, experiencia, lo cual me permitió avanzar. Asimismo, a los miembros del Tribunal Calificador quienes, me brindarán sus nobles y valiosas sugerencias, con la finalidad de perfeccionar el presente trabajo de investigación.

Gracias a gestión de las dignas autoridades de la Carrera de Ingeniería Forestal, por ponernos a disposición a virtuosos catedráticos quienes, con paciencia, apoyo, compromiso sobre todo vocación, impartieron sus conocimientos, experiencias y contribuyeron en mi formación académica. De manera especial, agradezco al Mg.Sc. Iván Burneo, PhD. Nohemí Jumbo, Mg.Sc. Juan Maita y PhD. Jhoana Muñoz, quienes, en mis descensos, me extendieron la mano y no dudaron en brindarme su apoyo.

Finalmente, a Martina Abad quien, con su ejemplo, se convirtió en mi motivo de superación, a mis amistades, especialmente, mi gran amigo Andrés Guarnizo, quien a pesar de la distancia me apoyo incondicionalmente; como también, a mis compañeros de aula que compartieron junto a mí experiencias inolvidables durante toda esta etapa de formación universitaria, gracias por la amistad y compañerismo.

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

***Sayda Nidia Ramon Abad***

## Índice de Contenidos

<b>Portada</b> .....	i
<b>Certificación</b> .....	ii
<b>Autoría</b> .....	iii
<b>Carta de autorización</b> .....	iv
<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimiento</b> .....	vi
<b>Índice de contenido</b> .....	vii
Índice de tablas.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
Índice de anexos.....	xvii
<b>1. Título</b> .....	1
<b>2. Resumen</b> .....	2
2.1. Abstract.....	4
<b>3. Introducción</b> .....	6
<b>4. Marco Teórico</b> .....	10
4.1. Descripción del género <i>Cinchona</i> .....	10
4.2. Descripción botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	11
4.3. Descripción taxonómica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	12
4.4. Ubicación y distribución geográfica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	12
4.5. Condiciones edafoclimáticas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	13
4.5.1. Humedad relativa y temperatura .....	13
4.5.2. Suelo.....	14
4.6. Usos de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	14
4.6.1. Componentes de la quinina.....	15
4.7. Características de la biotecnología vegetal.....	15
4.7.1. Micropropagación vegetal .....	16
4.7.1.1. Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> .....	16
4.7.1.2. Desventajas del cultivo <i>in vitro</i> .....	17
4.7.1.3. Morfogénesis.....	17
4.7.1.4. Cultivo de callos.....	18
4.7.1.5. Cultivo de tejidos.....	18
4.7.1.6. Organogénesis de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	19
4.7.1.7. Organogénesis directa.....	19

4.7.1.8. Organogénesis indirecta.....	20
4.7.1.9. Medio de cultivo.....	20
4.7.1.10. Sales minerales de Murashige y Skoog (MS-1962) .....	21
4.7.1.11. Reguladores de crecimiento vegetal.....	22
4.7.1.12. Auxinas.....	22
4.7.1.13. Citoquininas.....	22
4.7.1.14. Giberelinas.....	23
4.7.1.15. Vitaminas.....	23
4.7.1.16. Tiamina.....	24
4.7.1.17. Mio-inositol.....	24
4.7.1.18. Agar.....	24
4.8. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i> .....	25
4.9. Factores ambientales a considerarse en condiciones <i>in vitro</i> .....	28
4.9.1. Temperatura.....	28
4.9.2. Humedad relativa.....	28
4.9.3. Luz.....	28
4.9.4. Intensidad lumínica.....	29
4.9.4.1. Fotoperiodo.....	29
4.9.4.2. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	29
4.9.4.3. Explante.....	29
4.9.4.4. Material vegetal.....	30
4.9.4.5. Factores físicos que inciden en el cultivo <i>in vivo</i> .....	30
4.9.4.6. Humedad del sustrato.....	30
4.9.4.7. Luz.....	30
4.10. Principales estrategias utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> , para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.....	30
4.10.1. Oxidación fenólica.....	31
4.11. Estudios similares sobre inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	31
<b>5. Metodología.....</b>	<b>34</b>
5.1. Ubicación del sitio de estudio.....	34
5.2. Metodología para evaluar el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas, en la inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	34

5.2.1. Obtención del material vegetal .....	35
5.2.2. Preparación del medio de cultivo sólido.....	35
5.2.3. Inoculación <i>in vitro</i> de callos.....	36
5.2.4. Factores y niveles.....	37
5.2.4.1. Diseño experimental.....	38
5.2.5. Hipótesis del modelo.....	38
5.2.6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo (16/8) y la concentración hormonal de BAP y KIN.....	38
5.2.6.1. Variables evaluadas.....	39
5.2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	40
5.2.8. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo (16/8) .....	40
5.3. Metodología para evaluar el efecto de la oscuridad total y dos citoquininas, en la inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	41
5.3.1. Obtención del material vegetal.....	41
5.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido.....	42
5.3.3. Inoculación <i>in vitro</i> de callos.....	42
5.3.4. Factores y niveles.....	43
5.3.4.1. Diseño experimental.....	43
5.3.5. Hipótesis del modelo.....	43
5.3.6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad y la concentración hormonal de BAP y KIN .....	44
5.3.7. Variables evaluadas.....	44
5.3.7.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	44
5.3.8. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad total .....	45
5.4. Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.....	45
<b>6. Resultados.....</b>	<b>47</b>

6.1. Efecto del fotoperiodo y dos citoquininas en diferentes concentraciones, para la inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	47
6.1.1. Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	47
6.1.3. Porcentaje de la oxidación fenólica de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	48
6.1.2. Porcentaje de mortalidad de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	50
6.1.4. Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	50
6.1.5. Porcentaje de formación de brotes <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación .....	51
6.1.6. Número promedio de brotes <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas en diferentes concentraciones, a los 90 días de evaluación.....	52
6.1.7. Porcentaje promedio de formación de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones del fotoperiodo y dos citoquininas en tres concentraciones, a los 90 días de evaluación.....	53
6.1.8 Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	55
6.2. Efecto de la oscuridad total y dos citoquininas en diferentes concentraciones, para la inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	52
6.2.1. Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	52

6.2.2. Porcentaje de la oxidación fenólica de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	53
6.2.3. Porcentaje de mortalidad de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	54
6.2.4. Porcentaje de sobrevivencia de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	58
6.2.5. Porcentaje de formación de brotes <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	58
6.2.6. Número promedio de brotes <i>de novo</i> en las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad total y dos citoquininas en diferentes concentraciones, a los 90 días de evaluación.....	59
6.2.7. Porcentaje promedio de formación de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad total y dos citoquininas en tres concentraciones, a los 90 días de evaluación.....	60
6.2.8. Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la oscuridad, a los 90 días de evaluación .....	62
6.3. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados.....	63
<b>7. Discusión.....</b>	<b>65</b>
7.1. Contaminación de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	65
7.2. Oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo, oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	66
7.3. Sobrevivencia de las estructuras callogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	67
7.4 Formación de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.....	69

7.5. Porcentaje promedio de formación de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.....	69
7.6. Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	71
8. <b>Conclusiones</b> .....	72
9. <b>Recomendaciones</b> .....	73
10. <b>Bibliografía</b> .....	74
11. <b>Anexos</b> .....	87

## Índice de tablas:

<b>Tabla 1.</b>	Alcaloides derivados de la <i>Cinchona officinalis</i> L.....	14
<b>Tabla 2.</b>	Concentraciones de nutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) .....	21
<b>Tabla 3.</b>	Tratamientos evaluados para la inducción <i>in vitro</i> de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de estructuras callogénicas, en condiciones de fotoperiodo (16/8).....	34
<b>Tabla 4.</b>	Factores y niveles de las concentraciones de citoquininas, para la inducción de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de vitroplantas, en condiciones de fotoperiodo (16/8).....	37
<b>Tabla 5.</b>	Especificaciones del diseño experimental, para la inducción de brotes <i>de novo</i> , a partir de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo (16/8) .....	38
<b>Tabla 6.</b>	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la concentración hormonal de BAP y KIN.....	38
<b>Tabla 7.</b>	Matriz para evaluar el registro de la contaminación, mortalidad y oxidación fenólica de los callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	40
<b>Tabla 8.</b>	Matriz para evaluar el número de días a la formación de estructuras <i>de novo</i> , número y longitud de brotes <i>de novo</i> por callo.....	40
<b>Tabla 9.</b>	Tratamientos evaluados para la inducción <i>in vitro</i> de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de estructuras callogénicas, en condiciones de oscuridad total .....	41
<b>Tabla 10.</b>	Factores y niveles hormonales de citoquininas, para la inducción de estructuras <i>de novo</i> , provenientes de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad total .....	43
<b>Tabla 11.</b>	Especificaciones del diseño experimental.....	43
<b>Tabla 12.</b>	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la concentración hormonal de BAP y KIN.....	44
<b>Tabla 13.</b>	Matriz de evaluación de la contaminación, mortalidad de los callos y oxidación fenólica.....	45

<b>Tabla 14.</b>	Matriz de evaluación del número de días a la formación de estructuras <i>de novo</i> , número y longitud de brotes <i>de novo</i> por callo.....	45
------------------	--	----

## Índice de figuras:

<b>Figura 1.</b>	Atributos botánicos: A) árbol; B) flores; C) frutos y semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	12
<b>Figura 2.</b>	Localización del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.....	34
<b>Figura 3.</b>	Ilustraciones de estructuras callogénicas del árbol semillero N° 3 del sitio Selva Alegre: A) Preselección de estructuras callogénicas; B y C) Callos que denotan vitalidad.....	36
<b>Figura 4.</b>	Preparación del medio de cultivo MS-1962 + KIN y BAP: A) Soluciones minerales del medio de cultivo MS-1962; B) Adición de vitaminas y reguladores de crecimiento; C) Filtración y aforo del medio de cultivo....	36
<b>Figura 5.</b>	Inoculación <i>in vitro</i> en la de cámara de flujo laminar: A) Material de disección, frascos con el medio de cultivo de MS-1962; B) Flameo de los materiales de inoculación <i>in vitro</i> ; C y D) Selección de callos friables; E) Disección de callos; F) Inoculación <i>in vitro</i> del callo en el medio de cultivo.....	37
<b>Figura 6.</b>	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación, con aplicación de la concentración hormonal de dos citoquininas y el fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.....	39
<b>Figura 7.</b>	Fase de callogénesis: A) Siembras anticipadas de explantes; B) Callos de <i>Cinchona officinalis</i> L.; C) Callos friables obtenidos en el LMV.....	41
<b>Figura 8.</b>	Incubación de estructuras callogénicas: A) Etiquetado y montaje del ensayo en el cuarto de incubación; B) Evaluación de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	42
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	47
<b>Figura 10.</b>	Contaminación por bacterias al medio de cultivo, en el tratamiento T4R3F3.....	48
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en las tres concentraciones hormonales de BAP	

	y KIN, en condiciones de fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.....	48
<b>Figura 12.</b>	Ilustraciones de la oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L. en los tratamientos, a los 90 días de evaluación; A, B, B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> ) Avance de la oxidación fenólica a los 59 y 62 días en el T3 (0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP, 2,0 mg L <sup>-1</sup> KIN) .....	49
<b>Figura 13.</b>	Porcentaje de mortalidad de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	50
<b>Figura 14.</b>	Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	51
<b>Figura 15.</b>	Ilustraciones del estado de sobrevivencia en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	51
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L. con brotes <i>de novo</i> , en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	52
<b>Figura 17.</b>	Curva acumulativa del número promedio de formación raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	53
<b>Figura 18.</b>	Porcentaje promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.....	54
<b>Figura 19.</b>	Formación de raíces <i>de novo</i> a partir de callos: A, B y C) Inducción de raíces <i>de novo</i> a los 82 días en T0R1F1; D) Incremento de masa fresca de células indiferenciadas en las estructuras callogénicas en el T0.....	54
<b>Figura 20.</b>	Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, con las tres concentraciones hormonales BAP y KIN, a los 90 días de evaluación.....	55

<b>Figura 21.</b>	Porcentaje de oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.....	56
<b>Figura 22.</b>	Ilustraciones de la oxidación fenólica en las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad: A) Avance de la oxidación fenólica; B, C, D) Oxidación fenólica en los tratamientos T0, T2, T3.....	57
<b>Figura 23.</b>	Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	58
<b>Figura 24.</b>	Ilustraciones de la sobrevivencia en las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de la oscuridad, a los 90 días de evaluación.....	58
<b>Figura 25.</b>	Porcentaje de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L. con brotes <i>de novo</i> , en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.....	59
<b>Figura 26.</b>	Curva acumulativa del número promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.....	60
<b>Figura 27.</b>	Porcentaje promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación .....	61
<b>Figura 28.</b>	Ilustraciones de la formación de brotes <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación: A y B) Indicios de brotes <i>de novo</i> ; C y D) Desarrollo masivo de brotes <i>de novo</i> ; E) Desarrollo de células indiferenciadas en estructuras callogénicas en el tratamiento T1R1F5...	61
<b>Figura 29.</b>	Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, con las tres concentraciones hormonales BAP y KIN, a los 90 días de evaluación.....	62

<b>Figura 30.</b>	Ilustración del crecimiento en longitud de las raíces <i>de novo</i> , a partir de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad, a los 41, 51 y 66 días en el T0R3F5.....	63
<b>Figura 31.</b>	Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales. A) Visita del Director del Trabajo de Integración Curricular en el LMV; B) Presentación de un póster científico; C) Socialización de los resultados preliminares del TIC a actores interesados, que formaron parte del Simposio Internacional de “Ciencias Forestales: “Bosque, Agua y Biodiversidad”; D) Elaboración de un poster científico; E) Socialización de los resultados ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona; F) Elaboración de un manual técnico, un borrador de un artículo científico y un tríptico.....	64

## Índice de anexos:

<b>Anexo 1.</b>	Concentraciones hormonales de dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> , en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 90 días de evaluación.....	87
<b>Anexo 2.</b>	Concentraciones hormonales de dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> , en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	87
<b>Anexo 3.</b>	Datos obtenidos en la inducción de brotes <i>de novo</i> , bajo el efecto de la concentración hormonal de dos citoquininas y el fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 90 días de evaluación.....	88
<b>Anexo 4.</b>	Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas, bajo el efecto de la concentración de dos citoquininas y la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.....	88
<b>Anexo 5.</b>	Poster científico con los resultados preliminares, para la difusión a los participantes del Simposio Internacional de Ciencias Forestales: “Bosque, Agua y Biodiversidad”, desarrollado por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL.....	89
<b>Anexo 6.</b>	Tríptico para la difusión de resultados con actores sociales interesados.....	91
<b>Anexo 7.</b>	Certificado de traducción.....	92

## **1. Título**

**Proceso morfogénico para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.**

## 2. Resumen

*Cinchona officinalis* L., es una especie forestal nativa de los Andes, emblemática de nuestro país, con una gran importancia cultural e histórica, cuyas poblaciones han sido amenazadas y explotadas por diferentes actividades antropogénicas, para el aprovechamiento de sus alcaloides altamente comercializables, por su elevado valor medicinal. La propagación de la especie depende de la dispersión de las semillas y su capacidad germinativa, por consiguiente, el hábitat natural de la especie *Cinchona* en la provincia de Loja, está siendo amenazada en su hábitat natural, haciéndose necesario investigar alternativas para la propagación masiva y la restauración en los ecosistemas degradados, por lo que es necesario realizar investigaciones que permitan contar con técnicas alternativas para la propagación de la especie, siendo el cultivo de tejidos vegetales una alternativa válida para contribuir a este fin.

En esta perspectiva se desarrolló la presente investigación, que tuvo como finalidad determinar el balance hormonal adecuado, para la fase de inducción de brotes *de novo*, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L. El material vegetal *in vitro* fue obtenido del banco de germoplasma generado en el trabajo de investigación desarrollado por Camacho (2023) en condiciones de asepsia en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UNL. Para la fase de inducción de brotes *de novo* se inocularon callos de *Cinchona officinalis* L. provenientes de vitroplantas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), suplementado con dos citoquininas (benzil amino purina y kinetina) en tres concentraciones (0,0; 2,0; 3,0 mg L<sup>-1</sup>), que fueron incubados en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 de oscuridad) y oscuridad total. Las variables evaluadas en la formación de las estructuras *de novo* fueron; días a la contaminación, porcentaje de contaminación, fenolización, sobrevivencia, mortalidad, días a la formación de estructuras *de novo*; y, número y longitud de estructuras *de novo*. En esta fase se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento.

Los resultados obtenidos demostraron que la contaminación, se presentó exclusivamente en condiciones de fotoperiodo (16/8) en el tratamiento 4, conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, alcanzando el 6,67 % de contaminación; asimismo, la oxidación fenólica fue mayor en condiciones de fotoperiodo, en donde el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) presentó el 88 % de oxidación de los explantes; mientras que en condiciones de oscuridad total, el tratamiento T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzó un 27,50 %, seguido del T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con un 24 % de oxidación; por lo tanto, en condiciones de oscuridad total en todos los tratamientos evaluados (T0, T1, T2, T3, T4), se

alcanzó el máximo porcentaje de sobrevivencia (100 %). Los resultados obtenidos determinaron que, en condiciones de incubación, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, existió una relación directa, entre la oxidación fenólica, la sobrevivencia de los callos y las estructuras *de novo*, puesto que a medida que el nivel de oxidación se incrementó, provocó la subsiguiente muerte de las estructuras callogénicas inoculadas *in vitro*.

En lo relacionado a la variable número promedio de raíces *de novo*, la misma inició a partir del día 21, alcanzando el mayor número promedio en el T0 con 11,77 raíces *de novo*, en condiciones de fotoperíodo; sin embargo, bajo condiciones de oscuridad total el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzó el mayor número promedio con 14,97 raíces *de novo*. Las estructuras callogénicas, formaron raíces *de novo*, en condiciones de fotoperiodo formaron el mayor porcentaje de 80 % en el T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y en menor porcentaje en condiciones de oscuridad, en dónde el T3 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), alcanzó el 70 %; y, es necesario recalcar, que las raíces presentaron mayor vitalidad en los tratamientos que no contenían ninguna concentración hormonal. En lo relacionado a la formación de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas, la mayor longitud promedio se presentó en el tratamiento T0, tanto en condiciones de fotoperiodo y oscuridad, con 0,16 y 0,17 mm respectivamente.

Finalmente, es necesario señalar que, el tratamiento testigo conformado solamente con las sales minerales del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962), sin ningún nivel de citoquininas (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), generó en las estructuras callogénicas mayor masa fresca de células indiferenciadas y estimuló el mayor número y longitud de raíces *de novo*.

**Palabras claves:** micropropagación, órgano *de novo*, estructura callogénica, citoquinina, morfogénesis.

## 2.1. Abstract

*Cinchona officinalis* L. is a native forest species of the Andes, emblematic of our country, with great medicinal, cultural and historical importance, whose populations have been threatened and exploited by different anthropogenic activities, for the use of its highly marketable alkaloids. The propagation of the species depends on the dispersal of the seeds and their germination capacity, therefore, the natural habitat of the *Cinchona* species in the province of Loja is being threatened in its natural habitat, making it necessary to investigate alternatives for the massive propagation and restoration in degraded ecosystems, so it is necessary to carry out research that provides alternative techniques for the propagation of the species, with plant tissue culture being a valid alternative to contribute to this aim.

In this perspective, the current research was developed, whose purpose was to determine the adequate hormonal balance, for the induction phase of *de novo* shoots, from calluses of *Cinchona officinalis* L. The *in vitro* plant material was obtained from the germplasm bank generated in the research work carried out by Camacho (2023) under aseptic conditions in the Plant Micropropagation Laboratory of the UNL. For the *de novo* shoot induction phase, *Cinchona officinalis* L. calluses from vitroplants were inoculated in the Murashige and Skoog (MS) culture medium, supplemented with two cytokinins (benzyl amino purine and kinetin) in three concentrations (0.0; 2.0; 3.0 mg L<sup>-1</sup>), which were incubated under photoperiod conditions (16 hours of light and 8 hours of darkness) and total darkness. The variables evaluated in the formation of the *de novo* structures were: days to contamination, percentage of contamination, phenolization, survival, mortality, days to the formation of *de novo* structures; and, number and length of *de novo* structures. In this phase, a completely randomized experimental design was used, with 5 treatments and 3 repetitions per treatment.

The results obtained showed that the contamination occurred exclusively under photoperiod conditions (16/8) in treatment 4, made up of 0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN, reaching 6.67 % contamination; likewise, phenolic oxidation was higher under photoperiod conditions, where T3 (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) presented 88 % oxidation of the explants; while, in conditions of total darkness, treatment T0 (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) reached 27.50%, followed by T4 (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) with 24% oxidation; therefore, in total darkness conditions in all evaluated treatments (T0, T1, T2, T3, T4), the maximum survival percentage (100 %) was reached. The results obtained determined that, under incubation conditions, with a photoperiod of 16 light hours and 8 dark hours, there was a direct relationship between phenolic oxidation, callus survival and *de novo* structures, since

as the oxidation level increased, causing the subsequent death of the inoculated callogenic structures *in vitro*.

Regarding the variable average number of *de novo* roots, it began on day 21, reaching the highest average number in T0 with 11.77 *de novo* roots, under photoperiod conditions; however, under total darkness conditions T3 (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) reached the highest average number with 14.97 *de novo* roots. The callogenic structures formed *de novo* roots, under photoperiod conditions they formed the highest percentage of 80 % in T0 (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) and in a lower percentage under dark conditions, where T3 (2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) reached 70 %; and, it is necessary to emphasize, that the roots showed greater vitality in the treatments that did not contain any hormonal concentration. Regarding *de novo* root formation in the callogenic structures, the greatest average length occurred in the T0 treatment, both in photoperiod and dark conditions, with 0.16 and 0.17 mm respectively.

Finally, it is necessary to point out that the control treatment consisting only of the mineral salts of the basal culture medium of Murashige and Skoog (MS-1962), without any level of cytokinins (0.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN), generated greater fresh mass of undifferentiated cells in the callogenic structures and stimulated the greatest number and length of *de novo* roots.

**Keywords:** *Cinchona*, micropropagation, *de novo* shoots, callogenic structure, *in vitro*.

### 3. Introducción

El Ecuador es un país megadiverso con tan sólo 256 370 km<sup>2</sup>, posee 91 ecosistemas, entre ellos están los bosques andinos; además, se encuentran dos de los hotspots más amenazados e importantes del mundo: los andes tropicales y la región del Chocó/Darién/Ecuador Occidental, en los cuales abundan las especies endémicas (Mittermeier et al., 1997; García, 2014).

En la Región Sur del Ecuador (RSE) la diversidad ecosistémica y el endemismo son muy altos (León-Yáñez et al., 2011); en la provincia Loja se encuentran 22 ecosistemas (Aguirre et al., 2017). Los bosques andinos se desarrollan entre los 1 800 a 3 200 m. s.n.m., los cuales son ecosistemas altamente amenazados en el Ecuador, a causa de la intervención antrópica, por la conversión de uso del suelo, para realizar actividades agropecuarias, deforestación selectiva, extracción de productos forestales no maderables y maderables, de forma no sostenida (Bussmann, R., 2005).

La tasa anual de deforestación en el Ecuador es de 2,3 %, equivalente a aproximadamente 340 000 ha y la deforestación bruta anual promedio en el periodo 2014-2016, fue de 94 353 ha/año (MAE 2017). Además, ha experimentado pérdidas demográficas recientes, debido a las altas tasas de deforestación, haciendo cada vez más escasa la población de *Cinchona officinalis* L., en las zonas de distribución natural (Epiqueñ, 2009).

*Cinchona officinalis* L., en Ecuador es conocido como árbol nativo de los Andes, se distribuye desde los 700 m a los 2 900 m. s.n.m. en las laderas exteriores de la cordillera occidental y la oriental de los Andes, desde 12° latitud norte, hasta 20° latitud sur, en un ambiente húmedo y lluvioso durante todo el año (Garmendia, 2005). Eras et al., (2019) manifiestan que, *Cinchona officinalis* L., emerge en el valle de Loja y en los bosques ya inexistentes de las laderas de Uritusinga, hacia la Costa, en condiciones algo más secas y actualmente muy degradadas.

En la provincia de Loja *Cinchona officinalis* L., es considerada como una especie emblemática, por su alto valor medicinal, cultural e histórico; Brunton et al., (2006) mencionan que la cáscara es utilizada por sus propiedades antipalúdicas, analgésicas, antirreumáticas, antiinflamatorias y antipiréticas en patologías como malaria o paludismo. Además, Quito-Ulloa et al., (2021), confirman que, la especie, es un producto forestal económicamente importante desde el punto de vista medicinal; por ello, es sobreexplotada por los alcaloides comercializables presentes en la corteza, entre los más utilizados están la quinina, quinidina, dihidroquinina, dihidroquinidina; además, ha superado los límites de regeneración natural

(Cueva-Agila et al., 2019) por ello, es necesario tomar medidas para la propagación y conservación de la especie.

El hábitat potencial de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja, abarca aproximadamente 9 836 km<sup>2</sup>, 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 del Ecuador (Parque Nacional Podocarpus y Yacuri) (Espinosa y Ríos, 2014). Acosta-Solís (1947), manifiesta que, en la provincia de Loja, las poblaciones de cascarilla fueron sobreexplotadas y comercializadas, desde el siglo XVIII hasta el siglo XIX.

Las principales causas en la reducción de las poblaciones naturales de *Cinchona* son: la expansión de la frontera agropecuaria, lo cual ha limitado la regeneración natural, baja tasa de germinación de las semillas, altas tasas de deforestación, incendios forestales y sobreexplotación, lo cual ha provocado la pérdida poblacional, quedando actualmente pequeños relictos boscosos en zonas inaccesibles (Cuví 2009; Espinosa y Ríos 2014).

Según Aguirre (2020) en el Ecuador existen 12 especies del género *Cinchona*, el cual es endémico y se distribuye en los remanentes boscosos y matorrales andinos. Sin embargo, en los cerros del Nudo de Cajanuma, quedan pequeñas poblaciones de cascarilla por la presión antrópica y a causa de la agricultura migratoria en los bosques andinos (Loaiza y Sánchez, 2006).

*Cinchona officinalis* L., no está reportada como endémica en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN); sin embargo, en la provincia de Loja su corteza es aprovechada por su importancia medicinal e histórica, lo que hace que la especie esté **amenazada** en su hábitat natural (Gutiérrez, Jaramillo y Aguirre, 2022).

Además, Buddenhagen et al., (2004) mencionan que la especie y el género en condiciones naturales, tiene un desarrollo lento y una tasa de germinación baja. Por lo tanto, la reproducción de la cascarilla requiere de condiciones climáticas específicas, por ser una especie cuyo hábitat es de los bosques andinos o denominada zona de montaña nublada.

En relación a la propagación de la especie, con respecto a la germinación de las semillas, presenta considerables variaciones, que con frecuencia obedecen a defectos en la semilla, desarrollo del embrión, enfermedades, recalcitrancia y edad, lo cual se controla mediante el manejo de los frutos y la manipulación posterior de la semilla (Herrera et al., 2006).

Frente a esta problemática, surgen las técnicas biotecnológicas como una alternativa válida para la recuperación de sus poblaciones, a partir de la producción masiva de plantas, en un ambiente artificial controlado, utilizando un medio de cultivo y las concentraciones hormonales adecuadas, con la finalidad de incrementar la tasa de multiplicación potencial de la especie, en ambientes y espacios reducidos, produciendo plántulas de calidad uniforme y a escala comercial, a partir de un genotipo seleccionado, que a futuro permita el mejoramiento genético de la especie. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; es decir, la capacidad de una sola célula para convertirse en un nuevo organismo (Skoog y Miller, 1957; Steward et al., 1958; Murashige y Skoog, 1962). Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar órganos *de novo* tales como: tallos, raíces o embriones somáticos, de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

En este sentido, la totipotencia implica dos procesos principales de desarrollo: desdiferenciación y rediferenciación. En las plantas, estos procesos están dirigidos por las concentraciones relativas de las hormonas vegetales, especialmente de citoquininas y auxinas (Skoog y Miller, 1957; Steward, et al. 1958), de modo que, una concentración alta de citoquininas y baja de auxinas promueve el desarrollo de los brotes; mientras que una concentración baja de auxinas promueve el desarrollo de raíces adventicias en el explante. La proliferación de cultivos de células vegetales desdiferenciadas (callos), el enverdecimiento y la formación de estructuras de brotes *de novo*, son procesos dependientes de las citoquininas. La habituación es un fenómeno natural, en el que la división y el crecimiento de los cultivos de células vegetales, tras un paso continuo en reguladores de crecimiento, finalmente se vuelven independientes de este requerimiento de citoquininas (Murashige y Skoog, 1962; Boeken, et al., 1974; Meins, 1989).

Así mismo, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es una excelente alternativa de propagación, para la recuperación y conservación de las especies vegetales recalcitrantes, como es el caso de *Cinchona officinalis* L., al permitir alcanzar un alto número de individuos por unidad de superficie; además, permite optimizar el uso de factores ambientales, nutricionales, hormonales y con ello, conservar genotipos élites (González, 2002) con el fin, de obtener un mayor número de individuos, permitiendo el emprendimiento en programas de mejoramiento genético, para la obtención de semillas con calidad genética, a ser utilizadas en actividades de forestación y reforestación; así como, para la recuperación de ecosistemas nativos degradados.

Con los antecedentes antes señalados y en el marco del proyecto de investigación macro titulado: **Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.**, se desarrolló el presente trabajo de investigación, en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, con el apoyo logístico y financiero de la Universidad Nacional de Loja, a través de la Dirección de Investigación, desde el mes de septiembre del 2022, hasta febrero del 2023, el cual tuvo como finalidad, la generación de información científica sobre el efecto del fotoperiodo, la oscuridad total y tres concentraciones de dos citoquininas Benzil amino purina-BAP (0,0; 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>) y Kinetina-KIN (0,0; 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>), para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas obtenidas de vitroplantas y de esta manera incrementar la tasa de multiplicación potencial de la especie y obtener una mayor cantidad de material vegetal, en menor tiempo y en un espacio reducido y de esta manera contribuir a la propagación y conservación de la especie, que es emblemática para la provincia de Loja y el país, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

#### **Objetivo General:**

- Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la influencia de la luz y la oscuridad, en la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

#### **Objetivos Específicos:**

- Determinar el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Evaluar el efecto de la oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

## 4. Marco teórico

### 4.1. Descripción del género *Cinchona*

El género *Cinchona* pertenece a la familia Rubiaceae y es nativo de los valles andinos de Sudamérica (Buitrón, 1999). Se distribuye en la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes, abarcando latitudes desde los 12° al norte hasta los 20° al sur y se encuentra a altitudes que oscilan entre los 700 y los 2 000 m. s.n.m. (Garmendia, 2005).

El género *Cinchona* es importante por sus propiedades etnobotánicas, pero ha tenido cambios históricos en su distribución en los Andes tropicales. En Ecuador, ha habido una gran expansión en la distribución de elevación para *Cinchona*, con un rango altitudinal de 792,5 m. para *Cinchona officinalis* L. y una elevación media de 662,5 mm. (González-Orozco, et al., 2023).

Sin embargo, el género *Cinchona* es difícil de germinar y regenerar en condiciones naturales, por lo que suele encontrarse en lugares aislados y en pequeños grupos (Buddenhagen et al., 2004). En el sur de Ecuador, se han registrado 18 puntos de ocurrencia de la especie *Cinchona officinalis* L. y el género en general se distribuye principalmente en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja (Garmendia, 1999).

La cascarilla o quina en estado natural no suele formar bosques por sí misma, sino que generalmente se encuentra en grupos o parches dispersos en el bosque (Campos et al., 2014). Algunas especies de este género producen quinina, un alcaloide con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas (Rosas, 2022).

El descubrimiento de las propiedades medicinales de la quinina fue revolucionario para la medicina y aún hoy en día se utiliza con fines médicos (Cuvi, 2011). Según estudios realizados por Garmendia (2005), la especie de *Cinchona officinalis* L. es endémica de la región sur de Ecuador, específicamente del valle de Loja.

### 4.2. Descripción botánica de *Cinchona officinalis* L.

*Cinchona officinalis* L., es un atributo florístico y se clasifica como un árbol, Correa, et al., (2021) presentan en su investigación los atributos botánicos y describe las características botánicas de la especie, las cuales se presentan en la Figura 1.

Los árboles de *Cinchona officinalis* L., poseen una corteza color marrón, ligeramente fisurada; el fuste es cilíndrico con corteza color marrón oscuro, con filotaxia opuesta y decusada; con una altura total que alcanzó entre 3 a 9 m y un diámetro de 4,8 a 30,4 cm; las hojas son simples, opuesta decusada de forma oval de 7,3 a 16,9 cm de longitud, de color verde amarillento, borde entero nervadura penninervia y una longitud promedio del pedúnculo de 2,12 a 2,21 cm. (Correa, et al., 2021).

La flor de la *Cinchona officinalis* L., es pequeña, hermafrodita, actinomorfa, de color rojo débil, morado-rosado, con pequeñas cerdas blancas en los extremos de sus pétalos, pueden llegar a tener de 1,08 a 1,6 cm de largo, su corola gamopétala, pentámera, tubular, con cáliz gamosépalo pentámero, turbinado soldado al ovario, epigina sincárpico, epipétalo unido a la corola, con la presencia de 5 a 6 estambres y una longitud de 0,6 a 1,5 cm; estilo unicarpelar brevistilia y alargado unicarpelar longistila, con una longitud promedio de 0,2 a 2,6 cm; los sépalos tienen una longitud promedio de 0,1 a 0,24 cm, de color verde claro a verde amarillento, gineceo con ovario ínfero (Correa, et al., 2021).

El fruto de *Cinchona officinalis* L., es una capsula seca dehiscente, de forma oblonga u elíptica, de color marrón o rojo oscuro, posee dos valvas por fruto, con un calicillo corto de 5 sépalos de color amarillo rojizo. Las semillas son de forma fusiforme con presencia de alas muy finas y frágiles, el número de semillas varía entre 13 a 64 semillas por fruto, con una longitud promedio de la semilla de 5,73 mm de largo, las semillas son de color amarillo - amarillo rojizo. Además, su método de dispersión se clasifica como anemófila (Correa, et al., 2021).

**Figura 1.** Atributos botánicos: A) árbol; B) flores; C) frutos y semillas de *Cinchona officinalis* L.



Fuente: Archivo del Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2015-2016.

### **4.3. Descripción taxonómica de *Cinchona officinalis* L.**

**Dominio:** Eukaryota

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida (Dicotyledoneae)

**Orden:** Gentianales

**Familia:** Rubiaceae

**Género:** *Cinchona*

**Especie:** *officinalis*

**Nombre científico:** *Cinchona officinalis* L.

**Nombre común:** cascarilla, quina, quinina

### **4.4. Ubicación y distribución geográfica de *Cinchona officinalis* L.**

Según (Buitrón, 1999) esta especie en el siglo XVII se descubrió en Ecuador y es considerada como la planta nacional por ser nativa, está presente en las tres regiones continentales: Costa, Sierra y Amazonía. Además, se la puede encontrar en el rango altitudinal entre 1 000 a 3 500 m s.n.m., descubierta en el valle de Loja, por lo tanto, es considerada endémica del sur del Ecuador (Garmendia, 2005).

Asimismo, Jorgensen y León, (1999) indican que la especie crece en los bosques siempreverde montano bajo de la Cordillera Oriental y Occidental de los Andes; y, se distribuye en las provincias de Bolívar, Cañar, Morona Santiago, Azuay, Loja y Zamora Chinchipe (Peter et al., 1999).

### **4.5. Condiciones edafoclimáticas de *Cinchona officinalis* L.**

#### **4.5.1. Humedad relativa y temperatura**

La propagación por semillas de *Cinchona officinalis* L., Barrutia, et al., (2020) demuestra en su estudio que, las semillas de cascarilla pueden ser germinadas manteniendo las condiciones de temperatura ambiente alrededor de 23 °C y en sistema cerrado por riego atomizado, para mantener la humedad cercana al 100 %, además, las semillas alcanzan a germinar en un 50 %.

Asimismo, Pucha-Cofrep, D., et al. (2020) indica que, el estrés hídrico limita en más de un 50 % el crecimiento de *Cinchona officinalis* L., lo que afecta principalmente su desarrollo en altura y diámetro, así como su vitalidad y acelera los procesos de mortalidad. Por lo tanto,

recomienda que, para lograr un mejor desarrollo se brinda mayores niveles de humedad y riego constante ya que son esenciales para el óptimo crecimiento de *Cinchona officinalis* L.

Sin embargo, Rodríguez y Nieto (1999), mencionan que la temperatura es uno de los factores más influyentes en la germinación, han reportado rangos mínimos por encima de 0 °C, óptimos entre 25 y 3°C, máximos de 40-50 °C. Según estudios realizados por (Hurtado et al., 2019; Caraguay-Yaguana, et al., 2019) manifiestan que, el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en presencia de la luz es de 70,5 %, en condiciones de oscuridad es de 50 % y con un porcentaje promedio de viabilidad del 0,58 %, que es bajo, lo cual significa que la semilla pierde rápidamente su poder germinativo por las características de la semilla.

*Cinchona officinalis* L., en condiciones naturales posee un alto porcentaje de rebrote; sin embargo, tiene un bajo porcentaje de regeneración natural porque sus requerimientos de reproducción por semillas son muy específicos, que obedece a las características de la semilla, lo cual reduce su diversidad genética (Acosta-Solís 1947; Garmendia, 2005; Espinosa y Ríos, 2014).

#### **4.5.2. Suelo**

Según Sanchez et al., (2022) los hongos micorrízicos arbusculares nativos (HMA), son potenciales biofertilizadores y bioprotectores, que potencian el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo una alternativa para propagar la quina en ambientes controlados. Además, indican en su estudio que los HMA nativos, en interacción con abonos orgánicos, favorecen sustancialmente el crecimiento de quina, logrando propagar plantas vigorosas en ambientes controlados.

En estudios realizados por Barrutia et al., (2020) donde demuestran que para la propagación por semillas de *Cinchona officinalis* L., tiene preferencia por suelos de textura franco-arenosa.

#### **4.6. Usos de *Cinchona officinalis* L.**

Esta especie es utilizada en el campo de la medicina para la extracción de la quinina, un alcaloide que está presente en la producción de fármacos antimaláricos, del mismo modo se la utiliza en la industria alimenticia como agua tónica, conocida como “*gin tonic*” y se la comercializa mayormente en el mercado europeo.

La madera de cascarilla es utilizada para postes, puntales, vigas, leña y carbón (Garmendia, 2017). Además, Debnath, et al., (2018)., mencionan que *Cinchona officinalis* L. es utilizada por sus alcaloides comercializables (Tabla 1); asimismo Bharadwaj, et al., (2018), indican otros alcaloides de la cascarilla como: cinconidina, cinconina, epiquinina y epiquinidina.

**Tabla 1.**

*Alcaloides derivados de la Cinchona officinalis* L.

<b>Alcaloides comercializados</b>	<b>Importante actividad farmacológica</b>
Quinina	Antipalúdico, antipirético, antivariólico, analgésico y antiinflamatorio
Quinidina	Antipalúdico
Dihidroquinina, dihidroquinidina	Inhibir las acciones del sistema nervioso parasimpático

Debnath et al., (2018).

*Cinchona officinalis* L., tiene acción contra la malaria o paludismo y posee la capacidad de erradicar del organismo humano el microorganismo llamado *Plasmodium*, que la produce y que es transmitido por los zancudos *Anopheles* (MAE, FAO., 2015). Además, esos beneficios medicinales son reconocidos por algunos habitantes de la ciudad de Loja, en un estudio Labanda, (2021), realizó un análisis y sistematización bibliométrico de *Cinchona officinalis* L., donde concluye que, el 52 % de los encuestados señalaron que, a la cascarilla la maceraban en el siglo XVIII; y, en el año 2021, el 16 % la usaba como agua aromática; ciertos habitantes, tienen arraigado las costumbres de sus familiares y ellos utilizaban la especie como sahumero y crema cicatrizante.

Labanda, (2021), menciona que, el nivel de uso de acuerdo a los beneficios que aporta *Cinchona*, corresponde al 50 % de los actores político-social, el 44 % de los actores académicos al igual que el 46 % de actores político-social han manifestado que la cascarilla posee un alto valor con respecto al tema medicinal; así mismo, el 33 % de actores académicos, concuerdan en el tema cultural. Igualmente, añade que la cascarilla en cuanto al tema maderable no aporta significativamente, ya que el 24 % de los actores político-social, no le dan valor alguno o simplemente desconocen de sus usos.

#### **4.6.1. Componentes de la quinina**

La medicina a base de extractos de plantas, son frecuentemente considerados como seguros por pacientes y comunidades. Además, los productos naturales poseen diversidad estructural y química, que dan oportunidades para modificar la estructura de acuerdo a la necesidad como inhibidor (Salama, et al., 2020).

La quinina se obtiene de la corteza de *Cinchona officinalis* L., se utiliza para tratar la malaria desde el siglo XVII, además, tiene una rápida acción esquizotónica contra los parásitos (Debnath et al., 2018). También, es reconocido como un fármaco eficaz para la actividad antipalúdica y la quinidina para las enfermedades cardíacas. La identificación de nuevos fármacos, terapias antipalúdicas y sigue siendo una prioridad debido a su resistencia a los medicamentos.

Asimismo, la corteza de la quinina contiene muchos alcaloides útiles para la medicina, es el principal antipalúdico y es el más utilizado en el tratamiento de la malaria, barato y comprobado. Además, la cloroquina es un fármaco contra la malaria del grupo 4-aminoquinolina (Wasis y Edhi., 2020).

#### **4.7. Características de la biotecnología vegetal.**

La biotecnología integra distintos enfoques derivados de la tecnología y aplicación de las ciencias biológicas, tales como biología celular, molecular, bioinformática. Uno de los objetivos principales de la biotecnología es, generar tecnologías mucho más eficientes para la producción de semillas de alta calidad a través de la micropropagación de plantas (Cruz et al., 2021).

La biotecnología forestal permite la sustitución de cultivos por plantas genéticamente modificadas, las cuales presentan mayor resistencia a plagas, mayores rendimientos y nuevas aplicaciones en fibras, bioplásticos, biocombustibles y biorremediación. También incluye nuevas informaciones sobre poliploides vegetales y el uso de material vegetal para hacer rentable la producción de bioetanol (Thieman y Palladino, 2010).

Adicionalmente, contribuye a la conservación de los recursos forestales y ofrece nuevas técnicas como el cultivo celular, la micropropagación, la selección genotípica y la conservación *in vitro*, complementando a las metodologías tradicionales del mejoramiento genético forestal (Martínez et al., 2003).

##### **4.7.1. Micropropagación vegetal**

La micropropagación vegetal es la manera generalizada del cultivo *in vitro*, en base a esta aplicación, con un fragmento de la planta conocida como “planta madre”, se obtiene una descendencia genéticamente idéntica, también llamados clones. Es todo un proceso que empieza por la selección correcta del material vegetal, hasta la obtención de la planta preparada para plantarse en campo (Núñez y Gago, 2007)

La aplicación de la micropropagación tiene gran impacto en cultivos de tejidos, esta multiplicación celular está basada en la totipotencia, ésta involucra gran serie de fases, desde procedimientos previos a establecimiento de cultivos, proliferación de los subcultivos, enraizamiento, aclimatación del material obtenido y trasplante en campo. El proceso de micropropagación se lo realiza en condiciones controladas, en un ambiente totalmente aséptico (Cruz, 2012).

Además, esta técnica enfrenta limitaciones, tales como la etapa de enraizamiento, ya que varias especies no responden favorablemente a las hormonas, también en la etapa de aclimatación, debido a que se toma en cuenta aspectos como el manejo del material, fisiología y anatomía. Permite la producción a gran escala de plantas madre libres de agentes patógenos, incluyendo virus; este método está siendo aplicado principalmente en especies vegetales de interés comercial o en estado de amenaza (Cruz, 2012).

#### **4.7.2. Ventajas del cultivo *in vitro*.**

Según Mejía et al., (2012); Muñoz (1994), las principales ventajas del cultivo *in vitro* son:

- Permite la ampliación de la base genética de especies.
- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas en un corto tiempo.
- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.
- Es posible propagar los clones en cualquier época del año.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Posibilidad de producción masiva de plantas homogéneas en una superficie reducida a bajos costos y tiempos reducidos.
- Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales).
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores edafoclimáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios.

#### **4.7.3. Desventajas del cultivo *in vitro*.**

Según un estudio realizado por (Wegier et al., 2013; Indacochea, P., 2017)., las principales desventajas del cultivo *in vitro* son las siguientes:

- Los equipos, materiales, insumos y reactivos utilizados en los medios de cultivos son costosos y poco disponibles en nuestro medio.
- Es necesario la implementación de una infraestructura y equipos costosos.
- Es indispensable que los laboratorios *in vitro* tengan acceso a fluido eléctrico sin interrupciones periódicas.
- Es necesario contar con personal de laboratorio especializado: biólogos, químicos fisiólogos, fitomejoradores, agrónomos y forestales.
- Propensión del tejido a oxidación y crecimiento anómalo.
- Existencia de pérdidas durante los trasplantes.

#### **4.7.4. Morfogénesis**

La morfogénesis es la formación de órganos y comprende procesos de desdiferenciación celular y rediferenciación, bajo determinados estímulos, para obtener diferentes respuestas como la regeneración de brotes, primordios de raíces, callos, entre otros (Pérez et al., 2008). La respuesta morfogenética puede variar según el tipo de material vegetal, composición del medio y adición de reguladores de crecimiento, debido a su relación directa con el explante (Menezes et al., 2016). Según Prieto et al., (2005), manifiestan que las condiciones endógenas del medio, deben permitir que los diferentes tejidos expresen distintas respuestas como organogénesis radicular, caulinar y embriogénesis; tanto directa como indirecta.

Debnath, et al., (2012) mencionan que la morfogénesis *in vitro* parece depender en gran medida de los reguladores del crecimiento de las plantas y los medios utilizados para el cultivo, que nuevamente es específico del genotipo

##### **4.7.4.1. Cultivo de callos**

De acuerdo con González et al., (2018), el callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido, para lo cual se considera algunas características, la edad del vegetal para la determinación de la respuesta *in vitro*; los reguladores de crecimiento aplicados en el medio de cultivo, la concentración de estos mismos y la combinación.

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 González et al., (2018).

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 desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejido González et al., (2018).

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. Sin embargo, 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 González et al., (2018).

#### **4.7.4.2. Cultivo de tejidos**

El cultivo de tejidos comprende la micropropagación, el aislamiento y cultivo de embriones, la regeneración a partir de callo o de suspensiones celulares, el cultivo de protoplastos, anteras y microsporas. Estas técnicas se están utilizando en particular para la multiplicación de plantas en gran escala. La micropropagación ha resultado especialmente útil en la producción de material de plantación de gran calidad y libre de enfermedades de una amplia variedad de cultivos (Smith y Wood, 1998).

#### **4.7.5. Organogénesis de tejidos vegetales *in vitro***

En la regeneración *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012).

La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética sean competentes y por ende receptivas a procesos diferenciación celular (Thorpe, 2014), que permitirán el desarrollo de meristemos, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur y Koncz, 2005). En este proceso la mitosis es esencial ya que permite la formación de un número crítico de células en división activa, que son capaces de responder a señales de desarrollo, este grupo de células en división activa son llamadas meristemoides, de forma isodiamétrica, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes, que contiene varios orgánulos y grandes cantidades de

almidón las cuales se necesitan en cantidades considerables durante su diferenciación (Thorpe, 2014).

Los meristemoides son similares a meristemas verdaderos, ya que éstos poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante y si están en condiciones adecuadas puede formar yemas o raíces primarias. En la organogénesis la repuesta de los explantes depende del balance entre auxinas y citoquininas tanto en el medio de cultivo como las que existen en forma endógena en el explante (Cardoza, 2005). Existen dos tipos de organogénesis: la organogénesis directa y la indirecta. Se diferencian en que la primera se da sin la ocurrencia de un proceso prolongado de dediferenciación, acompañado visiblemente de la formación de masas celulares indiferenciadas comúnmente denominadas callo, mientras que en la segunda existe notablemente formación de callo, previo a la formación de brotes (Acosta, 2012)

#### **4.7.6. Organogénesis directa**

La producción directa de yemas o brotes de un tejido en el cual no hay estadio de callo es denominado organogénesis directa. Las plantas *in vitro* se propagan clonalmente por organogénesis directa para mejorar los rangos de multiplicación, así como para obtener plantas transgénicas, si bien es más frecuente la descripción de protocolos de transformación genética vía organogénesis indirecta (Cardoza, 2005; Roben et al., 1993).

#### **4.7.7. Organogénesis indirecta**

Es el desarrollo de masas de células desorganizadas y en proceso de dediferenciación y rediferenciación denominado callo (Adobkar et al., 2012). Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, los cuales interactúan con los fitorreguladores endógenos para llegar a un equilibrio para la formación de órganos (organogénesis), una vez llegado a esto la producción de callo se detiene (Cardoza,2005; Roben et al., 1993).

Este proceso involucra la diferenciación celular que a su vez refleja la expresión de la totipotencia celular, interacción celular y la reacción a señales específicas (Yépez, 2006). La inducción de plantas usando esta técnica no asegura la fidelidad clonal, pero esta puede ser ideal en un sistema para la selección de variantes soma clonales debido a la variabilidad genética que existe en las células somáticas o debido a la inducción de mutaciones o cambios epigenéticos, con el fin de obtener caracteres deseados, además de la multiplicación de masa (Cardoza, 2005).

La inducción de plantas vía callo ha sido usada para la producción de plantas transgénicas en las cuales el callo es transformado y las plantas son regeneradas (Mathur y Koncz, 2005); sin embargo, la micropropagación indirecta presenta ciertas limitantes que reducen las posibilidades de su uso como un método comercial de micropropagación. Entre estas limitantes tenemos: la producción de células de callo aumenta de manera significativa las probabilidades de generar variación genética en las plantas regeneradas, el potencial morfogénico o grado de competencia de los callos producidos varía de manera sustancial entre ellos, se hace necesario el uso de interacciones complejas y costosas de reguladores de crecimiento y la disminución de la capacidad morfogénica de los callos disminuye a medida que se suceden los subcultivos (Mathur y Koncz, 2005).

#### **4.7.8. Medio de cultivo**

Se conoce como medio de cultivo al conjunto de nutrientes y componentes como sales minerales, vitaminas, agua, agar, reguladores de crecimiento y azúcar, que crean condiciones necesarias para el desarrollo de los organismos, además, no existe un medio de cultivo universal, este es específico para cada especie y cada tipo de organismo (Villalobos y Thorpe, 1991).

La concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio, este se obtiene de la suma de los potenciales osmóticos de sus componentes, donde influyen no sólo los pesos sino también el grado de disociación de las sales que lo constituyen; en la práctica el potencial osmótico se determina en forma directa en el medio de cultivo (Pierik, 1990).

Con respecto a los azúcares, es preciso tener en cuenta que un disacárido como la sacarosa se convierte (por hidrólisis) durante la esterilización, en dos monosacáridos (glucosa y fructuosa), lo que provoca un cambio en su potencial osmótico. El efecto que tienen los azúcares y macronutrientes en el potencial osmótico, es diferente en los distintos medios de cultivo (Yoshida et al., 1973).

#### **4.7.9. Sales minerales de Murashige y Skoog (MS-1962)**

Las sales minerales de MS-1962, se suelen dividir en macro y micronutrientes, los elementos que conforman esta sustancia son: Nitrato de potasio, Nitrato de amonio, Sulfato de magnesio, Sulfato de zinc, Sulfato cúprico, Cloruro de potasio, Yoduro de potasio, Fosfato de potasio, Ácido bórico y Molibdato de sodio. Asimismo, en la Tabla 2 se presentan los componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog, (1962).

**Tabla 2.**

Concentraciones de nutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962).

Nº.	Sales minerales	Componentes	Concentraciones mg L <sup>-1</sup>	
1	NITRATOS	Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,00
		Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	1 900,00
2	SULFATOS	Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00
		Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	16,90
		Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
		Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub>	0,03
3	HALOIDES	Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub>	440,00
		Yoduro de potasio	KI	0,83
		Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25
4	P, B, Mo	Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
		Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
		Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
5	Na Fe EDTA	Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
		Ácido etilendiaminotetraacético	Na <sub>2</sub> .EDTA	37,30

Fuente: Murashige y Skoog (MS, 1962).

#### 4.7.10. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento pueden ser clasificados según su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes, entre otras clasificaciones. La clasificación de los reguladores de crecimiento más usados en la actualidad para el crecimiento vegetal y su aplicación. Algunas fitohormonas se clasifican en familias, por ejemplo, las auxinas, en donde encontramos varios compuestos con estructura y actividad similar. Por otra parte, reguladores como el etileno son sustancias específicas y no se conocen otras que cumplan una actividad similar. Ciertas funciones de las fitohormonas pueden ser observadas a nivel fenotípico.

##### 4.7.10.1. Auxinas

Las auxinas a nivel celular fomentan la diferenciación y división celular meristemática, inducen la formación, elongación de tallos, raíces adventicias. También, incrementa la dominancia apical, el contenido osmótico, la permeabilidad celular, aumenta de producción proteica y contribuye a la disminución de la presión de la pared celular (Alcántara et al., 2019).

##### 4.7.10.2. Citoquininas o Citocininas

Las citoquininas estimulan la formación de brotes *de novo* y de yemas adventicias. Además, cumplen con la regulación del ciclo celular ayudando así al mantenimiento de los meristemas, estas en conjunto con las auxinas, controlan la preformación de órganos

(Martínez, 2017). Asimismo, Jordá (2022), señala que las citoquininas son un tipo de fitohormonas que promueven la división celular, la diferenciación de células, tejidos.

Sin embargo, (Alcántara et al., 2019) mencionan que las citoquininas en dosis adecuadas aportan a estimular e inducir una alta proliferación de tejidos vegetales madre, elongación de las raíces y división celular. Además, activan la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y jugar un rol importante en la generación, aumento y producción de brotes a nivel vegetal.

a) *Benzil Amino Purina (BAP)*

BAP (6-Benzyl Amino Purine) es el grupo más común de citoquininas sintéticas, es un regulador de crecimiento, favorece la división, elongación de las células y la multiplicación de brotes. Es utilizado en la propagación de plantas por cultivo *in vitro* (Kurnianingsih et al, 2009).

b) *Kinetina (KIN)*

La Kinetina fue la primera citocinina descubierta, es una fitohormona de tipo adenina utilizada en medios de cultivo de plantas como los medios Murashige y Skoog junto con las auxinas, se usa para inducir la formación de callos, regenerar tejidos a partir de callo, además combinando citocininas y auxinas se logra la diferenciación y estimula la formación de brotes y de yemas adventicias.

#### **4.7.10.3. Giberelinas**

Las giberelinas promueven el crecimiento celular debido a que incrementan la hidrólisis del almidón, fructanos y sacarosa, originando fructosa y glucosa (Martínez, 2017). Además, reprimen la formación de brotes y de cualquier clase de tejido organizado (Viasus et al., 2013).

A nivel celular, las giberelinas presentan algunos efectos como: aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante, induce la elongación de raíces, hojas jóvenes, floración y el alargamiento de segmentos nodales. Por otra parte, induce germinación de semillas y participan en procesos de iniciación floral vital en fertilidad de plantas masculinas y femeninas.

Por otro lado, las giberelinas a nivel vegetal inducen a efectos como la estimulación, elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad. Promociona el crecimiento embrionario, de manera endógena durante los procesos de germinación y desarrollo apical (Alcántara et al., 2019).

#### **4.7.11. Vitaminas**

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo celular y son requeridas en pequeñas cantidades. Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina (Vitamina B1).

##### **4.7.11.1. Tiamina**

Tiamina o vitamina B1, se añade como hidrocloreto de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Es una coenzima de la descarboxilación de los cetoácidos piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato y es esencial para el crecimiento radical pues interviene en la síntesis de citocininas (Mroginski y Roca, 1991).

##### **4.7.11.2. Mio-inositol**

No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis (Mroginski y Roca, 1991).

##### **4.7.11.3. Agar**

El agar es un agente solidificante de los medios de cultivo, el componente dominante es un polisacárido que se extrae de algas pertenecientes al género *Gelidium*, no es utilizado como nutriente. Se puede disolver alrededor de los 100 °C y se gelifica alrededor de los 40 °C, dependiendo de su grado de pureza, pero al enfriarse se solidifica formando un gel con un alto contenido de agua (Atencia, 2014).

#### **4.8. Etapas de la micropropagación *in vitro*.**

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden agruparse en cinco etapas claramente definidas: etapa cero, en la que se selecciona el material vegetal que se va a emplear como fuente de futuras plántulas; etapa uno, o de establecimiento, en la cual se establece un cultivo primario; etapa dos, o de multiplicación, en la que se tiene como objetivo obtener la mayor cantidad de plántulas a partir de un explante, etapa tres, o de enraizamiento, donde se busca en devolver a la planta su capacidad de función autótrofa, siendo así capaz de sobrevivir en condiciones de campo y finalmente la etapa cuatro, o de aclimatación, el cual comprende la transferencia de la planta de las condiciones de laboratorio al campo (Roca y Mroginski, 1993).

## **Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras**

Para poder establecer el cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia, es necesario obtener una buena calidad de explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para la obtención de dicho material vegetal es recomendable realizar un control fitosanitario y mantener las condiciones óptimas de crecimiento por varias semanas en un invernadero (Roca y Mroginski, 1993). La planta donadora del material vegetal deberá ser aquella que presente las mejores características fenotípicas como: número de brotes, vigorosidad, ausencia de enfermedades, mayor número de frutos, tamaño, crecimiento, desarrollo, entre otros.

Durante esta etapa se mantiene a la planta madre o donadora bajo un riguroso control sanitario, condiciones óptimas y nutricionales adecuadas; además, de un riego apropiado para permitir el mejor desarrollo, crecimiento vigoroso y libre de patógenos del material vegetal a emplearse durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

## **Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico**

Para establecer el cultivo *in vitro* del material vegetal seleccionado es necesario realizar una desinfección exitosa del explante, debido a que si existe la presencia de algún microorganismo en este, ya sea hongo o bacteria, estos destruirán el cultivo, ya que existe una competencia entre el explante y los contaminantes por los nutrientes que se encuentran presentes en el medio de cultivo, siendo los microorganismos los que poseen altas tasas de multiplicación y desarrollo, acabando por completo con la muestra vegetal (Roca y Mroginski, 1993).

Durante el proceso de desinfección se debe precautelar la integridad del explante a fin de evitar la oxidación y necrosamiento del material vegetal, ya que al emplear concentraciones altas de hipoclorito de sodio afecta la viabilidad del explante. No es posible establecer un mismo protocolo de desinfección para cualquier explante de cualquier especie, debido a que el mismo debe estar diseñado en función de varios factores (Roca y Mroginski, 1993).

De acuerdo con (Abdalla, et al., 2022), la contaminación de plantas *in vitro* es un obstáculo, se da por microorganismos, impide el éxito del protocolo de micropropagación conlleva al incremento de costo, esfuerzo de producción relacionado con el cultivo de tejidos vegetales (p.4).

## **Etapa 2: Inducción de estructuras *de novo***

Según Aguilera (2012) se considera estructura *de novo* al brote adventicio que se obtiene de una célula callogénica en base a la totipotencia celular (potencial para regenerar una nueva planta completa). En esta etapa se establece un diseño experimental en función de las concentraciones de citoquininas y auxinas que se van a emplear durante el proceso de inducción a brotes. Una correcta concentración entre citoquininas y auxinas permite obtener una respuesta por parte del material vegetal, aunque concentraciones elevadas de citoquininas suele provocar una inhibición de la respuesta que se quiere obtener del explante (Roca y Mroginski, 1993).

Una vez establecido el objetivo del cultivo *in vitro* es necesario seleccionar un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para obtener la respuesta deseada. Además, un medio de cultivo debe tener una fuente de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante, reguladores de crecimiento, entre otros compuestos (Roca y Mroginski, 1993).

### **Etapas 3: Multiplicación de brotes**

Durante esta etapa se espera que los explantes que sobrevivan a la etapa de desinfección e introducción, originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con hojas bien formadas y buen vigor. En la base de cada hoja existe una yema, la cual se desarrollará luego de estar en contacto con el medio de cultivo; cada periodo de tiempo (de 3 a 4 semanas), estos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo mediante divisiones y resiembras para inducir la respuesta requerida en el proceso de establecimiento de cultivo *in vitro*. Este proceso se lleva a cabo en la cámara de flujo laminar o en un lugar que permita mantener las condiciones de asepsia (Roca y Mroginski, 1993).

Esto dependerá de la especie vegetal a emplearse durante el desarrollo de la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*, de las condiciones del medio de cultivo y del área donde se va a llevar a cabo la incubación de los explantes (Pierik, 1990). El número de plántulas que se obtienen permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando todos los factores que afectan el crecimiento del material vegetal (Roca y Mroginski, 1993).

La incubación y posterior multiplicación de plántulas de plantas élite se debe llevar a cabo en condiciones controladas, siendo estas, temperatura, calidad e intensidad de luz, humedad relativa, fotoperiodo e higiene (Roca y Mroginski, 1993). Estas condiciones establecidas para cada cultivo dependiendo de las necesidades que la planta requiera, se logran mediante el empleo de cámaras climatizadas, o cuartos equipados con aire acondicionado, una buena y uniforme circulación de aire en el interior (Castillo, 2004).

#### **Etapa 4: Enraizamiento y elongación**

La etapa de enraizamiento de los brotes obtenidos, requiere del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, por ejemplo, el medio Murashige y Skoog en una dilución 50 % permite obtener resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, es decir, aumentar la concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de auxinas y disminuir la de citoquininas; en algunas especies, es suficiente la eliminación de las citoquininas para la estimulación del sistema radicular (Roca y Mroginski, 1993).

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o que solo posea hormonas de tipo auxinas. Algunas plantas no requieren de este paso, ya que, al tener auxinas endógenas, estas son las encargadas de inducir una respuesta de enraizamiento del explante, hasta obtener una plántula completa, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurre de forma simultánea (Castillo, 2004).

Las concentraciones de auxinas y citoquininas se deben establecer durante el proceso de enraizamiento, al observar el índice de enraizamiento que genera cada explante en el medio de cultivo por tratamiento efectuado (Castillo, 2004).

#### **Etapa 5: Aclimatación**

Los explantes que recién han sido enraizados suelen ser muy sensibles a los cambios ambientales, de tal forma que el éxito o el fracaso del establecimiento del cultivo *in vitro* dependerá del proceso de aclimatación. A pesar de que el proceso de enraizamiento *in vitro* o *ex vitro*, en el momento que se extraen a los explantes del medio de cultivo, estos están poco adaptados a crecer en un invernadero, debido a que en el medio de cultivo existe una humedad relativa elevada; además, que los estomas de sus hojas no están muy bien adaptadas para responder al descenso de humedad, ocurriendo así una desecación del explante (Castillo, 2004).

Al desarrollarse una plántula en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula de cérea bien desarrollada, la cual es una barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta que está en contacto con el medio ambiente. Para obtener excelentes resultados durante el proceso, los explantes deben ser aclimatados en un invernadero, donde se disminuye progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Castillo, 2004).

Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, asimismo, en esta etapa las plántulas sufren un estrés, provocado por el cambio de las condiciones ambientales, por lo tanto, la transferencia debe de realizarse de forma gradual.

#### **4.9. Factores ambientales a considerarse en condiciones *in vitro***

##### **4.9.1. Temperatura**

La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C (Mroginski y Roca, 1991). Sin embargo, Pierik (1990) manifiesta que la temperatura se mantiene constante de 24 a 26°C, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28-29 °C para especies tropicales. Asimismo, Chee et al., (1982) indica que se han variado los regímenes de temperatura en el día y la noche y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa.

##### **4.9.2. Humedad relativa**

En los cultivos *in vitro* la humedad relativa es alta, esto debido a la condensación de las paredes de los tubos o frascos en donde se encuentran y por lo general este explante *in vitro* no desarrolla sistemas adecuados de regulación hídrica como pueden ser cutículas, ceras o estomas (Laya et al., 1994).

De acuerdo con Pierik, (1990) la humedad relativa del aire del área donde se incuban, únicamente influye en pérdida de agua en tubos o frascos, sin embargo, Roca y Mroginski (1991), opinan que la humedad en el área de incubación debería ser entre el 70 a 80 %.

##### **4.9.3. Luz**

La luz es un factor fundamental en la morfogénesis y juega un papel importante en el proceso de micropropagación vegetal, ya que se considera su calidad, intensidad y fotoperiodo, ya que influyen directamente en el metabolismo de los individuos vegetales, en la síntesis y posterior acumulación de sustancias. Para proporcionar luz artificial, se emplea luz blanca a través de tubos fluorescentes (Villalobos et al., 1984; Pierik, 1990).

#### **4.9.4. Intensidad lumínica**

La intensidad luminosa se define como la cantidad de flujo luminoso que emite una fuente por unidad de ángulo sólido, además, permiten determinar el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro* (Alcántara et al., 2017). En general se ha observado que las plantas producidas por cultivo de tejidos una vez trasplantadas, muestran el mejor desarrollo y mayores porcentajes de sobrevivencia si al principio se mantienen a intensidades lumínicas bajas, alrededor de 1,5 kilolux.

#### **4.9.5. Fotoperiodo**

Es un proceso regulado que tiene lugar en el momento en el cual las hojas de una planta reconocen el fotoperiodo a través del uso de los receptores denominados fitocromos y fotorreceptores y mandan señales al a los ápices para su desarrollo. El individuo vegetal, como afirma Sebastián y Aguirre (2012) depende de la luz para hacer fotosíntesis, si bien en varios cultivos *in vitro*, las vitroplantas dependen de la calidad e intensidad de la luz; el mismo que se ajusta a es de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, lo cual contribuye en su crecimiento, formación de brotes y raíces.

#### **4.9.6. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

#### **4.9.7. Explante**

Hace referencia a un fragmento de una planta, es decir, célula, tejido u órganos en específico como puede ser el caso de anteras, semillas, botones florales, ovarios u otros, e incluso células individuales que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo.

El éxito del cultivo *in vitro* se ve influenciado parcialmente por los factores del explante, como pueden ser el tamaño, estado de desarrollo de la especie, edad fisiológica del explante y fuente del tejido u órgano (Conger, 2018).

#### **4.9.8. Material Vegetal**

Según Narváez (2009) y Ramos (2012) la 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. En general, factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar.

#### **4.9.9. Factores físicos que inciden en el cultivo in vivo**

##### **4.9.10. pH**

Es el grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo, es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que ocurre en el suelo, por lo tanto, es necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio (Abdelnour y Escalant, 1994).

##### **4.9.11. Humedad del sustrato**

En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es de casi el 100 %, por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica, tales como cera, estomas, cutícula, etc. (Abdelnour y Escalant, 1994).

##### **4.9.12. Luz**

En condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad y calidad de la luz es muy bajo. La calidad de la luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala, para tener diferentes longitudes de ondas. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros (Abdelnour y Escalant, 1994).

#### **4.10. Principales estrategias utilizadas en el cultivo *in vitro*, para evitar o disminuir los problemas oxidativos en los explantes vegetales.**

- Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
- Crecimiento del explante en condiciones de fotoperiodo o en oscuridad.
- Crecimiento del explante en una temperatura baja.
- Subcultivos frecuentes.
- Cultivo en medio líquido.
- Uso de adsorbentes, antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
- Elección del medio de cultivo, reguladores del crecimiento.
- Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.
- pH del medio de cultivo bajo.
- Inactivación de enzimas (Azofeifa, 2009).

#### 4.10.1. Oxidación fenólica

La oxidación fenólica es un aspecto común que presentan los tejidos vegetales de las especies que contienen taninos, como resultado de una herida y suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido causando la abstención del crecimiento, en los casos graves da lugar, a la necrosis y muerte del tejido.

La oxidación fenólica puede en ocasiones ser un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos, ápices, segmentos nodales y hojas, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo, que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio de cultivo, produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte (Medero et al., 1999).

#### 4.11. Estudios similares sobre inducción de brotes *de novo*, a partir de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

Lima (2018) reportan un estudio sobre “Inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., de relictos boscosos de la provincia de Loja”, para la inducción de estructuras *de novo* realizaron dos ensayos; el primer ensayo evaluó el efecto de ácido indol acético (AIA) y kinetina (KIN), el medio de cultivo sólido se preparó en base a las sales minerales de MS, en tres combinaciones de: AIA (0,2; 0,4 y 0,6 mg L<sup>-1</sup>) y KIN (1,0; 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>). En el segundo ensayo se evaluaron el efecto del benzil amino purina (BAP), para lo cual, prepararon el medio de cultivo en base a las sales minerales de la solución nutritiva del MS y en tres concentraciones de: benzil amino purina (1,0; 1,5 y 2,0 mg L<sup>-1</sup>). El mejor porcentaje de formación de estructuras *de novo*, *Cinchona officinalis* L., obtuvieron con el medio de cultivo en la combinación de AIA (0,0 mg L<sup>-1</sup>) y KIN (1,0 mg L<sup>-1</sup>) con 17,77; y, en el segundo ensayo los tratamientos que tuvieron únicamente han presentado porcentajes de formación de estructuras *de novo* inferiores al 2 %, es decir, las combinaciones hormonales AIA – KIN no ejercieron un efecto significativo sobre la cantidad y calidad de las estructuras *de novo* y con el uso de una sola citoquinina BAP se evidenció que a medida que se incrementó la concentración de BAP, el porcentaje de formación de estructuras *de novo* fue menor.

Eras, et al., (2019) realizaron el Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja, en donde utilizaron medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), suplementado con auxinas y citocininas en diferentes concentraciones; para brotamiento: ácido indol acético (0,0; 0,2; 0,5 mg L<sup>-1</sup>) y benzil amino purina (BAP) (2,0 y 2,5

mg L<sup>-1</sup>) y para enraizamiento ácido indol butírico (0,0; 0,2; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) y BAP (0,0 y 0,5 mg L<sup>-1</sup>). En el tratamiento T2 (0,0 mg L<sup>-1</sup> AIA + 2,5 mg L<sup>-1</sup> BAP) obtuvo mayor porcentaje de brotación con 97,78 %. Así también, el T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> AIB + 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP), presentó mayor porcentaje de enraizamiento con 46,11 %; Por lo tanto, en esta investigación comprobaron que, a mayor concentración de citoquininas, mayor estimulación de brotes; y, al ser combinadas con auxinas a altas concentraciones se estimulan la formación de raíces.

Además, Eras, et al., (2019) reportan un estudio denominado: Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja., para la formación de estructuras *de novo* se utilizó un medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), vitaminas, suplementado con ácido naftalen acético (0,3; 0,6 y 0,9 mg L<sup>-1</sup>) y BAP (1,0; 1,5 y 2,0 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente. El mejor porcentaje de formación de estructuras *de novo*, obtuvieron con el medio de cultivo conformado por 0,3 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP con 20 % de nuevas estructuras a partir de callos.

Méndez (2018) realizó un estudio sobre “Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” para la fase de formación de estructuras *de novo*, los callos fueron inoculados en medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog suplementado con auxinas y citoquininas en tres concentraciones: en 0,3; 0,6 y 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA y benzil amino purina (1,0; 1,5; y 2,0 mg L<sup>-1</sup>). En la etapa final del presente estudio se logró determinar que el mejor medio de cultivo para la formación de estructuras *de novo* de material proveniente del sector Uritusinga estuvo suplementado con 0,6 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalen acético (ANA) y 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP alcanzando el 14,54 % de formación de estructuras *de novo*; mientras que para el sitio de Zamora Huayco la combinación en 0,3 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP con resultó ser la más afectiva obteniéndose un 20 % de formación de estructuras *de novo*.

Camacho (2022) en su estudio denominado: Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad se utilizó un medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), vitaminas, suplementado con ANA (1,0; 2,0; y 2,0 mg L<sup>-1</sup>) y KIN (0,5; 0,5 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente. En condiciones de fotoperíodo, el mejor porcentaje de formación de brotes adventicios, obtuvieron con el medio de cultivo del tratamiento conformado por 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de KIN con 40 % de formación de raíces; y, en condiciones de oscuridad, el mayor porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas, obtuvieron con el

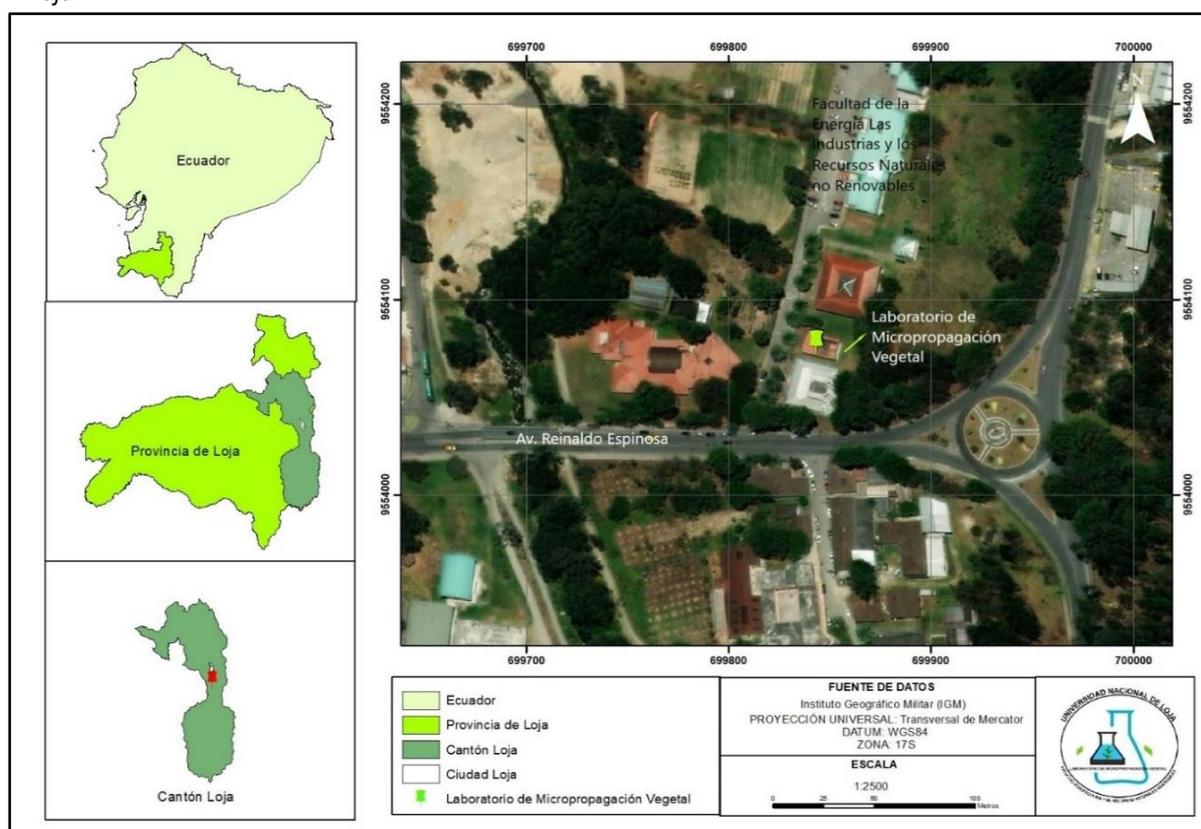
medio de cultivo de (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) y (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 37 % de raíces.

## 5. Metodología

### 5.1. Ubicación del sitio de estudio

La presente investigación se ejecutó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja, ubicado entre las siguientes coordenadas geográficas: 04°1'56,18" S; 79°12'0,07" O (Figura 2), en el marco del proyecto macro titulado: **“Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.”**.

**Figura 2.** Localización del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.



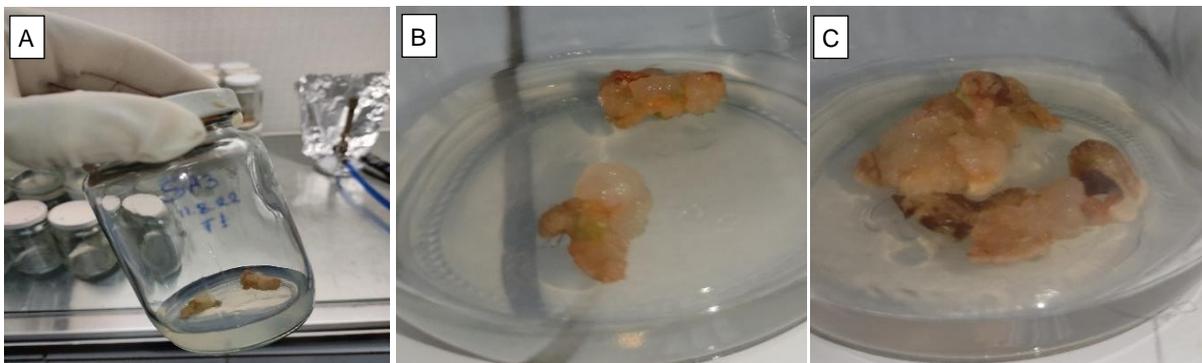
### 5.2. Metodología para evaluar el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas, en la inducción de brotes *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

Para el cumplimiento de este objetivo se contó con material vegetal proveniente de vitroplantas, el mismo que viene creciendo en condiciones controladas de asepsia, en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

### 5.1.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal que se utilizó para la inducción *in vitro* de brotes *de novo*, provino de la selección de callos friables de *Cinchona officinalis* L., con un tamaño de 1 a 2 cm y un color carmelita, lo que evidenció vitalidad del material vegetal seleccionado (Figura 3); los callos friables fueron previamente, generados en la fase de callogénesis previamente establecida, a partir de explantes del árbol semillero N° 3, ubicado en el relicto boscoso del sitio Selva Alegre, cantón Saraguro, provincia de Loja, el mismo que fue identificado por el Proyecto de Investigación *Cinchona* en el año 2016. Los callos no recibieron tratamiento de desinfección, por tratarse de material aséptico.

**Figura 3.** Ilustraciones de estructuras callogénicas del árbol semillero N° 3 del sitio Selva Alegre: A) Preselección de estructuras callogénicas; B y C) Callos que denotan vitalidad.



### 5.2.1. Preparación del medio de cultivo sólido

En la Figura 4 se muestra cómo se preparó el medio de cultivo sólido con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), el cual fue suplementado con las vitaminas: Tiamina  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  y mio-inositol  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ; además, se adicionó como fuente de carbohidratos la sacarosa al 2,0 % y como agente solidificante el agar al 0,6 %; los reguladores de crecimiento empleados fueron: Benzil Amino Purina (BAP) y Kinetina (KIN) en dos concentraciones hormonales, de acuerdo a los tratamientos ensayados (Tabla 3).

**Tabla 3.**

*Tratamientos evaluados para la inducción in vitro de brotes de novo, de Cinchona officinalis L., provenientes de estructuras calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.*

N°.	Tratamientos	Reguladores de Crecimiento		Codificación
		BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg L <sup>-1</sup> )	
1	T0	0,0	0,0	T0FP
2	T1	2,0	0,0	T1BAP2K0 FP
3	T2	3,0	0,0	T2BAP3K0 FP
4	T3	0,0	2,0	T3BAP0K2 FP
5	T4	0,0	3,0	T4BAP0K3 FP

Leyenda: T: Tratamiento. BAP: Benzil amino purina. K: Kinetina. FP: Fotoperiodo.

El pH del medio del cultivo se ajustó de  $5,8 \pm 0,2$ ; seguidamente, se distribuyó a razón de 25 ml en cada frasco de vidrio tipo compota; finalmente fueron esterilizados en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 minutos. Al mismo tiempo se colocaron a esterilizar los materiales de disección: pinzas, mango de bisturí, cajas Petri con láminas de papel y algodón para garantizar las condiciones de asepsia del material utilizado.

**Figura 4.** Preparación del medio de cultivo MS-1962 + KIN y BAP: A) Soluciones minerales del medio de cultivo MS-1962; B) Adición de vitaminas y reguladores de crecimiento; C) Filtración y aforo del medio de cultivo.

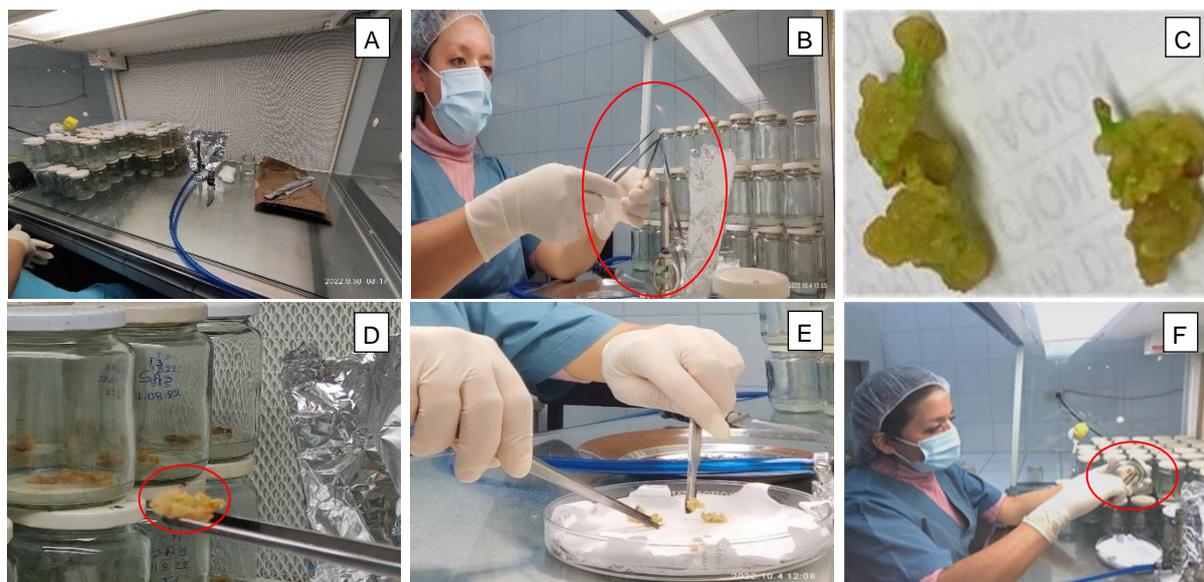


### 5.2.2. Inoculación *in vitro* de callos

En la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia se realizó la inoculación *in vitro* de callos friables de *Cinchona officinalis* L. obtenidos en la fase de calogénesis previamente establecida, se seleccionaron callos con características sobresalientes: que presentaron un color carmelita el mismo que evidenció vitalidad del explante; y, un tamaño del callo de 1 a 2 cm, los cuales no recibieron tratamiento de desinfección por tratarse de material *in vitro*, siendo inoculados a razón de dos callos por frasco de vidrio; posteriormente fueron etiquetados y trasladados al cuarto de incubación, donde se mantuvieron incubados a una temperatura de 25 °C y en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 de oscuridad), para

lo cual se cubrieron con una caja de cartulina de color negro. Las evaluaciones se realizaron por observación directa cada 3 a 4 días, a partir del tercer día de la inoculación durante 90 días (Figura 5).

**Figura 5.** Inoculación *in vitro* en la de cámara de flujo laminar: A) Material de disección, frascos con el medio de cultivo de MS-1962; B) Flameo de los materiales de inoculación *in vitro*; C y D) Selección de callos friables; E) Disección de callos; F) Inoculación *in vitro* del callo en el medio de cultivo.



### 5.2.3. Factores y niveles

En la Tabla 4 se muestran los factores y niveles evaluados, para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo condiciones de fotoperiodo.

**Tabla 4.**

*Factores y niveles de las concentraciones de citoquininas, para la inducción de estructuras de novo de Cinchona officinalis L., provenientes de vitroplantas, en condiciones de fotoperiodo (16/8).*

Factores		Niveles (mg L <sup>-1</sup> )
Nivel de concentraciones	BAP (C1)	1. 0,0
		2. 2,0
		3. 3,0
	Kinetina (C2)	1. 0,0
		2. 2,0
		3. 3,0

Leyenda: BAP: Benzil amino purina; C1: Citoquinina 1; C2: Citoquinina 2.

### 5.2.4. Diseño experimental

En esta fase se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial con cinco tratamientos incluido el testigo y tres repeticiones por tratamiento,

cada tratamiento estuvo conformado por 15 frascos, con dos callos por frasco, 30 callos por tratamiento y 150 callos en total del ensayo. La unidad experimental fue un callo (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*Especificaciones del diseño experimental, para la inducción de brotes de novo, a partir de estructuras callogénicas de Cinchona officinalis L., en condiciones de fotoperiodo (16/8).*

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>UNIDAD</b>
Unidad Experimental	Un callo
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos por tratamiento	15
Número de callos por frasco	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	30
Número de unidades experimentales del ensayo (callos)	150
Número total de frascos del ensayo	75

### **5.2.5. Hipótesis del modelo**

**H<sub>0</sub>:** El fotoperiodo y las concentraciones hormonales de dos citoquininas: BAP y KIN, no influyen en la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

**H<sub>1</sub>:** El fotoperiodo y las concentraciones hormonales de dos citoquininas: BAP y KIN, influyen en la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

### **5.2.6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo (16/8) y la concentración hormonal de BAP y KIN.**

A continuación, en la Tabla 6 y Figura 6 se detallan la distribución de los tratamientos y repeticiones, en el cuarto de incubación.

**Tabla 6.**

*Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la concentración hormonal de BAP y KIN.*

T0- FP			T1-BAP2K0- FP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T2-BAP3K0- FP			T3-BAP0K2- FP		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T4-BAP0K3- FP					
R1	R2	R3			

Leyenda: Tn: Tratamiento; FP: Fotoperiodo; Rn: Número de repetición; BAP: Benzil Amino Purina; K: Kinetina.

**Figura 6.** *Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación, con aplicación de la concentración hormonal de dos citoquininas y el fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.*



Leyenda: T: tratamiento. BAP: Benzil Amino Purina. KIN: Kinetina.

#### 5.2.6.1. Variables evaluadas

Las evaluaciones se realizaron después de la inoculación *in vitro* de los callos, por observación directa con intervalos de 3 y 4 días, a partir del segundo día de la inoculación, durante un periodo de 90 días, dónde se registró las siguientes variables:

- Número de días a la contaminación
- Número de estructuras callogénicas contaminadas
- Número de estructuras callogénicas fenolizadas
- Número de estructuras callogénicas muertas
- Número de días a la formación de estructuras *de novo*
- Número de estructuras *de novo* por callo
- Longitud de las estructuras *de novo*

### 5.2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos de la contaminación, mortalidad y oxidación fenólica de las estructuras callogénicas, durante los 90 días de evaluación se utilizó la Tabla 7.

**Tabla 7.**

*Matriz para evaluar el registro de la contaminación, mortalidad y oxidación fenólica de los callos de Cinchona officinalis L.*

Tratamientos	N° de repeticiones	N° de frascos	N° callos	N° callos contaminados	N° callos muertos	N° de estructuras callogénicas Fenolizadas
Tn	Rn	Fn	C1			
			C2			

Leyenda: Tn: Número de tratamientos. Rn: Número de repetición. Fn: Número de frasco. C: callo.

Para el registro de la variable número de días a la formación de estructuras *de novo*, número y longitud de brotes *de novo* por callo, se utilizó la Tabla 8.

Tabla 8.

*Matriz para evaluar el número de días a la formación de estructuras de novo, número y longitud de brotes de novo por callo.*

Fecha de evaluación:				Fecha de siembra:		
Condiciones:				Días transcurridos:		
N° Tratamientos	N° de repeticiones	N° de frascos	N° callos	Días a la formación de brotes <i>de novo</i>	N° brotes <i>de novo</i>	Longitud de raíces (mm)
Tn	Rn	Fn	C1			
			C2			

Leyenda: Tn: Número de tratamientos. Rn: Número de repetición. Fn: Número de frasco. C: callo.

### 5.2.8. Análisis estadístico de los datos correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo (16/8).

Para el análisis estadístico de los datos, luego de comprobar que los datos siguieron una distribución normal y son homocedásticos, se utilizó 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 la existencia de diferencias significativas en sus medias y varianzas.

### 5.3. Metodología para evaluar el efecto de la oscuridad total y dos citoquininas, en la inducción de brotes *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

#### 5.3.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal que se utilizó para la fase de inducción *in vitro* de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., fueron callos friables obtenidos de la fase de callogénesis de siembras anticipadas, realizadas en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, para su selección se consideró los callos que presentaron color carmelita y con un tamaño de 1 a 2 cm (Figura 7).

**Figura 7.** Fase de callogénesis: A) Siembras anticipadas de explantes; B) Callos de *Cinchona officinalis* L.; C) Callos friables obtenidos en el LMV.



#### 5.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido

El medio de cultivo sólido se preparó con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con las vitaminas: Tiamina  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  y mio-inositol  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ; se adiciono como fuente de carbohidratos la sacarosa al 2 %; y un agente gelificante el agar al 0,6 %; los reguladores de crecimiento aplicados fueron: Benzil Amino Purina (BAP) y Kinetina (KIN) en tres concentraciones hormonales, de acuerdo a los tratamientos ensayados (Tabla 9).

**Tabla 9.**

*Tratamientos evaluados para la inducción in vitro de brotes de novo de Cinchona officinalis L., provenientes de estructuras callogénicas, en condiciones de oscuridad total.*

N°	Tratamientos	Reguladores de Crecimiento		Codificación
		BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg L <sup>-1</sup> )	
1	T0	0,0	0,0	T0FP
2	T1	2,0	0,0	T1BAP2K0 OSC
3	T2	3,0	0,0	T2BAP3K0 OSC
4	T3	0,0	2,0	T3BAP0K2 OSC
5	T4	0,0	3,0	T4BAP0K3 OSC

Legenda: T: Tratamiento. BAP: Benzil amino purina. K: Kinetina. OSC: Oscuridad.

El pH del medio de cultivo se ajustó de  $5,8 \pm 0,2$ ; luego, se colocó 25 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio tipo compota; posteriormente, fueron esterilizados en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos. Además, se esterilizaron los materiales de disección en la autoclave, para garantizar condiciones de asepsia del material utilizado.

### 5.3.3. Inoculación *in vitro* de callos

La inoculación *in vitro* de los callos de *Cinchona officinalis* L., para la inducción de brotes *de novo*, se realizó en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar, a partir de callos con características sobresalientes (tamaño y color); cabe señalar que, no recibieron tratamiento de desinfección por tratarse de material *in vitro*; posteriormente, fueron inoculados a razón de dos callos por frasco; asimismo, fueron etiquetados y ubicados en el cuarto de incubación a una temperatura de 25 °C, en condiciones de oscuridad total, para lo cual se cubrieron con una caja de cartulina de color negro. Finalmente, las evaluaciones se realizaron por observación directa cada 3 días, a partir del segundo día de la inoculación, durante un periodo de 90 días (Figura 8).

**Figura 8.** Incubación de estructuras callogénicas: A) Etiquetado y montaje del ensayo en el cuarto de incubación; B) Evaluación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.



#### 5.3.4. Factores y niveles

Los factores y niveles evaluados, para la inducción de estructuras *de novo*, de *Cinchona officinalis* L., bajo condiciones de oscuridad total, se detallan en la Tabla 10.

**Tabla 10.**

*Factores y niveles de las concentraciones de citoquininas, para la inducción de estructuras de novo de Cinchona officinalis L., provenientes de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.*

Factores		Niveles (mg L <sup>-1</sup> )
Nivel de concentraciones	BAP (C1)	1.0,0
		2.2,0
		3.3,0
	Kinetina (C2)	1.0,0
		2.2,0
		3.3,0

Leyenda: BAP: Benzil amino purina. C1: Citoquinina 1. C2: Citoquinina 2.

##### 5.3.4.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial, constituido por cinco tratamientos incluido el testigo y tres repeticiones por tratamiento, cada

tratamiento estuvo conformado por 15 frascos, con dos callos por frasco, 30 callos por tratamiento y 150 callos en total del ensayo. La unidad experimental fue un callo (Tabla 11).

**Tabla 11.**

Especificaciones del diseño experimental, para la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., provenientes de estructuras callogénicas de vitroplantas, en condiciones de oscuridad total.

DESCRIPCIÓN	UNIDAD
Unidad Experimental	Un callo
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos por tratamiento	15
Número de callos por frasco	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	30
Número de unidades experimentales del ensayo (callos)	150
Número total de frascos del ensayo	75

### 5.3.5. Hipótesis del modelo

**H<sub>0</sub>:** La oscuridad y las concentraciones hormonales de dos citoquininas (benzil amino purina y kinetina), no influyen en la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

**H<sub>1</sub>:** La oscuridad y las concentraciones hormonales de dos citoquininas (benzil amino purina y kinetina), influyen en la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

### 5.3.6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la concentración hormonal de BAP y KIN.

En la Tabla 12 se detalla la distribución de los 5 tratamientos y 3 repeticiones, en el cuarto de incubación.

**Tabla 12**

Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad y la concentración hormonal de BAP y KIN.

T0-OSC			T1-BAP2K0-OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T2-BAP3K0-OSC			T3-BAP0K2-OSC		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T4-BAP0K3-OSC					
R1	R2	R3			

Leyenda: Tn: Tratamiento. OSC: Oscuridad. Rn: Número de repetición. BAP: Benzil Amino Purina. K: Kinetina.

### 5.3.7. Variables evaluadas

Las evaluaciones se realizaron después de la inoculación *in vitro* de los callos, por observación directa, con intervalos de tres y cuatro días a partir del segundo día de la inoculación durante un periodo de 90 días, dónde se registraron las siguientes variables:

- Número de días a la contaminación
- Número de estructuras callogénicas contaminadas
- Número de estructuras callogénicas fenolizadas
- Número de estructuras callogénicas muertas
- Número de días a la formación de estructuras *de novo*.
- Número de estructuras *de novo* por callo
- Longitud de las estructuras *de novo*.

#### 5.3.7.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos de la contaminación, mortalidad y oxidación fenólica de las estructuras callogénicas, durante los 90 días de evaluación, se utilizó la Tabla 13.

**Tabla 13.**

Matriz para evaluar el registro de la contaminación, mortalidad y oxidación fenólica de los callos de *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	N° de repeticiones	N° de frascos	N° callos	N° callos contaminados	N° callos muertos	N° de estructuras callogénicas
						fenolizadas
Tn	Rn	Fn	$\frac{C1}{C2}$			

Leyenda: Tn: Número de tratamientos. Rn: Número de repetición. Fn: Número de frasco. C: callo.

Para el registro del número de días a la formación de estructuras *de novo*, número y longitud de brotes *de novo* por callo, se utilizó la Tabla 14.

**Tabla 14.**

Matriz para evaluar el número de días a la formación de estructuras *de novo*, número y longitud de brotes *de novo* por callo.

Fecha de evaluación:			Fecha de siembra:			
Condiciones:			Días transcurridos:			
N° Tratamientos	N° de repeticiones	N° de frascos	N° callos	Días a la formación de brotes <i>de novo</i>	N° brotes <i>de novo</i>	Longitud de raíces (mm)
Tn	Rn	Fn	C1			
			C2			

Leyenda: Tn: Número de tratamientos. Rn: Número de repetición. Fn: Número de frasco. C: callo

### 5.3.8. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de la oscuridad total.

Para el tratamiento estadístico de los datos, luego de comprobar que los datos siguieron una distribución normal y son homocedásticos, se utilizó 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 la existencia de diferencias significativas en sus medias y varianzas.

### 5.4. Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

Para dar cumplimiento a este objetivo de difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación, se realizaron las siguientes actividades:

- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte del Simposio Internacional de Ciencias Forestales: "Bosque, Agua y Biodiversidad", organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona*, que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un tríptico y póster para la difusión de resultados del Trabajo de Integración Curricular.

- Elaboración de un manual técnico con los resultados obtenidos del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un manuscrito de artículo científico, con los resultados obtenidos en la presente investigación.
- Elaboración y publicación del documento del Trabajo de Integración Curricular.

## 6. Resultados

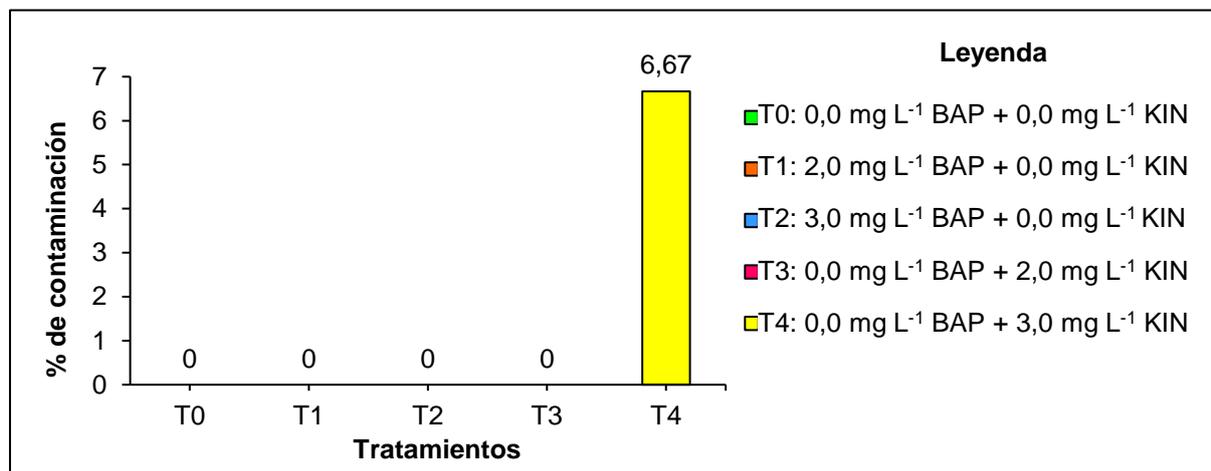
### 6.1. Efecto del fotoperiodo y dos citoquininas en diferentes concentraciones, para la inducción de brotes *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

#### 6.1.1. Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

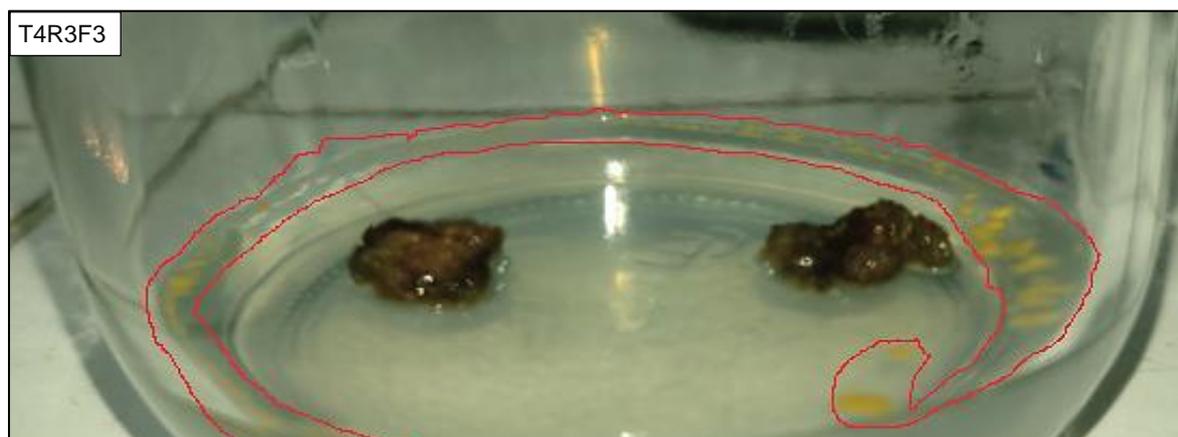
Como se muestra en la figura 9, el porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas fue baja y se registró a partir del tercer día después de la inoculación *in vitro*, durante 90 días; en donde, en los tratamientos T0 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T1 contenía 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T2 compuesto por 3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN y T3 por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, no presentaron contaminación alguna (0 %); mientras que en el T4 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, se presentó tan solo el 6,67 % de contaminación en los callos, a los 66 días de evaluación.

En la figura 10 se muestra que la principal causa de la contaminación fue por bacterias las mismas que rápidamente se dispersaron sobre el medio de cultivo sin afectar a los callos, específicamente en el tratamiento T4R3F3.

**Figura 9.** Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en tres concentraciones hormonales de BAP y KIN, en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



**Figura 10.** Contaminación por bacterias al medio de cultivo, en el tratamiento T4R3F3.

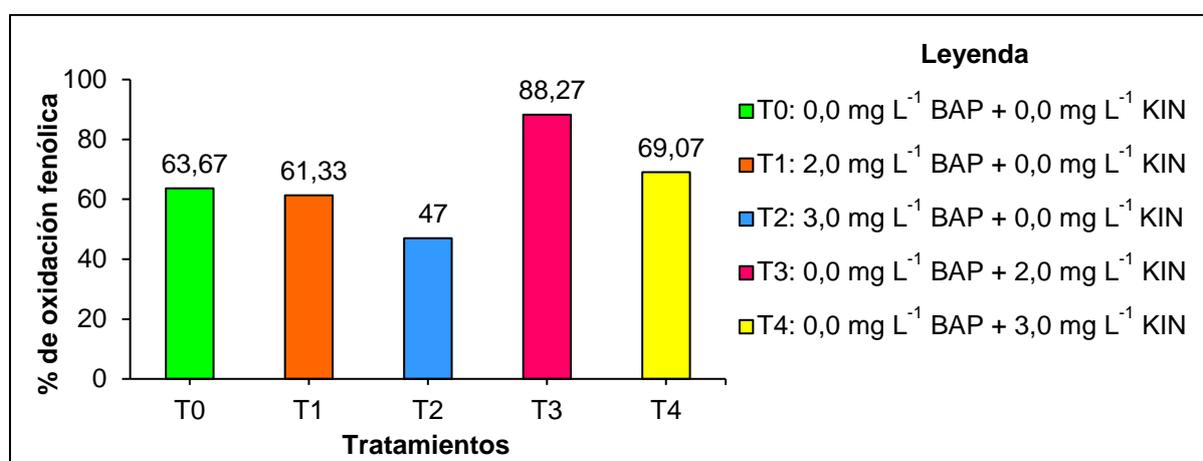


Legenda: T: número tratamiento, R: número repetición, F: número de frasco.

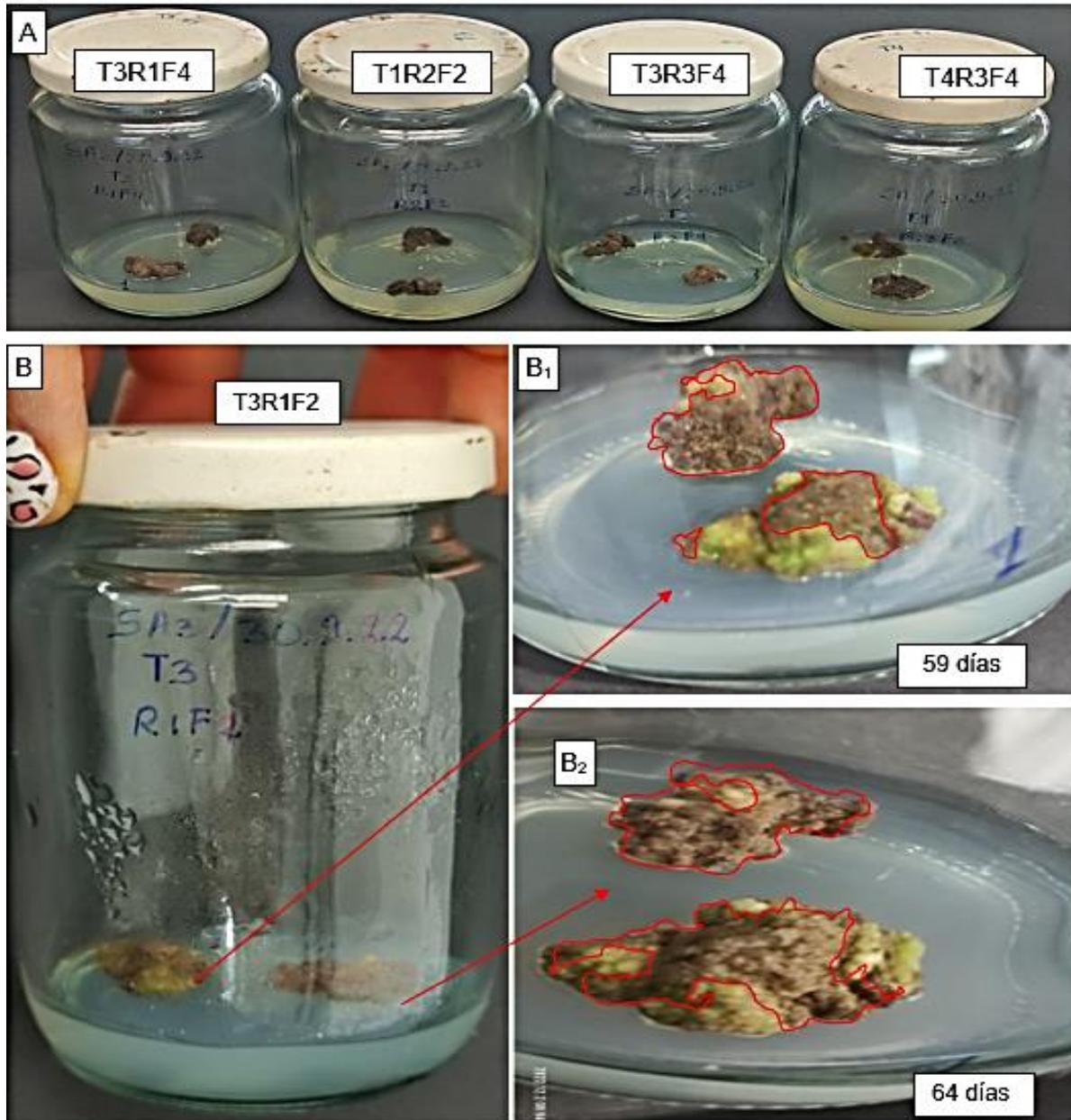
### 6.1.2. Porcentaje de la oxidación fenólica de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

En la Figura 11 y 12, se presenta la evaluación de la variable oxidación fenólica en las estructuras callogénicas y morfogénicas, durante los 90 días de evaluación, inició a partir de los 20 días después de la inoculación y el mayor porcentaje de oxidación fenólica se presentó en el tratamiento T3 suplementado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN con 88,27 %; seguido del T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 69,07 %; mientras que el tratamiento testigo T0 que no se le adicionó citoquininas y alcanzó un 63,67 %. Los menores porcentajes de oxidación fenólica se obtuvieron en los tratamientos T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 61,33 y 47 %, respectivamente.

**Figura 11.** Porcentaje de oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en las tres concentraciones hormonales de BAP y KIN, en condiciones de fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.



**Figura 12.** Ilustraciones de la oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. en los tratamientos, a los 90 días de evaluación; A, B, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) Avance de la oxidación fenólica a los 59 y 62 días en el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN).



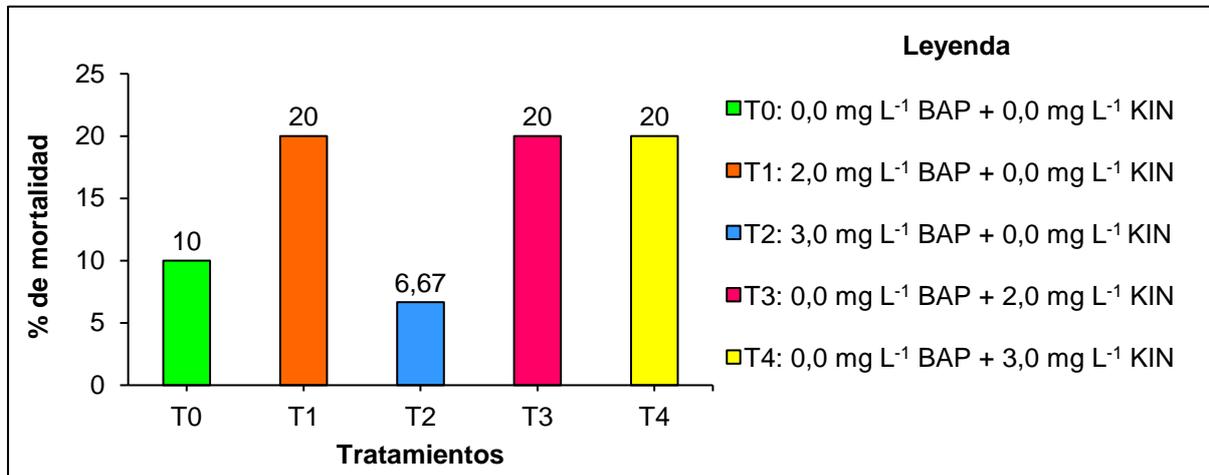
Leyenda: T: tratamiento. R: repetición. F: número de frasco.

### 6.1.3. Porcentaje de mortalidad de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo oscuridad, a los 90 días de evaluación.

Como se muestra en la Figura 13, los resultados del porcentaje de mortalidad de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, fueron relativamente bajos, en donde el tratamiento T1 suplementado por 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, T3 con 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzaron el mayor porcentaje de mortalidad con el 20 %, respectivamente. En los

tratamientos T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) se obtuvieron los menores porcentajes de mortalidad con 10 y 6,67 %, respectivamente.

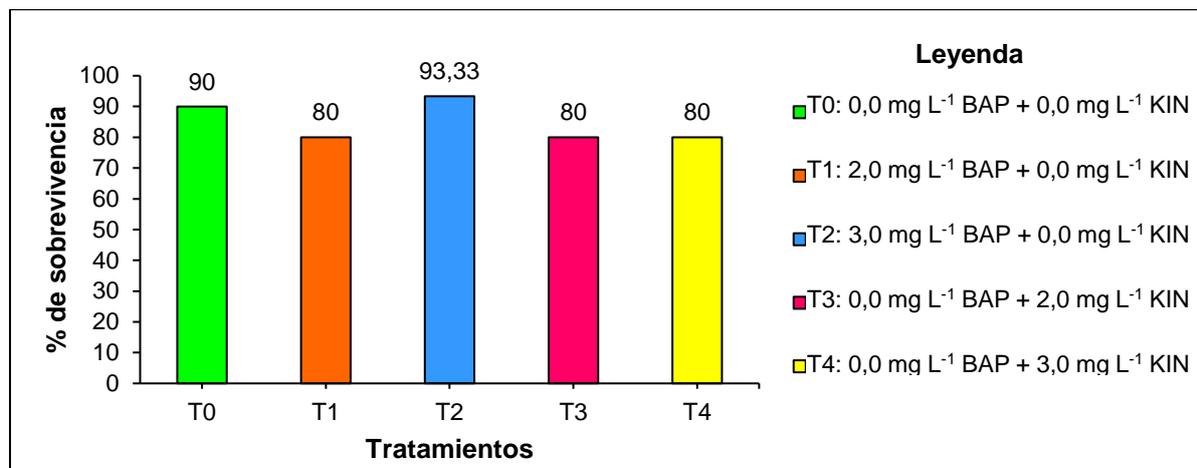
**Figura 13.** Porcentaje de mortalidad de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



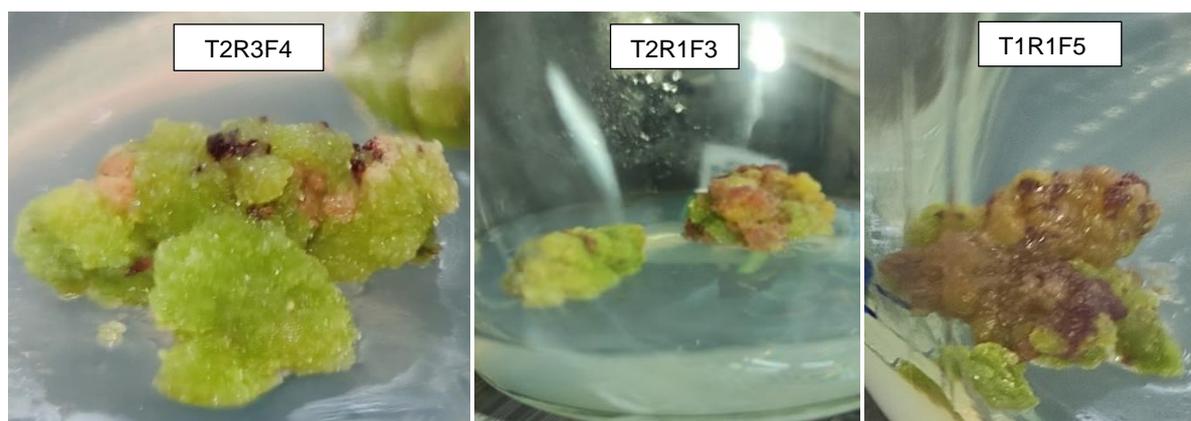
#### 6.1.4. Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

En lo que concierne a la variable sobrevivencia de las estructuras callogénicas, en la Figura 14 se observa que el mayor porcentaje se presentó en el T2, conformado por 3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN con 93,33 %; seguido del T0 con 90 %; a diferencia de los tratamientos T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), presentaron un menor porcentaje con el 80 % de sobrevivencia, durante los 90 días de evaluación como se observa en la Figura 15.

**Figura 14.** Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



**Figura 15.** Ilustraciones del estado de sobrevivencia en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

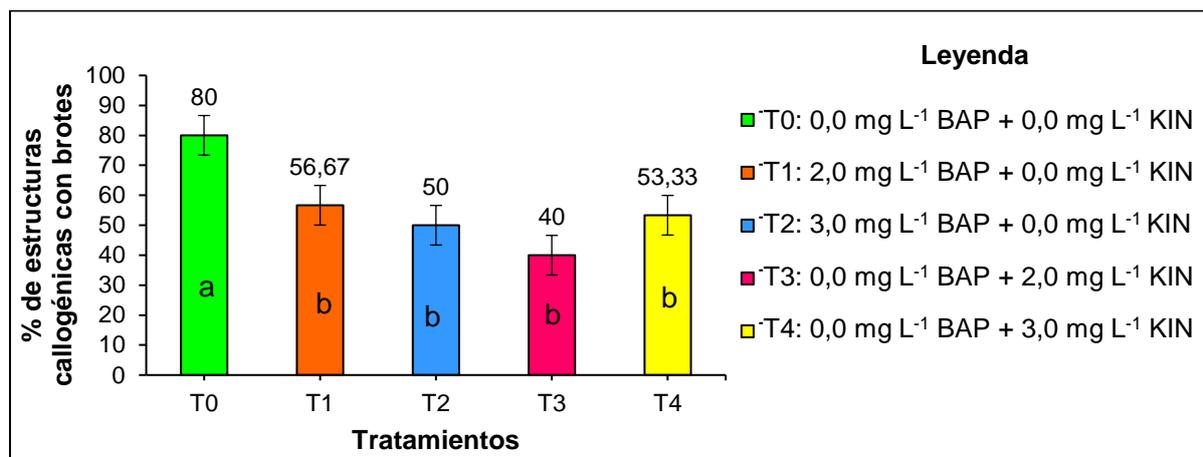


Leyenda: T: número tratamiento. R: número repetición. F: número de frasco.

### 6.1.5. Porcentaje de formación de brotes *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación

En lo que se refiere al porcentaje de estructuras callogénicas que formaron brotes *de novo*, durante los 90 días de evaluación, en la Figura 16, se muestra que el mayor porcentaje se registró en el tratamiento testigo T0, que no tuvo ninguna citoquinina con el 80 %; seguido del T1 suministrado por 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, que presentó el 56,67 %; el T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con el 53,33 %. Los tratamientos que presentaron los menores porcentajes de estructuras callogénicas en la formación de brotes *de novo* fueron el T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con un 50 y 40 % respectivamente. Al aplicar el análisis de varianza y la prueba estadística de significancia al 0,05 %, se demostró que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

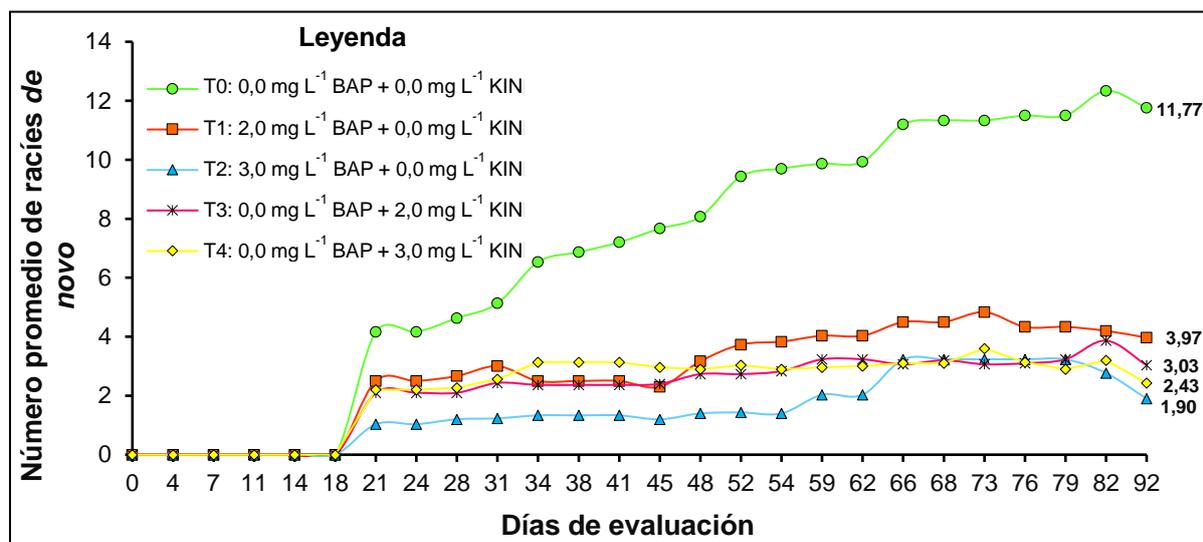
**Figura 16.** Porcentaje de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. con brotes de novo, en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



**6.1.6. Número promedio de brotes de novo en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas en diferentes concentraciones, a los 90 días de evaluación.**

En lo relacionado a la variable del número promedio de brotes *de novo* en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación en la Figura 17 se evidencia que, en las mismas se desarrollaron estructuras morfogénicas en forma de raíces adventicias sobre las estructuras callogénicas, en donde, en el T0 que no estuvo conformado por ninguna citoquinina, la formación raíces adventicias se inició a partir del día 21, alcanzando un número de 11,67 raíces *de novo*; seguido del T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 3,97 y 3,03 respectivamente; mientras que los tratamientos que registraron el menor número promedio fueron el T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 2,43 y 1,90 raíces *de novo*, respectivamente. El análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher, mostró la existencia de diferencia estadística significativa, entre los tratamientos ensayados ( $p < 0,05$ ; F: 0,02879).

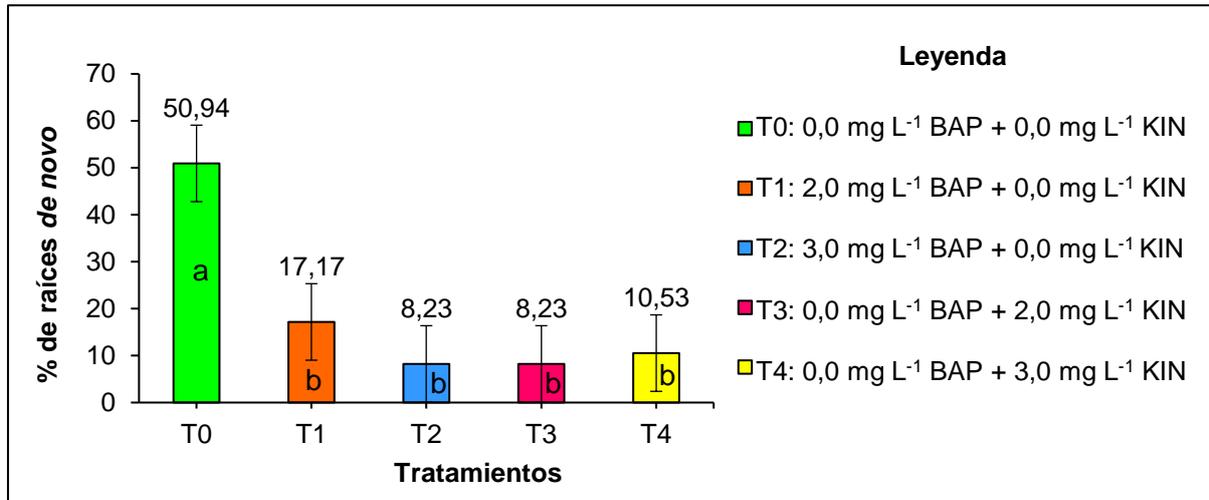
**Figura 17.** Curva acumulativa del número promedio de formación raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



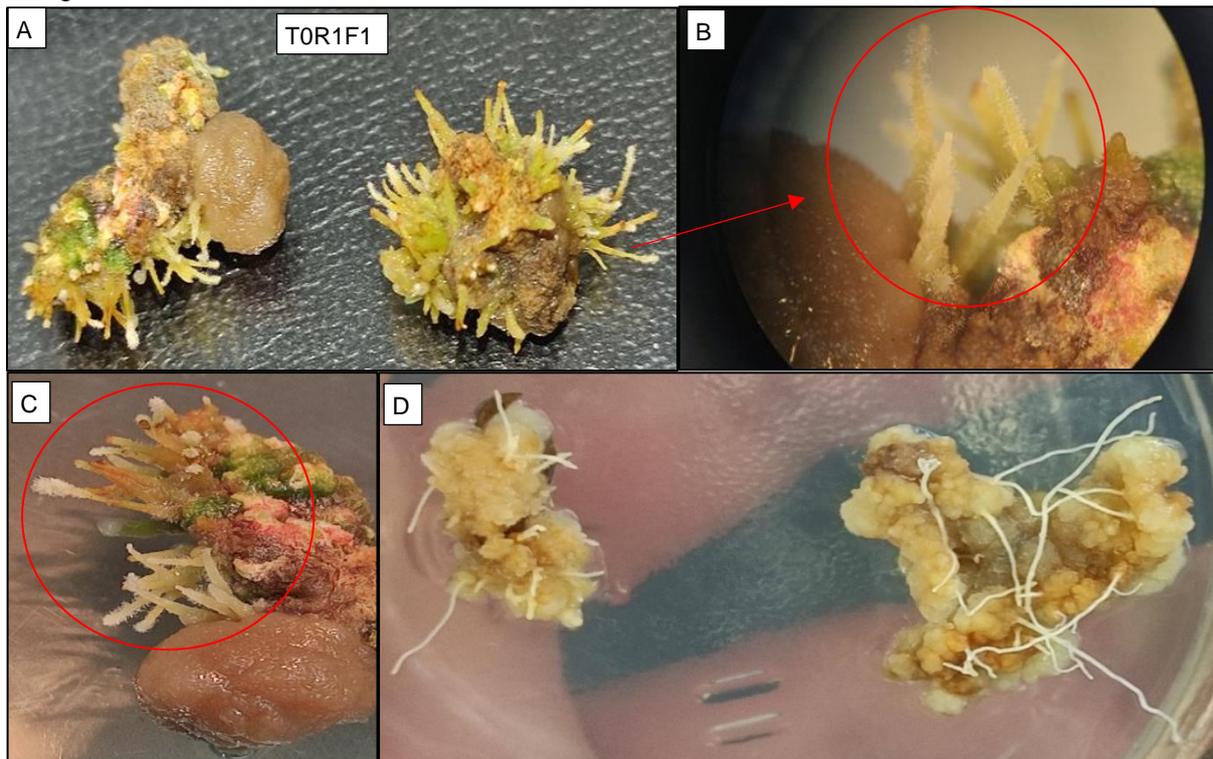
**6.1.7. Porcentaje promedio de formación de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones del fotoperiodo y dos citoquininas en tres concentraciones, a los 90 días de evaluación.**

En lo que se refiere al porcentaje promedio de formación de raíces de novo, a partir de estructuras callogénicas, durante los 90 días de evaluación, en fotoperiodo (16/8) en la Figura 18, se muestra que el mayor porcentaje se registró en el tratamiento testigo T0 que no tuvo ninguna citoquinina, con el 50,94 %; seguido del T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 17,17 y 10,53 %, respectivamente; en tanto que, en los tratamientos T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) se obtuvieron los menores porcentajes con el 8,23 %, respectivamente, lo cual se puede ilustrar en la Figura 19 . Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher, mostró la existencia de diferencia estadística significativa, entre los tratamientos ensayados (p<0,05).

**Figura 18.** Porcentaje promedio de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.



**Figura 19.** Formación de raíces de novo a partir de callos: A, B, C) Inducción de raíces de novo a los 82 días en T0R1F1; D) Incremento de masa fresca de células indiferenciadas en las estructuras callogénicas en el T0.

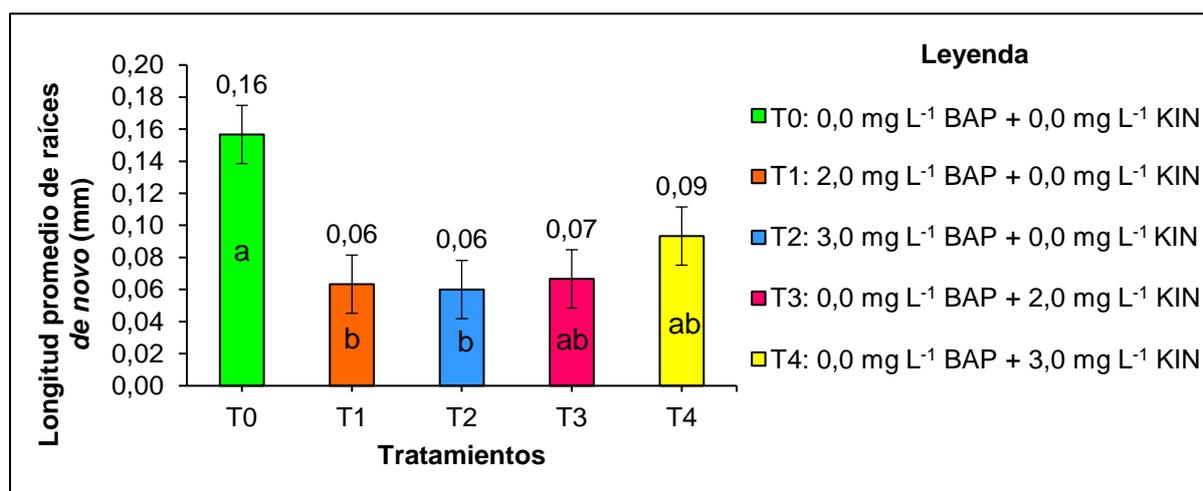


Leyenda: T: tratamiento. R: repetición. F: número de frasco.

### 6.1.8. Longitud promedio de raíces *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

En la Figura 20 se observa los resultados de la longitud promedio de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, en donde, el tratamiento testigo T0, presentó el mayor promedio de raíces *de novo*, con 0,16 mm; seguido del T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con un 0,09 mm; y, el T3 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, obtuvo un 0,07 mm. Los tratamientos que alcanzaron los menores valores fueron: T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con 0,06 mm de longitud promedio de raíces *de novo*. El análisis estadístico demostró, que existió diferencias estadísticas significativas, entre los entre los tratamientos evaluados ( $p < 0,05$ ).

**Figura 20.** Longitud promedio de raíces *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, con las tres concentraciones hormonales BAP y KIN, a los 90 días de evaluación.



### 6.2. Efecto de la oscuridad total y dos citoquininas en diferentes concentraciones, para la inducción de brotes *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

#### 6.2.1. Porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

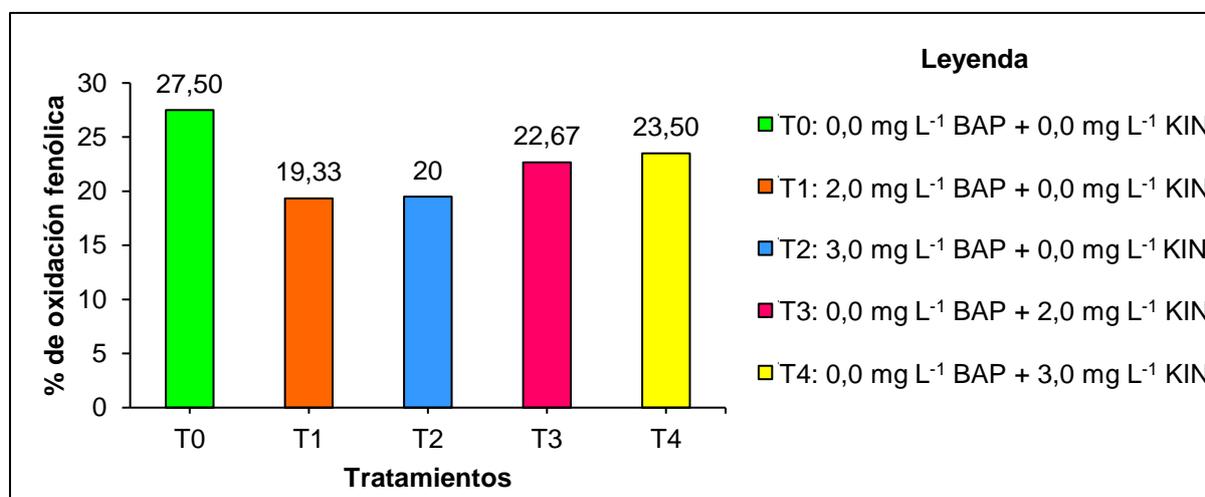
En cuanto a los resultados de la variable porcentaje de contaminación en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación, en todos los tratamientos evaluados no se presentó contaminación alguna en los callos

inoculados *in vitro*, por tratarse de vitroplantas que vienen creciendo en condiciones asépticas en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

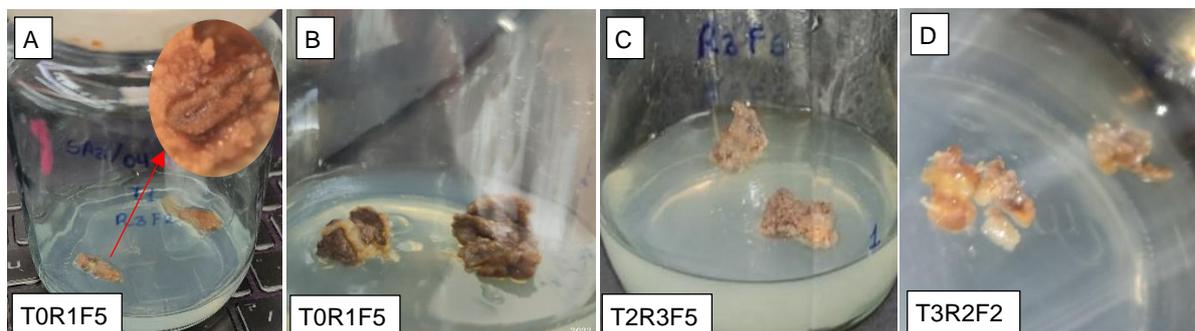
### 6.2.2. Porcentaje de oxidación fenólica de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

Según como se muestra en la Figura 21, los resultados del porcentaje de la oxidación fenólica en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, fueron bajos, la oxidación fenólica se inició a los 34 días después de la inoculación en las estructuras callogénicas y morfogénicas, lo cual se evidencia en la Figura 22; donde, el mayor porcentaje de oxidación fenólica se presentó en el tratamiento testigo, con 27,50 %; seguido del T4, (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con un 23,50 %; el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) reflejó el 22,67 %. En los tratamientos T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), se obtuvieron los menores porcentajes de oxidación fenólica, con un 19,50 y 19,33 % respectivamente.

**Figura 21.** Porcentaje de oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.



**Figura 22.** Ilustraciones de la oxidación fenólica en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad: A) Avance de la oxidación fenólica; B, C, D) Oxidación fenólica en los tratamientos T0, T2, T3.



Leyenda: T: tratamiento. R: repetición. F: número de frasco.

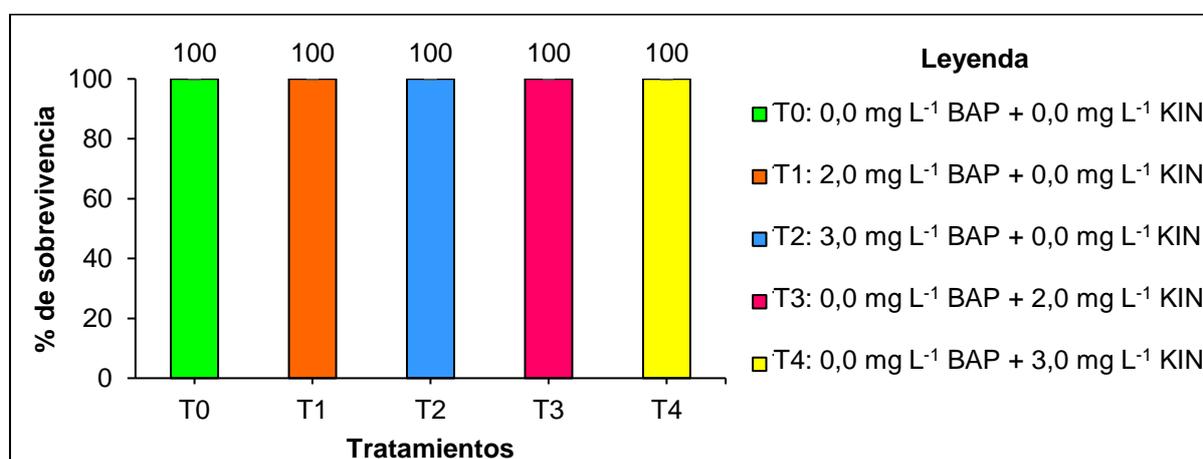
### 6.2.3. Porcentaje de mortalidad de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

En lo que se refiere a la variable porcentaje de mortalidad de las estructuras callogénicas, durante los 90 días de evaluación, en los 5 tratamientos ensayados no existió mortalidad de los explantes inoculados *in vitro*.

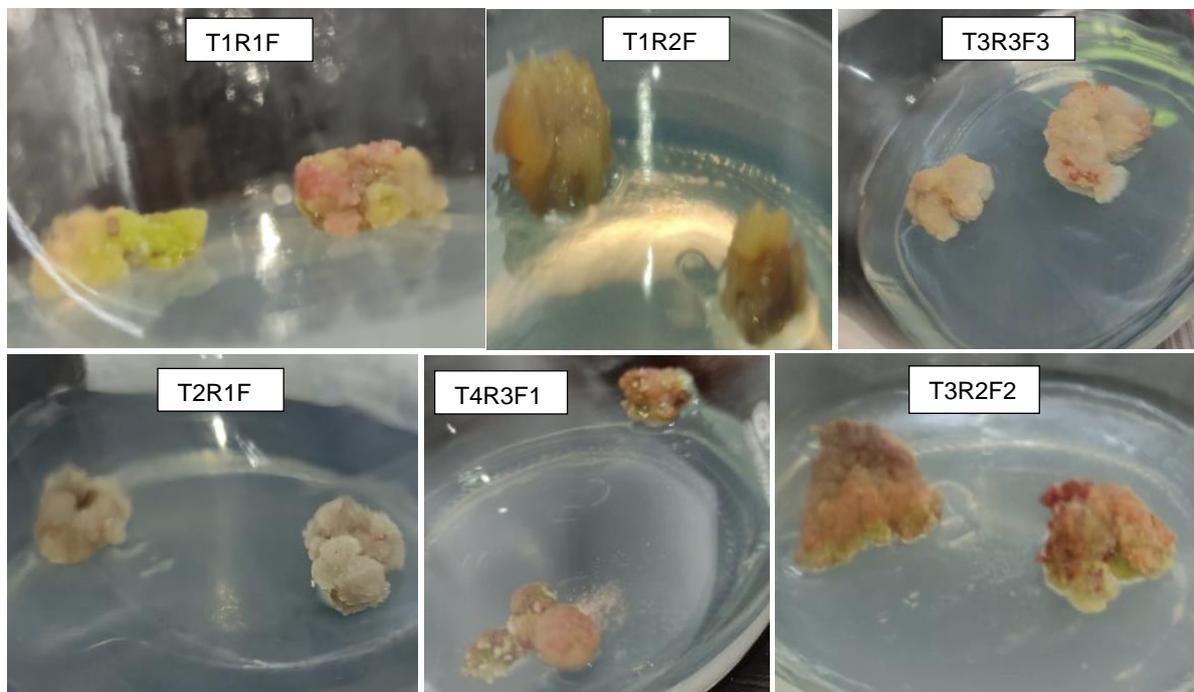
### 6.2.4. Porcentaje de sobrevivencia de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

En relación a la variable porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas, de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, en la Figura 23 se muestra que en todos los tratamientos evaluados se obtuvo el 100 % de sobrevivencia de las estructuras callogénicas, en concordancia con la ausencia de contaminación en los explantes, como se puede ilustrar en la Figura 24.

**Figura 23.** Porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en tres concentraciones hormonales BAP y KIN, en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación.



**Figura 24.** Ilustraciones de la sobrevivencia en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de la oscuridad, a los 90 días de evaluación.

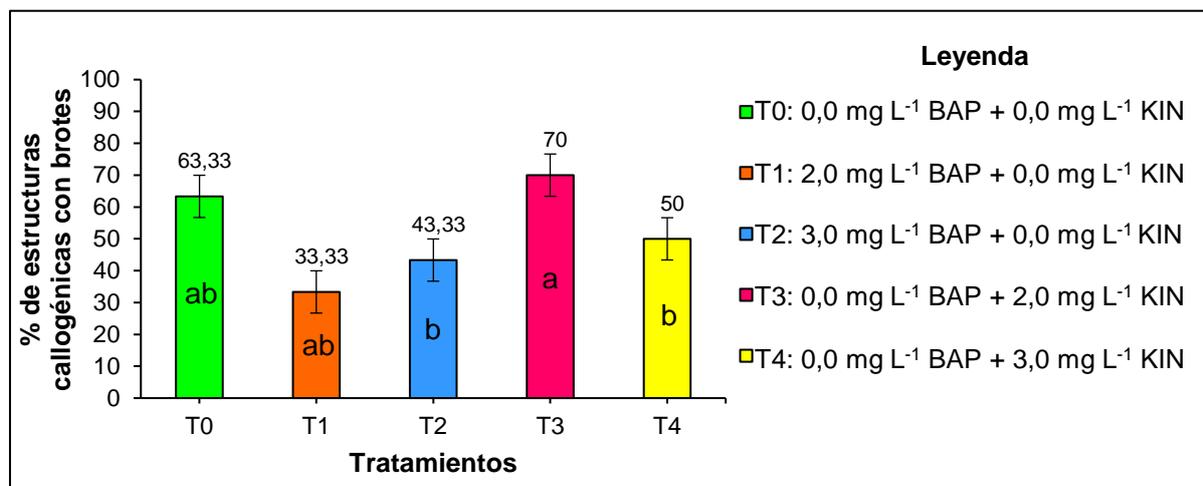


Leyenda: T: tratamiento. R: repetición. F: número de frasco.

#### 6.2.5. Porcentaje de formación de brotes *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

Como se puede ver en la Figura 25, el mayor porcentaje de estructuras callogénicas que formaron brotes *de novo*, se registró en el tratamiento T3, suplementado con 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, con el 70 %; seguido del tratamiento testigo T0, con 63,33 %; mientras que los tratamientos que presentaron los menores porcentajes, fueron el T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con el 63,33 y 50 % de estructuras callogénicas en la formación de brotes *de novo*, respectivamente. Según el análisis de varianza y la prueba de significancia del 0,05 %, se observó que si existió diferencia estadística entre los tratamientos.

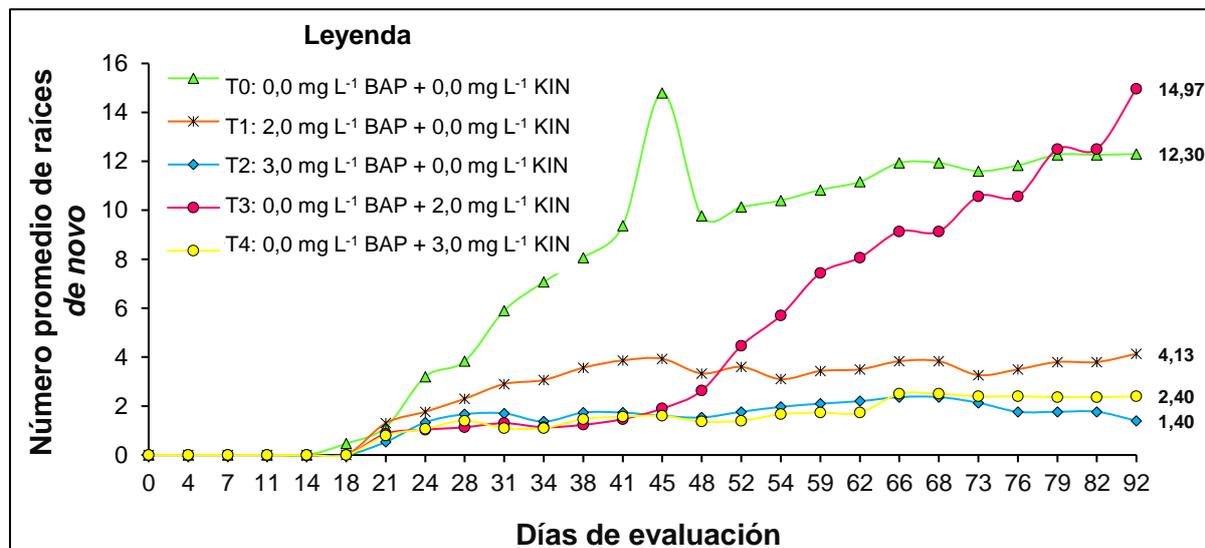
**Figura 25.** Porcentaje de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. con brotes de novo, en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.



#### 6.2.6. Número promedio de brotes de novo en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

Al igual que en el primer objetivo en la variable número promedio de brotes de novo en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad, a los 90 días de evaluación se pudo evidenciar que la formación de raíces adventicias, inició a partir del día 21, después de la inoculación y continuaron creciendo durante el período de evaluación de 90 días. En la Figura 26 se observa que todos los tratamientos evaluados (T0, T1, T2, T3, T4) presentaron la formación de raíces de novo, en donde el mayor número promedio se registró en el T3 suplementado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, con 14,97 raíces; seguido del T0, con 12,30 raíces; mientras que los tratamientos T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzaron el menor número promedio de raíces de novo, con 2,40 y 1,40 respectivamente. El análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher, mostró la existencia de diferencia estadística significativa, entre los tratamientos ensayados ( $p < 0,05$ ).

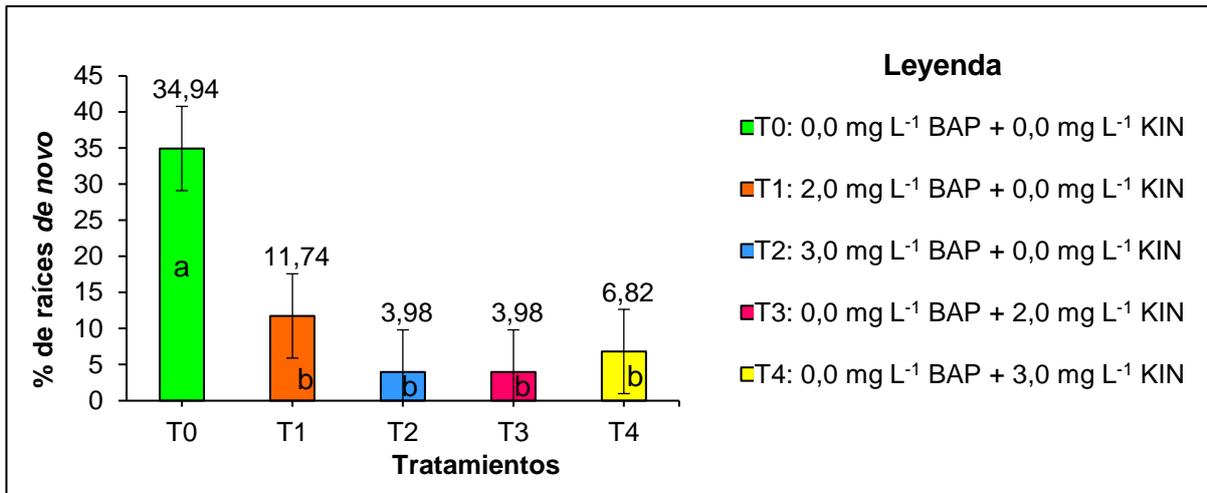
**Figura 26.** Curva acumulativa del número promedio de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.



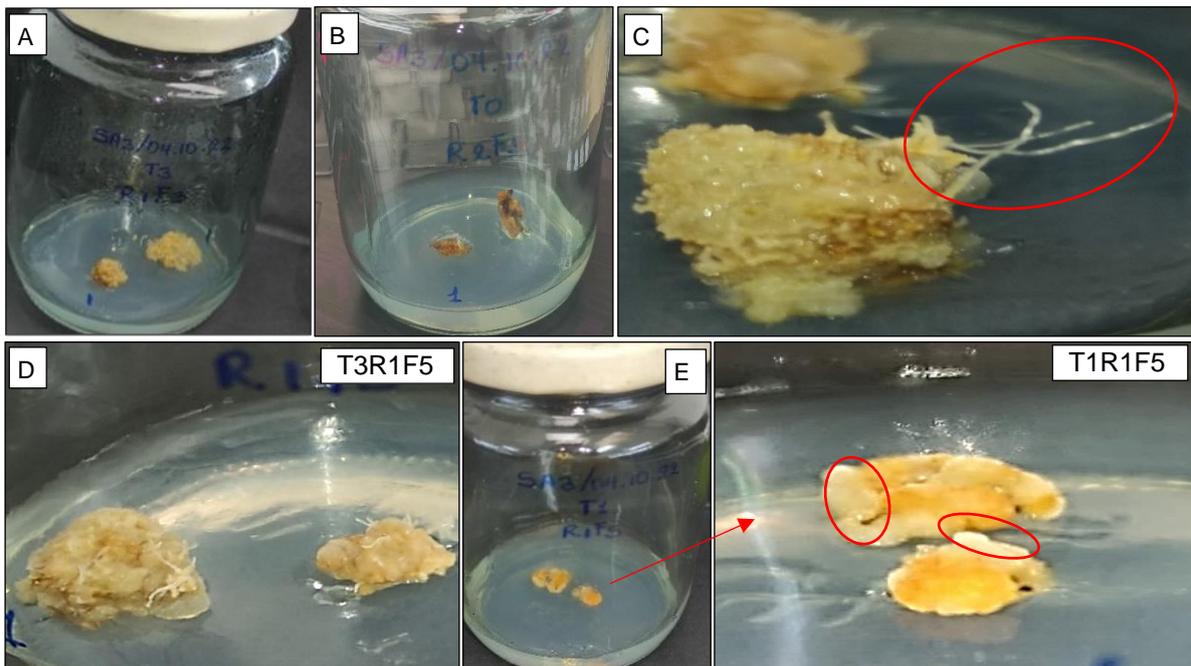
**6.2.7. Porcentaje promedio de formación de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad total y dos citoquininas en tres concentraciones, a los 90 días de evaluación.**

En la figura 27 se presentan los resultados del porcentaje promedio de formación de raíces de novo, a partir de estructuras callogénicas, en la especie *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación, en oscuridad total en donde el mayor porcentaje se presentó en el tratamiento testigo T0 que no tuvo ninguna citoquinina, con el 34,94 %; seguido del T1 conformado por 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, que presentó el 11,74 %; y, los tratamientos que presentaron un menor porcentaje fueron el T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 3,98 % respectivamente, lo cual se evidencia en la Figura 28 en los indicios de la formación de raíces de novo y el incremento de mayor masa amorfa de células indiferenciadas en estructuras callogénicas en el tratamiento T1R1F5. El análisis estadístico demostró, que existió diferencias estadísticas significativas, entre los tratamientos ensayados (p<0,05).

**Figura 27.** Porcentaje promedio de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.



**Figura 28.** Ilustraciones de la formación de brotes de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación: A y B) Indicios de brotes de novo; C y D) Desarrollo masivo de brotes de novo; E) Desarrollo de células indiferenciadas en estructuras callogénicas en el tratamiento T1R1F5.



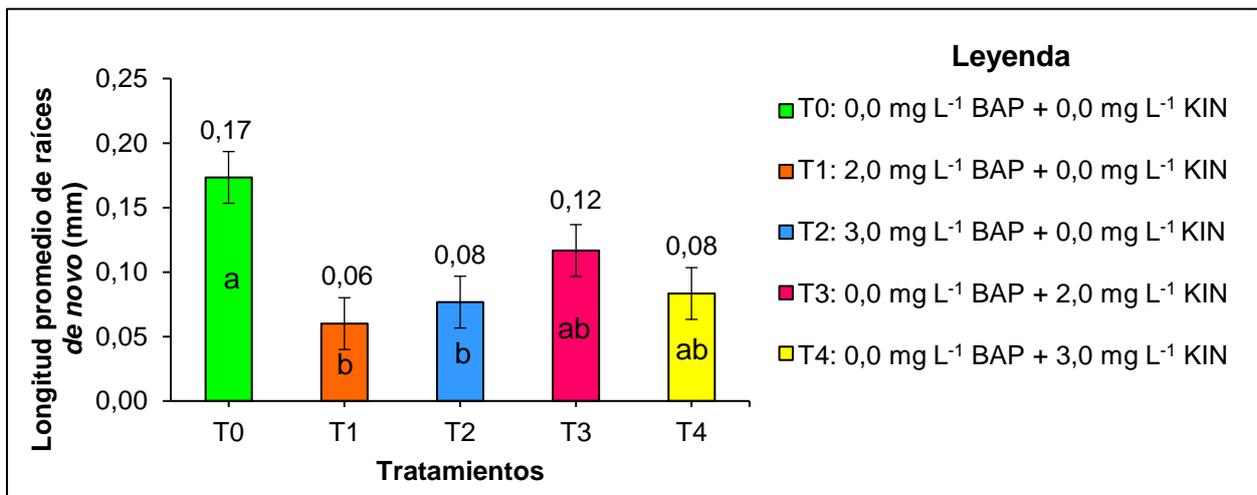
T: tratamiento; R: repetición; F: número de frasco.

**6.2.8. Longitud promedio de raíces de novo en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.**

En la Figura 29 y 30 se observa los resultados de la longitud promedio de raíces de novo en las estructuras callogénicas *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, en donde, el tratamiento testigo T0 presentó el mayor promedio de raíces de novo, con 0,17

mm; seguido del T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con un 0,12 mm; y, el T4 conformado por 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, obtuvo un 0,08 mm. Los tratamientos que alcanzaron los menores valores fueron: T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con 0,08 y 0,0 mm de longitud promedio de raíces *de novo*. El análisis de varianza y la prueba de LSD Fisher, determinó la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos (p<0,05).

**Figura 29.** Longitud promedio de raíces *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo condiciones de oscuridad total, con las tres concentraciones hormonales BAP y KIN, durante los 90 días de evaluación.



**Figura 30.** Ilustración del crecimiento en longitud de las raíces *de novo*, a partir de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad, a los 41, 51 y 66 días en el T0R3F5.



### **6.3. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados.**

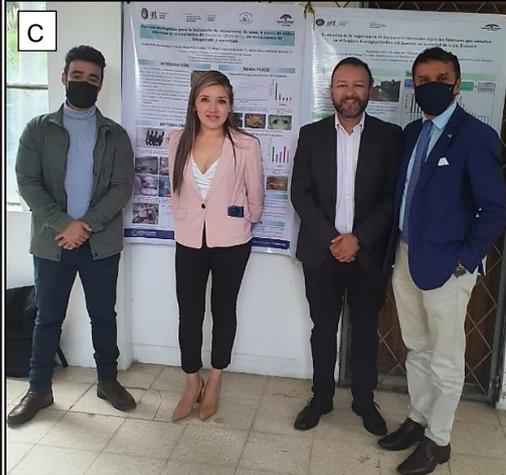
Como se puede observar en la Figura 31, se muestran las actividades que se realizaron para la socialización de los resultados obtenidos en la presente investigación, las cuales se indican a continuación:

- Socialización de los resultados preliminares del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte del Simposio Internacional de Ciencias Forestales: "Bosque, Agua y Biodiversidad", organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona*, que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un tríptico y póster para la difusión de resultados del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un Manual técnico con los resultados obtenidos del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un manuscrito de artículo científico, con los resultados obtenidos en la presente investigación.
- Elaboración y publicación del documento del Trabajo de Integración Curricular.

**Figura 31. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales. A) Visita del Director del Trabajo de Integración Curricular en el LMV; B) Presentación de un póster científico; C) Socialización de los resultados preliminares del TIC a actores interesados, que formaron parte del Simposio Internacional de “Ciencias Forestales: “Bosque, Agua y Biodiversidad”; D) Elaboración de un poster científico; E) Socialización de los resultados ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona; F) Elaboración de un manual técnico, un borrador de un artículo científico y un tríptico.**

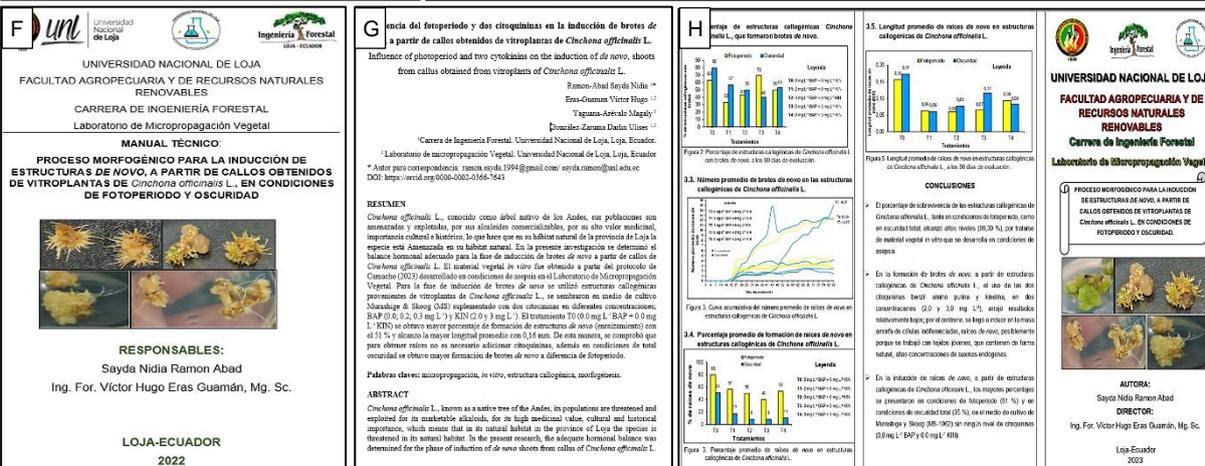












## 7. Discusión

### 7.1. Contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.

En la presente investigación, en cuanto a la variable días a la contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., está inició a los 66 días de inoculación *in vitro*, únicamente en el tratamiento T4; resultados que guardan relación con los obtenidos por Indacochea et al., (2018), quienes evaluaron diferentes medios de cultivo, para la inoculación *in vitro* de especies forestales nativas en peligro de extinción del Ecuador, en donde señalan que la contaminación se presentó en la primera semana de evaluación.

En lo relacionado al porcentaje de contaminación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., durante noventa días de evaluación, se registró de forma general un bajo porcentaje de contaminación; así, en condiciones de fotoperiodo el tratamiento T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), alcanzó un valor de 6,67 %, iniciándose la contaminación a los 66 días de haber establecido el ensayo y se estabilizó a los 90 días, a causa de bacterias; mientras que en condiciones de oscuridad total en todos los tratamientos ensayados no se registró contaminación alguna, por cuanto se utilizaron vitroplantas desarrolladas en el Laboratorio, que vienen creciendo en condiciones asépticas. Estos resultados son inferiores a los presentados con Camacho (2023), quien al evaluar la contaminación de explantes bajo condiciones del fotoperiodo y el efecto de diferentes concentraciones de citoquininas (ANA y BAP) para la fase de formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., obtuvo un porcentaje de contaminación del 3 %; así como, a los reportados por Méndez (2018) quien en su estudio de inducción de callos y estructuras *de novo* a partir callos de *Cinchona officinalis* L., aplicando de forma combinada citoquininas (ANA, BAP), alcanzó un porcentaje de contaminación bajo del 3,33 %. Asimismo, Rueda (2020) quien evaluó el efecto de la oscuridad en la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., alcanzó un 10 % de contaminación para los tratamientos T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T1 (1,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), resultado que es superior a la contaminación obtenida en la presente investigación.

Según Suárez., (2020) la contaminación en el cultivo de tejidos vegetales puede originarse por organismos asociados al cultivo *in vitro*, entre ellos están las bacterias, hongos, virus, rickettsias, fitoplasmas y algunos artrópodos, presentes en la superficie o en los tejidos de los explantes; como también, por deficiencias en la manipulación del equipo técnico en el laboratorio. Asimismo, Pierik (1990), indica que las cuatro fuentes de infección más importantes en el establecimiento de un cultivo tejidos vegetales *in vitro* son el explante, el

medio de cultivo, el aire y el operador; de igual forma, Mroginski et al., (2010), mencionan que las condiciones físicas de incubación es una de las causas que provocan la contaminación de los explantes inoculados *in vitro*, generando pérdidas. Además, Bello-Bello y Spinoso (2022), manifiestan que con la finalidad de eliminar agentes microbianos, se puede aplicar nanopartículas de plata (NPsAg) que reemplacen al agar como agente gelificante de los medios de cultivo, para reducir la contaminación de los cultivos *in vitro*, eliminando agentes microbianos, como hongos y bacterias e inhibiendo los efectos nocivos que ocasiona el etileno, por el cierre hermético de los recipientes de vidrio, durante el proceso de inoculación *in vitro* de los explantes.

## **7.2. Oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.**

La evaluación de la oxidación fenólica de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., se realizó durante noventa días y en los tratamientos inoculados bajo efecto del fotoperiodo y dos citoquininas en tres concentraciones; en donde, el mayor porcentaje de fenolización se evidenció en las estructuras callogénicas presentes en el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con el 88,27 %, resultado que fue superior al obtenido en las estructuras callogénicas inoculadas en condiciones de oscuridad, en la que, el mismo tratamiento T3, alcanzó valor de 27,50 %; resultados superiores presenta Camacho, (2023) quien, al evaluar la fenolización de explantes bajo el efecto de citoquininas (ANA y BAP) para la fase de formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo condiciones de fotoperiodo y utilizando 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN, obtuvieron un 3 % de fenolización y los callos inoculados en condiciones de oscuridad alcanzaron un 13 %, en el T3 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN), durante 70 días de evaluación. Asimismo, estos resultados son inferiores a los obtenidos por Eras et al (2019) quienes, en su estudio, para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP y en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, obtuvieron una fenolización mínima de 6,67 %.

De acuerdo con Eras (2023) la oxidación fenólica es un fenómeno fisiológico fotoactivo, que se activa en presencia de la luz y el oxígeno, produciendo en la incisión de los explantes una coloración carmelita, parda o café oscuro, debido a la muerte de las células y por ende el necrosamiento de los tejidos y la subsiguiente muerte de los mismos, con lo cual se inhibe la proliferación de las células, esto explica el por qué en los ensayos en condiciones de oscuridad total, haya existido una menor oxidación fenólica, en comparación con los establecidos en condiciones de fotoperiodo (16/8).

En este mismo sentido, Azofeifa (2009) manifiesta que, la oxidación fenólica es dependiente del genotipo de la especie vegetal y una de las causas que la originan en la micropropagación, es producto de los desinfectantes aplicados durante la esterilización de los explantes; y, las incisiones que se realizan al momento de la extracción del meristemo, también ocasionan esta afección al cultivo *in vitro*; además, señala que se debe prestar atención al tipo de gelificante que se utiliza, pues algunos tipos de agar presentan altos contenidos de cobre, que constituye un cofactor enzimático en los explantes, que los vuelve propensos a oxidarse.

Es necesario recalcar que, en los tratamientos evaluados, se observó que en las estructuras callogénicas que dieron origen a raíces *de novo*, el grado de oxidación fenólica se fue incrementando desde la cofia de las raíces adventicias, lo que ocasionó el necrosamiento del tejido y la inhibición en la formación subsiguiente de brotes *de novo*. Estos niveles de oxidación fenólica, posiblemente se deben a que el género *Cinchona*, naturalmente contiene altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles y por consecuencia produce la liberación de fenoles al medio de cultivo, al producirse heridas en la masa amorfa de células indiferenciadas, comúnmente denominado callo. Además, Paz (2000), indica que las altas concentraciones de benzil amino purina (BAP) pueden incrementar la oxidación fenólica en los tejidos inoculados *in vitro*.

### **7.3. Supervivencia de las estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad total, a los 90 días de evaluación.**

Asimismo, en la variable supervivencia bajo condiciones de fotoperiodo, se obtuvo en todos los tratamientos evaluados altos porcentajes, dando un promedio del 84,67 % de supervivencia de las estructuras callogénicas, resultados que fueron inferiores a las estructuras callogénicas inoculados en condiciones de oscuridad total, en donde se obtuvo el 100 % de supervivencia, en todos los tratamientos, incluido el tratamiento testigo, durante los 90 días de evaluación. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Camacho (2023) quién indujo estructuras callogénicas a partir de explantes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo (16/8), en todos los tratamientos, obtuvo una supervivencia en el T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA) del 90 % y en los ensayos sometidos a oscuridad total, el T3 (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN), presentó el 87 % de supervivencia. Además, estos resultados son superiores a los reportado por Eras et al., (2019) quienes, en su investigación para la inducción para la formación estructuras *de novo*, a partir de callos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo (16/8), obtuvieron una supervivencia del 90 %. En líneas generales el alto porcentaje de supervivencia de las

estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., atribuye al uso de vitroplantas que crecen en ambientes controlados, en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, el cual brinda las condiciones necesarias de asepsia, para evitar la contaminación del material vegetal, lo que sin duda contribuye a obtener buenos resultados.

#### **7.4. Formación de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.**

La combinación hormonal de auxinas y citoquininas, es necesaria para la formación de estructuras *de novo*; Eras (2021) menciona que, a mayor concentración de citoquininas, mayor estimulación de brotes y al ser combinadas con auxinas en altas concentraciones, se estimula la formación de raíces *de novo*. En este sentido, tomando en consideración los resultados obtenidos en esta investigación, en condiciones de fotoperiodo (16/8), demostraron que el tratamiento testigo T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) que no contenía ninguna concentración hormonal, obtuvo la mayor formación de raíces *de novo* con 80 %; y, en condiciones de oscuridad se alcanzó el 63,33 %; estos resultados fueron superiores a los reportados por Camacho (2023) quien en su estudio para la formación de estructuras callogénicas a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación el T1 (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzo el 40% y en condiciones de oscuridad el T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) el 10 %, en la formación de brotes *de novo*, con lo cual concluye que la utilización de la auxina, como el ácido naftalen acético (ANA) promueve la elongación celular, estimulando el crecimiento vegetativo de los explantes y la citoquinina como la kinetina (KIN) induce la formación de nuevos brotes, permitiendo así la aparición de nudos y a su vez nuevas hojas. Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede colegir, que para la formación de raíces *de novo*, no fue necesario adicionar auxinas, posiblemente porque al tratarse de material vegetal en estado juvenil, contiene una mayor cantidad de auxinas endógenas en el explante. Sin embargo, en los tratamientos donde se adicionó las citoquininas, los mayores resultados en condiciones de fotoperiodo, se alcanzaron en el T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), con el 56,70 % y en condiciones de oscuridad el T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) con 70 %, con lo cual se puede evidenciar la influencia positiva que ejercieron, tanto el benzil amino purina (BAP) y la kinetina (KIN), en la inducción de raíces *de novo* en las estructuras callogénicas. Asimismo, Pierik (1990), manifiesta que, para la formación de brotes *de novo*, se utiliza el medio nutritivo basal de Murashige y Skoog (MS), con la mitad de la concentración original de los macroelementos, debido a que, su alta concentración de nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) no permite la regeneración de brotes adventicios en los tejidos de los callos; no obstante, recomienda mantener los microelementos de la concentración normal del medio de cultivo.

#### **7.4.1. Porcentaje promedio de formación de raíces *de novo* en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y oscuridad la total, a los 90 días de evaluación.**

En lo relacionado al porcentaje promedio de formación de raíces *de novo* en estructuras callogénicas, en condiciones de fotoperiodo (16/8) y oscuridad total, a los 90 días de evaluación, el mayor porcentaje en fotoperiodo, se registró en el tratamiento testigo (T0) con un 51 %; estos resultados, son ligeramente superiores a los obtenidos en los tratamientos evaluados en condiciones de oscuridad total; en donde, el mayor porcentaje de enraizamiento se registró en el tratamiento testigo (T0) con el 35 %; y, a los reportados por Camacho (2023), quien en su investigación sobre el enraizamiento *in vitro*, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog, en condiciones de fotoperiodo (16/8) y una concentración de 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, alcanzó el 40 % y en condiciones de oscuridad, alcanzó el 37 % de enraizamiento, a los 70 días de evaluación; con lo cual se pudo comprobar, que las dos citoquininas utilizadas (BAP y KIN) en dos concentraciones (2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>), no incidieron significativamente en la inducción de raíces *de novo* en estructuras callogénicas; por cuanto, como señala Pierik (1990), son las auxinas en bajas concentraciones, las responsables de la inducción de raíces adventicias en los explantes.

Es necesario señalar que, tanto en los resultados obtenidos en la presente investigación como en los reportados por Camacho (2022), los mayores porcentajes de formación de raíces adventicias en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., se presentaron en condiciones de fotoperiodo (16/8), lo cual se contrapone a lo manifestado por Pierik (1990), quien señala que, la inducción de raíces adventicias en los explantes, ocurren con mayor frecuencia en condiciones de incubación en oscuridad total; por cuanto, las auxinas que son las responsables de la formación de raíces adventicias, son mucho más activas en bajas concentraciones y en condiciones de oscuridad total.

#### **7.5. Formación de brotes *de novo* en estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.**

En lo relacionado a la variable del número y porcentaje promedio de formación de brotes *de novo* en estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., tanto en condiciones de fotoperiodo (16/8) y oscuridad total, a los 90 días de evaluación, no se pudo evidenciar la formación de brotes *de novo*, sino de raíces *de novo*, razón por la cual, los resultados que se presentan en el análisis de esta variable, son los de la formación de raíces *de novo*. En este sentido, en la variable del número y porcentaje promedio de formación de raíces *de novo* por estructura callogénica, en condiciones de fotoperiodo, éstas iniciaron su formación a los 21

días de evaluación; mientras que, en condiciones de oscuridad total, iniciaron a desarrollarse a partir de los 18 días; estabilizándose la formación, hasta los 90 días de evaluación.

En cuanto al número promedio de raíces *de novo*, por estructura callogénica, durante los 90 días de evaluación, en condiciones de fotoperiodo, el mayor número se presentó en el tratamiento testigo (T0) el cual no contenía ninguna citoquinina, con 11,77 raíces *de novo*; mientras que en los tratamientos que contenían las citoquininas T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) los resultados fueron relativamente bajos; con un número promedio de 2,43 y 1,90 raíces *de novo*, respectivamente; y, en los tratamientos que contenían la kinetina en un nivel de 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>, también fueron bajos, con un 15,97 y 2,40 raíces *de novo*, respectivamente; estos resultados obtenidos en condiciones en fotoperiodo son relativamente bajos, en comparación con los de oscuridad total, en donde, el T3 con una concentración de 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, presentó un número promedio de 14,97 raíces *de novo*, seguido del T0 con 12 raíces *de novo*.

En los resultados obtenidos en la presente investigación, en la variable de formación del número promedio de brotes *de novo*, en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., hasta los 90 días de evaluación, tanto en condiciones de fotoperiodo y oscuridad total, las citoquininas utilizadas como fueron, benzil amino purina y kinetina en dos niveles de concentración hormonal 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente su efecto fue relativamente bajo en la formación de brotes *de novo*, llegándose a obtener en los explantes la inducción de raíces *de novo*; con lo cual se puede corroborar lo manifestado por Pierik (1990) quien señala que, en los tejidos jóvenes existe la presencia de auxinas endógenas naturales, que pueden provocar la inducción de raíces adventicias en los explantes; y, a lo señalado por Roca y Mroginski, (1991) quienes señalan que, la capacidad morfogénica, influye positivamente cuando los explantes provienen de plántulas jóvenes y tejidos menos diferenciados, presentando una mejor respuesta en la formación organogénica de los tejidos. Por otro lado, la baja formación de brotes adventicios en los explantes, pudo estar asociado al uso de bajos niveles de citoquininas, como fueron kinetina y benzil amino purina, en dos concentraciones 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>; ya que, de acuerdo a lo señalado por (Roca y Mroginski, 1991; Jordán y Casaretto, 2006), manifiestan que las citoquininas son reguladoras del crecimiento que contribuyen a la formación de brotes *de novo*, las cuales se pueden utilizar en concentraciones de 0,03 a 30,0 mg L<sup>-1</sup> y son efectivas a medida que se incrementa estos niveles de concentración. Además, estudios realizados por Geier (1990), indican que, en ausencia de las auxinas, muy pocos explantes llegan a formar callos o brotes *de novo*, por lo que es necesario añadir esta hormona, si se desea obtener una respuesta favorable en el explante, para la formación de brotes.

### **7.5.1. Longitud promedio de raíces *de novo* en estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.**

En relación a los resultados obtenidos en la variable longitud promedio de raíces *de novo* en estructuras callogénicas, tanto en condiciones de fotoperiodo, como en oscuridad total, el tratamiento testigo T0, al cual no se le aplicó ninguna combinación hormonal, presentó los mayores valores con 0,16 y 0,17 mm respectivamente; seguido por los tratamientos T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T3 (mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), que en condiciones de fotoperiodo alcanzaron una longitud promedio de 0,09 y 0,07 mm; y, en condiciones de oscuridad total 0,12 y 0,08 mm, respectivamente; mientras que en los tratamientos T1 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T2 (3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) en donde se probó la acción de la citoquinina, benzil amino purina (BAP), tanto en condiciones, de fotoperiodo y oscuridad total, los resultados obtenidos fueron inferiores, con 0,06 mm de longitud promedio de raíces *de novo*, con lo cual se pudo comprobar que la citoquinina utilizada, como fue la kinetina, en una concentración igual que el BAP de 3 mg L<sup>-1</sup>, resulto mucho más efectiva en la inducción de raíces *de novo*; sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación, fueron inferiores a los reportados por Paredes (2019), quien al aplicar 2 mg L<sup>-1</sup> de la auxina, ácido indol butírico (AIB) en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del relicto boscoso del Sector Uritusinga, consiguió una longitud promedio de raíces por explante de 2 mm, llegándose a corroborar que las auxinas en bajas concentraciones, de acuerdo a lo reportado por Pierik (1990), son las responsables de la formación de raíces adventicias en los explantes; mientras que en altas concentraciones se da la formación de callo, en lugar de raíces.

## 8. Conclusiones

El porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., tanto en condiciones de fotoperiodo como en oscuridad total, alcanzó altos niveles (99,30 %), por tratarse de material vegetal *in vitro* que se desarrolla en condiciones de asepsia.

El porcentaje de oxidación fenólica en las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., fue alto (88 %) en condiciones de fotoperiodo; mientras que, en oscuridad total, fue menor (27,50 %), lo que demuestra que, la fenolización de los tejidos, es un fenómeno fotoactivo que se incrementa en presencia de la luz y el oxígeno.

En la inducción de raíces *de novo*, a partir de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., el tratamiento testigo que no contenía citocininas (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP y 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), a los 18 días de evaluación se obtuvo la formación de raíces *de novo*, más no la de brotes *de novo* y los mayores porcentajes se presentaron en condiciones de fotoperiodo (51 %) y en condiciones de oscuridad total (35 %).

En la formación de brotes *de novo*, a partir de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., al utilizar las dos citoquininas benzil amino purina y kinetina, en dos concentraciones (2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>), presentó resultados nulos; por el contrario, se llegó a inducir mayor masa amorfa de células indiferenciadas y raíces *de novo*, posiblemente porque se trabajó con tejidos jóvenes, que contienen de forma natural, altas concentraciones de auxinas endógenas.

## 9. Recomendaciones

Para disminuir el porcentaje de oxidación fenólica en los explantes de *Cinchona officinalis* L., es necesario realizar la incubación de los mismos en condiciones de oscuridad total, por cuanto la fenolización es un fenómeno fotoactivo que se produce en presencia de la luz y el oxígeno; y, debido a la producción natural de fenoles de la especie ensayada.

Para la formación de brotes *de novo* se recomienda utilizar el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962), usando otras citoquininas diferentes a las evaluadas en la presente investigación, en una concentración mayor a 2 mg<sup>-1</sup> L.; y, en condiciones de incubación de fotoperiodo y oscuridad total.

Para obtener una mayor longitud en raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., se recomienda utilizar el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962) sin ningún nivel de citoquininas e incubar en condiciones de oscuridad total, con el propósito de obtener mayor elongación de raíces *de novo*.

Con la finalidad de estabilizar la curva de crecimiento y determinar la elongación, tanto de brotes, como de raíces *de novo*, se recomienda realizar las evaluaciones por un tiempo mayor a los 90 días.

## 10. Bibliografía

- Abdalla, N., Ramady, H., Seliem, M., Mahrouk, M., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T., Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*. 8, (4), (1-29). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Abdelnour y Escalant, (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 38p.
- Acosta, C. (2012). La micropropagación en especies forestales. *Ciencia actual*, Vol. 1. Numero 2 Julio/diciembre 2011 ISSN 2248-468x
- Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas* del Ecuador. Editorial del Ecuador, Quito. 136;137p. [https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/52/65/83/8a/5265838a-e64e-47d6-8985-84c4bf7bfb6e/files/ACO\\_Cinch\\_Ecuador.pdf](https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/52/65/83/8a/5265838a-e64e-47d6-8985-84c4bf7bfb6e/files/ACO_Cinch_Ecuador.pdf)
- Aguilera, G. (2012). Estandarización de una metodología para la inducción de callos embriogénicos en genotipos híbridos de coco, *Cocos nucifera* L. (ARECALES: ARECACEAE) a partir de cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira Facultad de Ciencias Agropecuarias departamento de Ciencias Biológicas Palmira. <http://bdigital.unal.edu.co/10700/1/7515001.2012.pdf>
- Aguirre, Z. (2020). Especies de cascarilla en Ecuador y Loja. ¿Cómo reconocerlas y dónde se encuentran? DOI: 10.13140/RG.2.2.17391.59047
- Aguirre, Z., Gutiérrez, R., Gaona, O. y Jaramillo, D. (2017). Escenarios para la enseñanza y valoración de la biodiversidad en la Región Sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero*,6(2). <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/231>
- Alcantara, J., Acero J., Alcántara J., Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. Vol. 17 (32): 109-129. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tlng=es).

- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1), 153-175.
- Barrutia, I., Rodríguez, R. y Marín, T. (2020). Germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., en tres tipos de suelos de Cajamarca, Perú. *Revista Cubana De Ciencias Forestales*, 8(1), 75–87. <https://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/488>
- Bello-Bello, J. y Spinoso, J. (2022). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 16(30), 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.3>
- Bharadwaj, K., Gupta, T. y, Singh, R. (2018). Alkaloid group of *Cinchona officinalis*: structural, synthetic, and medicinal aspects. *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*. 21: 205–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00009-X>
- Boeken, G., Broekaert, D., van Oostveldt, P. (1974) Polyploidy and habituation in a long-term callus culture as compared to crown gall tissue in *Helianthus annuus* L. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 355: 1178-1179
- Brunton, L., Lazo, S., Parker, K. (2006). *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Undécima Edición. McGraw Hill. ISBN 970-10-5739-2
- Buddenhagen, C., Renteria, J., Gardener, M., Wilkinson, S., Soria, M., Yanez, P., Tye, A., Valle, R. (2004). The Control of a Highly Invasive Tree *Cinchona pubescens* in Galápagos. En: container-title: *Weed Technology*, *Weed Technology* [en línea], vol. 18, no. sp1, pp. 1194-1202. ISSN 0890-037X, 1550-2740. DOI:10.1614/0890-037X(2004)018[1194:TCOAH]2.0.CO;2.
- Buitrón, X. (1999). *Uso y Comercio de Plantas Medicinales, Situación actual y Aspectos Importantes para su Conservación*. Ecuador: TRAFFIC International, Cambridge, Reino Unido. 76 p. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/Traf-061.pdf>
- Bussmann, R. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología*, 12(2), 203-216. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332005000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332005000200006&lng=es&tlng=es).

- Camacho, J. (2023). Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja].
- Campos, J. y Chico, L. (2014). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, Germinación de semillas de *Cinchona pubescens*. 2(1).
- Caraguay-Yaguana, K., Eras-Guaman, V., Gonzalez- Zaruma, D., Moreno-Serrano, J., Minchala-Patiño, J., Yaguana-Arévalo, M., Valarezo-Ortega, C. (2019). Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la Provincia de Loja – Ecuador. *Altoandino* 2016; Vol. 18 N. 3 271 -280. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2016.216>
- Cardoza, V. (2005). Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter 5. Book *Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications*. ed. Stewart, C.N.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo In vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.
- Chee, R. y Pool, R. (1982). The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures *in vitro*. *Scientia Hort.* 16:17-27.
- Conde, M., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., González, D., Yaguana, M. y Valarezo, C. (2017), Multiplicación sexual y asexual de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación de la especie. *Revista Científica Tzhoecoen*, Edición Vol. 9 / N° 01, ISSN 1997-3985.
- Conger, B. (2018). Clonación de plantas agrícolas mediante técnicas *in vitro*. En la clonación de plantas agrícolas mediante técnicas *in vitro*.
- Correa, G. (2021). Caracterización morfológica de los órganos vegetativos y reproductivos de *Cinchona officinalis* L., provenientes de dos relictos boscosos en la provincia de Loja". Universidad Nacional de Loja, *Revista CEDAMAZ*, Vol. 11, No. 01, pp. 13–21 <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1033/779>

- Cruz, F. (2012). Clonación de plantas agrícolas mediante técnicas *in vitro*. En la clonación de plantas agrícolas mediante técnicas *in vitro*. Micropropagación (Manual de prácticas). <https://doi.org/10.1201/9781351070706>
- Cruz, N., Morante y Carranza, M. (2021). Biotecnología de plantas. Aplicaciones en Ecuador. Editorial Grupo Compás. ISBN: 978-9942-33-402-2
- Cueva-Agila, A., Vélez, D., Arias, D., Curto, M., Meimberget, H. y Brinegar. (2019). Genetic characterization of fragmented populations of *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae), a threatened tree of the northern Andean cloud forests. *Tree Genetics & Genomes* 15, 81 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1393-y>
- Cuvi, N. (2009). Ciencia e imperialismo en América Latina: La Misión de *Cinchona* y las estaciones agrícolas cooperativas. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona Departamento de Filosofía. <https://ddd.uab.cat/record/63857>
- Cuvi, N. (2011). El Programa *Cinchona* (1940-1945): Ciencia e imperialismo en la explotación de una planta medicinal. *Dynamis*, 31(1), 183-206. <https://dx.doi.org/10.4321/S0211-95362011000100009>
- Debnath, B., Somraj, M., Goswami, M., Kumar., Maiti y Manna, K. (2018). "Role of Plant Alkaloids on Human Health: A Review of Biological Activities" *Materials Today Chemistry* 9: 56–72, doi: 10.1016/j.mtchem.2018.05.001.
- Debnath, S., Vyas, P., J. Goyali, and Igamberdiev, A., (2012). Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under *ex vitro* condition," *Canadian Journal of Plant Science* 92(6), 1065-1073. <https://doi.org/10.1139/CJPS2011-194>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., González, L., Tablada, E., Díaz, M., Robledo, C. y Balzarini, M. (2016). InfoStat, versión 2016. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Epiquién, M. (2009). Los últimos árboles de la quina. Biodiversity Perú
- Eras, V. (2023). Comunicación personal. Universidad Nacional de Loja, Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

- Eras, V., Minchala, J., Moreno, J., Yaguana, M., Sinche, M. y Valarezo, C. (2019). Estructura, Composición Florística y Fisiología Reproductiva de *Cinchona officinalis* L. en la provincia de Loja, Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Universidad Nacional de Loja. Ecuador: 160 p. ISBN 978-9978-355-39-8
- Eras, V., Moreno, J., Méndez, K., Yaguana, M. y Poma, R. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1):
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R. y Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1): 58 – 68
- Espinosa, C. y Ríos, G. (2014). Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* L., *in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35 (1,2), 73-82.
- FAO. (2004). Examen preliminar de la biotecnología en la silvicultura, incluido el documento de trabajo sobre los recursos genéticos forestales FGR/59E. [www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm](http://www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm)
- FAO. (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Roma: FAO. <http://www.fao.org/docrep/013/i1757s/i1757s.pdf>
- García, D. (2014). Composición y estructura florística del bosque de neblina montano, del sector "San Antonio de la Montaña", cantón Baños, provincia de Tungurahua [Tesis de grado de Ingeniería Forestal, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3476>
- García-Zárate, D., Marcelo-Bazán, F., Dávila-Estela, L. (2022). Identificación y selección de árboles semilleros de *Cinchona officinalis* L. ("Quina") en el distrito de Querocoto, Chota – Cajamarca. *Revista Forestal del Perú* 37(1): 69-77. DOI: <https://doi.org/10.21704/rfp.v37i1.1594>
- Garmendia, A. (1999). El árbol de la quina (*Cinchona* spp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.

- Garmendia, A. (2005). El árbol de la quina (*Cinchona* spp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura, 187. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.  
[https://books.google.com/books/about/El\\_árbol\\_de\\_la\\_quina\\_Cinchona\\_spp.html?hl=es&id=InMgPQAACAAJ](https://books.google.com/books/about/El_árbol_de_la_quina_Cinchona_spp.html?hl=es&id=InMgPQAACAAJ)
- Garmendia, A. (2017). Las *Cinchonas* en Sudamérica: Un relato histórico que marco transcendencia en la dinámica ecológica de los bosques, Capítulo 11, pp. 219- 242. En: Torres, B., Vargas, J.C., Arteaga, Y., Torres, A. y Lozano, P. (Eds.) 2017. Gente, Bosque y Biodiversidad: El rol del bosque sobre la biodiversidad y las poblaciones rurales. Universidad Estatal Amazónica. Programa Economía de Recursos Naturales y Desarrollo Empresarial. Puyo, Ecuador. 253 pp. 978-9942-932-19-8
- Geier, T. 1990. Anthurium. In Handbook of plant cell culture. McGraw-Hill Publishing Company, New York. p. 228-251.
- González, K., Eras, V., Minchala, J., Yaguana, M. y Valarezo, C. (2018). Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja, Ecuador. *Revista Tzhoecoecoen*. 10(2), 299-312
- González, M. (2002). Manual de laboratorio de técnicas de micropropagación, Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid-España. ES.
- González-Orozco C., García, E., Cuvi, N. (2023) Changes of *Cinchona* distribution over the past two centuries in the northern Andes. *R. Soc. Open Sci.* 10: 230229. [doi.org/10.1098/rsos.230229](https://doi.org/10.1098/rsos.230229)
- Guamán, P. (2014). Identificación de hongos micorrizicos arbustales en plantas de *Cinchona* spp. en sitios perturbados y no perturbados de la provincia de Loja. [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9108/1/PAOLA DEL CISNE GUAMAN ALVAREZ.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9108/1/PAOLA%20DEL%20CISNE%20GUAMAN%20ALVAREZ.pdf)
- Gutiérrez, A., Jaramillo, N. y Z. Aguirre (2022). Especies Endémicas que se conservan en el Jardín Botánico “Reinaldo Espinosa”. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. <https://jbreinaldoespinosa.files.wordpress.com/2020/06/especies-endemicas.pdf>
- Herrera, J., Alizaja, R., Guevara, E. y Jiménez V. (2006). Germinación y crecimiento de la planta. Editorial Universidad de Costa Rica. [com.ec/books?id=ohoEQYJFq0QC&printsec=frontcover&dq=germinaci%C3%B3n&hl=es&ei=h8W\\_TMzhOMP98Aa](https://books.google.com.ec/books?id=ohoEQYJFq0QC&printsec=frontcover&dq=germinaci%C3%B3n&hl=es&ei=h8W_TMzhOMP98Aa)

- Huamán, L., Albán, J., Chilquillo, E. (2019). Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la Quina (*Cinchona officinalis* L.) en el Norte de Perú. *Ecología Aplicada*, 18(2), 145-153. <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i2.1333>
- Hurtado-Trejo, L. et al. (2020). Aplicabilidad de las Normas ISTA: Análisis de la calidad de semillas en especies forestales en el Sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 44-57. <https://www.researchgate.net/publication/348394481>
- Jordá (2022). Efectos morfogénicos inducidos por pulsos de la auxina 2,4-D y la citoquinina TDZ en brotes axilares de plantas micropropagadas de batata. Universidad de Alicante. Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. Tesis de grado, (13) <http://hdl.handle.net/10045/125753>
- Jordán y Casaretto (2006) Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, Vol. 15: xx-xx Capítulo XV
- Jorgensen, P. y León, M. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst. Bot. Missouri Botanical Garden*. 75: 1- 1182 p.
- Kurnianingsih, R., Marfuah, Ikhsan M., (2009). Pengaruh pemberian BAP (6-Benzyl Amino Purine) pada media multiplikasi tunas *Anthurium hookerii* Kunth. *Enum. Secara in vitro. Vis Vitalis*, Vol. (2) ISSN 1978 - 9513
- Labanda, D. (2021). Análisis y sistematización bibliométrico de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja]. <https://avbc.me/bUv0e9E9>
- Lallana, V. y Lallana, M. (2003). Inducción de callos, utilizando la técnica de cultivo *in vitro*. *Manual de Practicas de Fisiología Vegetal*, 81–84.
- Larreategui, D. y Lafuente, L. (2013). El árbol de quina, 400 años de su descubrimiento en el Ecuador.
- Laya, A., Gómez, P., Yacuzzi, F. y Manuel, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. In CIRIEC - España. *Revista de economía pública, social y cooperativa*: Vol. XXII (Issue 45, pp. 653–673). <https://ucema.edu.ar/publicaciones/download/documentos/224.pdf>

- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa-Ulloa, C. y Navarrete, H. (2011). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2ª edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. 957 pp.
- Levitus, G., Echennique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, 3, 26–33.
- Lima Jiménez, N. R., Moreno Serrano, J. A., Eras Guamán, V. H., Minchala Patiño, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M. y Valarezo Ortega, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., a partir de semillas. Revista de Investigaciones Altoandinas, 20(2), 169-178.
- Lima S., (2020). Universidad Nacional de Loja Autor. 108. [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS WILSON FERNANDO.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_WILSON_FERNANDO.pdf)
- Litz, E. y Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. In: Embriogénesis. T. A. Thorpe ed. *in vitro* Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203.
- Loaiza, T. y Sánchez, E. (2006). La corteza de Loja. *Revista Ecuador Terra Incógnita*. Quito - Ecuador. Fisiología Vegetal <https://georgiusm.files.wordpress.com/2017/11/tema-9-auxinas.pdf>
- MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador); FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). (2015). Especies forestales leñosas arbóreas y arbustivas de los bosques montanos del Ecuador. Quito. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/55826.pdf>
- Martínez, J. (2017). Fisiología Vegetal. <https://georgiusm.files.wordpress.com/2017/11/tema-9-auxinas.pdf>
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V. y Gutiérrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo*. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, México. Vol. 9 (1), 17-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62990103>
- Mathur, J. y Koncz, C. (2005). Callus and culture regeneration. *Methods in molecular biology*, Vol. 82: Arabidopsis Protocols.

- Medero, V., García, J., López, J., Ventura, S., Rodríguez, L., Oliva, C., Pons, I., Sánchez, M., Milián, C., Rodríguez, M., Torres, M., Martínez, D., Guerra, M., Álvarez, J. (1999). Metodología para la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata*). Libro de Reportes cortos 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba. p. 172-173
- Mejía, F. Suni, M. y Albán, J. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L. Lima: Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar\\_xxi/cap07.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxi/cap07.pdf) 6 p
- Méndez, D. (2018). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja].
- Menezes, L., Machado, Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M. y Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelio cattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47-54. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-34292016000100006](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292016000100006)
- Ministerio del Ambiente del Ecuador, (2017). Estadísticas del Patrimonio Natural. Sistema Nacional de Monitoreo de Patrimonio Natural (SNMPN) del Ministerio del Ambiente. Quito, Ecuador
- Ministerio del Ambiente, (2017). Deforestación del Ecuador continental periodo 2014-2016. Quito – Ecuador. <http://certificacionpuntoverde.ambiente.gob.ec/libraries/EAlfresco.php/?doc=5708eb09-80c7-4c92-aca0-21dfa0ee711b>
- Mittermeier, R., Robles, P. y Goettsch (1997). Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del mundo. Cemex. México.
- Muñoz, E. (1994). Una visión de la Biotecnología: Principios políticos y problemas. Madrid (España): Ed. Fondo Investigación Sanitaria.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>

- Narváez, S. (2009). Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa, variedad akito (Rosa sp. Var Akito). Escuela Politécnica Del Ejército – Espe, 75.
- Núñez, L. y Gago, J. (2007). Micropropagación Vegetal. 7. [http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo\\_2008\\_07.pdf](http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo_2008_07.pdf)
- Paz, M. (2000). Ensayo Agronómico para el establecimiento de Rosa multiflora Thund. *in vitro*. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 61 p.
- Pérez, M., Delgado, M., Hernández, C. y Armas, R. (2008). Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma. Cultivos Tropicales, 29 (1), 23-28. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193221581004.pdf>
- Peter, M., Jorgensen y León-Yanez, S. (1999). Catálogo de plantas vasculares del Ecuador Missouri. Prensa del jardín botánico de Missouri, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 915297606
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3º Edit. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España, ISBN 958-9183-15-8
- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, P., Rocha, M. y Durzan, D. (2005). Biotecnología Vegetal. Santiago, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).
- Pucha-Cofrep, D., Feijoo, C., Yaguana, M. y Eras, V., (2021). Sensibilidad de *Cinchona officinalis* L., al estrés hídrico: cambios morfológicos y anatómicos de la madera. Bosques Latitud Cero, 10(2), 27- 43. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/860>
- Quito, G., Quito, M., Aguirre, Z. y Urgiles, J. (2021). Productos forestales no maderables de origen vegetal de la parroquia Valladolid, cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe. Bosques Latitud Cero, 11(1), 1–14. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/916>
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación *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>.

- Robert, M., Reyes, J. y Loyola, V. (1991). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. Fundamentos y aplicaciones (pp. 211–238). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), p.32. [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. CIAT. p 1039.
- Rodríguez, J. y Nieto, V. (1999). Investigación en Semillas Forestales Nativas. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal, Serie Técnica/Nº 43. Bogotá. 89 p. ISSN: 0121-0300.
- Rosas, J. (2022). La extinción del árbol de la quina por la actividad agrícola a propósito de la tradición Los polvos de la condesa. El Palma de la Juventud, Facultad de Medicina Humana, Universidad Ricardo Palma Lima, Perú 4(4), 161–175 <https://orcid.org/0000-0003-0493-3951>
- Rueda, J. (2020). Procesos biotecnológicos para la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., de relictos boscosos de la provincia de Loja. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja].
- Salama, M., Ezzat, S. y Salem, M. (2020) Bioactive lead compounds and molecular targets for the treatment of heart disease. Phytochemicals as lead compounds for new drug discovery's. Pharmacy.488. <https://buescholar.bue.edu.eg/pharmacy/488>
- Sanchez, T., Altamirano, M., Huaman, M., Guelac, M., Rojas, K. y Morales, E. (2022). Efecto de micorrizas arbusculares y abonos orgánicos en el comportamiento vegetativo de *Cinchona officinalis* L., en ambientes controlados. Revista Científica Pakamuros, 10(3), 1 - 13. <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v10i3.311>
- Sebastián, M. y Aguirre, M. (2012). Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas Escuela de Pregrado Memoria de Título efecto del fotoperíodo sobre la duración de la fase vegetativa en tres accesiones chilenas de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.).

- Skoog, F. y Miller, C., (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11: 118-131
- Smith, C., Wood J., (1998). Biología molecular y biotecnología. Addison Welsley Longman. España. 247. p.
- Smith, R. (2012). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA 3rd edition
- Steward, F., Mapes, M., Mears, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am J Bot 45: 705-708
- Suarez, I. (2020). Cultivo de Tejidos Vegetales, Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Cra. 6 n. 77 -305 Montería Colombia, ISBN 978-958-5104-09-9
- Thieman, W. y Palladino, M. (2010). Introducción a la biotecnología, Bioquímica. Biología molecular. Biofísica. ISBN: 978-84-7829-117-5
- Thorpe, T. (2014). History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition
- Viasus, G., Álvarez, J. y Alvarado, O. (2013). Efecto de la aplicación de giberelinas y 6-bencilaminopurina en la producción y calidad de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). Bioagro, Vol. 25(3), 195-200. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612013000300007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000300007&lng=es&tlng=es)
- Viasus, G., Álvarez, J. y Alvarado, O. (2013). Efecto de la aplicación de giberelinas y 6-bencilaminopurina en la producción y calidad de fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch.). Bioagro, 25(3), 195-200. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612013000300007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000300007&lng=es&tlng=es)
- Villalobos, M. y Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In Ciat (pp. 127–142).
- Wasis y Edhi. (2020). Ecological study of kina tree (*Cinchona* spp.) and its benefits in overcoming the spread of malaria disease. DOI:10.13140/RG.2.2.22794.21441

- Wegier, A.; Barba, F; García, J. y Pérez S. (2013). Método para el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) a partir de explantes vegetativos. Manual Técnico Núm. 10. CENID-COMEF, INIFAP. México, D.F. México. 84 p
- Yépez, A. (2006). Revigorización y establecimiento *in vitro* de *Gemelina arbórea* Roxb. V. Mediante cultivo de tejidos vegetales. Colombia Forestal, 9(19), 70-87.
- Yoshida F, T Kobayashi, T Yoshida (1973). The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of salts, sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. Plant Cell Physiol. 14:329-339.

## 11. Anexos

**Anexo 1.** Concentraciones hormonales de dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo*, en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 90 días de evaluación.

Nº. de tratamientos	Reguladores hormonales	Codificación
T1	Sin Hormonas	T1: BAP0.K0-FP
T2	2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T2: BAP2.K0-FP
T3	3,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T3: BAP3.K0-FP
T4	0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T4: BAP0.K2-FP
T5	0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T5: BAP0.K3-FP

Leyenda: T: Tratamiento. BAP: Benzil amino purina. KIN: Kinetina. FP: Fotoperiodo.

**Anexo 2.** Concentraciones hormonales de dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo*, en condiciones de oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

Nº. de tratamientos	Reguladores hormonales	Codificación
T1	Sin Hormonas	T1: BAP0.K0-OSC
T2	2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T2: BAP2.K0-OSC
T3	3,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T3: BAP3.K0-OSC
T4	0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T4: BAP0.K2-OSC
T5	0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 3,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	T5: BAP0.K3-OSC

Leyenda: T: Tratamiento. BAP: Benzil amino purina. K: Kinetina. OSC: Oscuridad.

**Anexo 3.** Datos obtenidos en la inducción de brotes *de novo*, bajo el efecto de la concentración hormonal de dos citoquininas y el fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 90 días de evaluación.

Tratamientos	Rep.	Callos fenolizados (%)	Contaminación (%)	Mortalidad (%)	Callo con raíces (%)	Raíces <i>de novo</i> (%)	Longitud de raíces (mm)
<b>T0</b> 0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP/KIN	1	30	0	30	90	52,12	0,28
	2	0	0	0	70	18,98	0,07
	3	0	0	0	80	28,90	0,12
<b>T1</b> 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	1	20	0	20	70	27,73	0,08
	2	30	0	30	60	43,70	0,05
	3	10	0	10	40	28,57	0,06
<b>T2</b> 3,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	1	0	0	0	50	29,82	0,06
	2	20	0	20	50	15,79	0,06
	3	0	0	0	50	54,39	0,06
<b>T3</b> 2,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	1	20	0	20	50	70,33	0,08
	2	10	0	10	40	7,69	0,04
	3	30	0	30	30	21,98	0,08
<b>T4</b> 3,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	1	0	0	0	50	35,62	0,11
	2	0	0	0	50	49,32	0,09
	3	40	6,67	60	60	15,07	0,08

Leyenda: T: tratamiento. BAP: Benzil Amino Purina. KIN: Kinetina.

**Anexo 4.** Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas, bajo el efecto de la concentración de dos citoquininas y la oscuridad total, a los 90 días de evaluación.

Tratamientos	Rep.	Callos fenolizados (%)	Contaminación (%)	Mortalidad (%)	Callo con raíces (%)	Raíces <i>de novo</i> (%)	Longitud de raíces (mm)
<b>T0</b> 0,0 mg L <sup>-1</sup> BAP/KIN	1	9,00	0	0	80	46,07	0,19
	2	13,17	0	0	50	4,88	0,11
	3	5,33	0	0	60	49,05	0,22
<b>T1</b> 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	1	3,17	0	0	20	2,42	0,02
	2	6,83	0	0	10	1,61	0,01
	3	9,33	0	0	70	95,97	0,15
<b>T2</b> 3,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	1	6,83	0	0	70	54,76	0,15
	2	3,17	0	0	50	35,71	0,07
	3	9,50	0	0	10	9,52	0,01
<b>T3</b> 2,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	1	6,67	0	0	70	86,86	0,15
	2	8,67	0	0	70	8,69	0,08
	3	7,33	0	0	70	4,45	0,12
<b>T4</b> 3,0 mg L <sup>-1</sup> KIN	1	7,17	0	0	70	70,83	0,09
	2	8,17	0	0	40	18,06	0,08
	3	8,17	0	0	40	11,11	0,08

Leyenda: T: tratamiento. BAP: Benzil Amino Purina. KIN: Kinetina.

**Anexo 5.** Poster científico con los resultados preliminares, para la difusión a los participantes del Simposio Internacional de Ciencias Forestales: “Bosque, Agua y Biodiversidad”, desarrollado por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL.



Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal



**Proceso morfogénico para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad**

Sayda Nidia Ramon Abad <sup>1\*</sup>; Víctor Hugo Eras Guamán <sup>1,2,3</sup>; Magaly Yaguana Arévalo <sup>1,2,3</sup>; Darlin Ulises González Zaruma <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.

<sup>2</sup>Laboratorio de Micropropagación Vegetal

<sup>3</sup>Proyecto de investigación *Cinchona* 02-DI-FARNR-2021

\*Autor para correspondencia: sayda.ramon@unl.edu.ec

**INTRODUCCIÓN**

*Cinchona officinalis* L., se distribuye naturalmente entre 1000 – 3500 m. s.n.m., en los bosques siempreverde montano bajo de la Cordillera Oriental y Occidental de los Andes, (Jørgensen y León-Yáñez, 1999). Las poblaciones de la cascarrilla en Loja se encuentran en estado de Amenazada (Benhagen et al., 2004).



Fig. 1. Vitroplanta de *Cinchona officinalis* L.

La especie y el género en condiciones naturales, tiene un desarrollo lento y una tasa de germinación baja (Gutiérrez, Jaramillo, y Aguirre, 2022). La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, permite la propagación masiva de brotes *de novo* en condiciones controladas

**Objetivos:**

- Determinar el efecto del fotoperíodo y dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Evaluar el efecto de la oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

**METODOLOGÍA**



Fig. 2. Preparación del medio de cultivo MS-1962 + KIN y BAP. A) Soluciones minerales del medio de cultivo MS-1962. B) Adición de vitaminas. C) Adición de vitaminas reguladores de crecimiento.



Fig. 3. Inoculación dentro de cámara de flujo. A) Materiales para la disección y siembra de los callos. B) Desinfección de piezas en el mechero de Bunsen. C) Estructura callogénica. D) Disección de la estructura callogénica. E) Siembra del callo. F) Medio de cultivo con dos callos.



Fig. 4. Evaluación de ensayos con el equipo de investigación.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en la inducción de brotes *de novo*, provenientes de callos de *Cinchona officinalis* L.

Nº.	Tratamientos	Reguladores de Crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )	Codificación	
		BAP	Kinetina	
1	T0	0.0	0.0	T0BAP0KIN0
2	T1	3.0	0.0	T1BAP3KIN0
3	T2	3.0	0.0	T2BAP3KIN0
4	T3	0.0	7.0	T3BAP0KIN7
5	T4	0.0	3.0	T4BAP0KIN3

**RESULTADOS**

**FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO* EN FOTOPERÍODO**

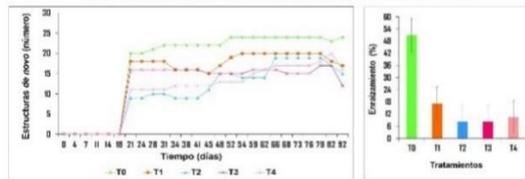


Fig. 5. Formación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo, a los 90 días de evaluación.

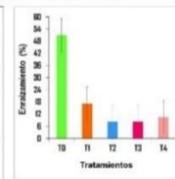


Fig. 6. Enraizamiento de los callos de *Cinchona officinalis* L.



Fig. 7. A) Estructuras callogénicas fenolizadas. B) Formación de raíces. C) Contaminación.

**FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO* EN LA OSCURIDAD**

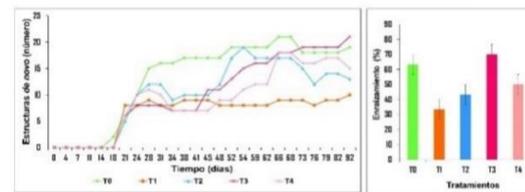


Fig. 8. Formación de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad, a los 90 días de evaluación.

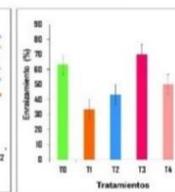


Fig. 9. Enraizamiento de los callos de *Cinchona officinalis* L.



Fig. 10. A) Formación de raíces. B) Presencia de callosidad. C) Estructuras callogénicas fenolizadas.

**CONCLUSIONES**

- El fotoperíodo (16/8) incidió positivamente en el desarrollo de brotes *de novo*, pero de forma negativa en la sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.
- La oscuridad influyó positivamente en el desarrollo de brotes *de novo* y en la sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. inoculadas *in vitro*.
- Existe una relación directa entre la oxidación fenólica y la sobrevivencia de los callos, puesto que a medida que el nivel de oxidación fenólica incrementaba, en algunos casos provocó la subsiguiente muerte de los callos.

**BIBLIOGRAFÍA**

Gutiérrez, A., Jaramillo, N. y Aguirre, Z. (2022). Especies Endémicas que se conservan en el Jardín Botánico "Reinaldo Espinoza". Universidad Nacional de Loja, Ecuador. <https://reinaldoespinoza.files.wordpress.com/2020/06/especies-endemicas.pdf>

Jørgensen, P., y León, M. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden, 75: 1-1182 p.

Buddenhagen, C., Rentería, J., Gardner, M., Wilkinson, S., Soría, M., Yáñez, P., Tye, A., Valle, R. (2004). Control de un árbol altamente invasivo *Cinchona*, en Galápagos. Tecnología de matuzas 18: 1194-1202



CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Educamos para Transformar

## Anexo 6. Tríptico para la difusión de resultados con actores sociales interesados.

### Cara anterior

#### 3.2. Porcentaje de estructuras calogénicas *Cinchona officinalis* L., que formaron brotes de novo.

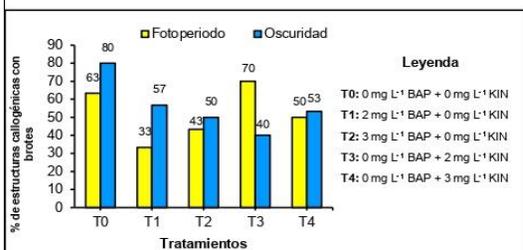


Figura 2. Porcentaje de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L. con brotes de novo, a los 90 días de evaluación.

#### 3.3. Número promedio de brotes de novo en las estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

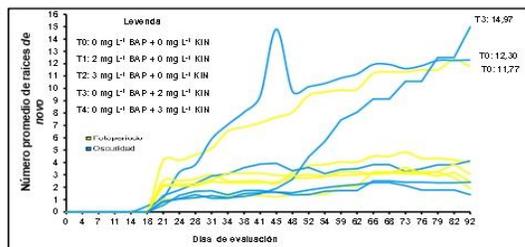


Figura 3. Curva acumulativa del número promedio de raíces de novo en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

#### 3.4. Porcentaje promedio de formación de raíces de novo en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

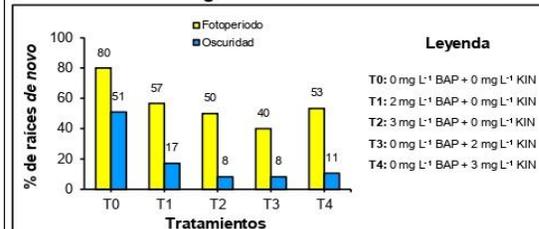


Figura 3. Porcentaje promedio de formación de raíces de novo en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

#### 3.5. Longitud promedio de raíces de novo en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

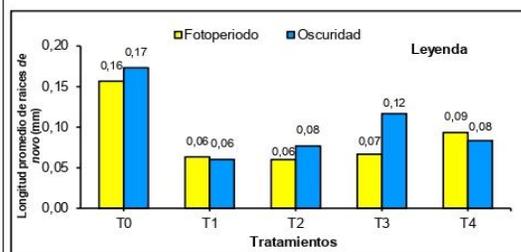


Figura 5. Longitud promedio de raíces de novo en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación.

#### CONCLUSIONES

- El porcentaje de sobrevivencia de las estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., tanto en condiciones de fotoperiodo, como en oscuridad total, alcanzó altos niveles (99,30 %), por tratarse de material vegetal *in vitro* que se desarrolla en condiciones de asepsia.
- En la formación de brotes de novo, a partir de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., el uso de las dos citoquininas benzil amino purina y kinetina, en dos concentraciones (2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>), arrojó resultados relativamente bajos; por el contrario, se llegó a inducir en la masa amorfa de células indiferenciadas, raíces de novo, posiblemente porque se trabajó con tejidos jóvenes, que contienen de forma natural, altas concentraciones de auxinas endógenas.
- En la inducción de raíces de novo, a partir de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., los mayores porcentajes se presentaron en condiciones de fotoperiodo (51 %) y en condiciones de oscuridad total (35 %), en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) sin ningún nivel de citoquininas (0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP y 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN).



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

### FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

#### Carrera de Ingeniería Forestal

#### Laboratorio de Micropropagación Vegetal

PROCESO MORFOGÉNICO PARA LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS DE NOVO, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., EN CONDICIONES DE FOTOPERIODO Y OSCURIDAD.



#### AUTORA:

Sayda Nidia Ramon Abad

#### DIRECTOR:

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Loja-Ecuador  
2023

## Cara posterior

INTRODUCCIÓN	METODOLOGÍA	2.3. Inoculación de los explantes
<p><i>Cinchona officinalis</i> L., es una especie forestal nativa de los Andes, emblemática del Ecuador, con una importancia medicinal, cultural e histórica; asimismo, en su hábitat natural, sus poblaciones son <b>amenazadas</b> y explotadas por actividades antropogénicas para el aprovechamiento de sus alcaloides comercializables que contiene la corteza. (Quito-Ulloa et al., 2021; Cueva-Agila et al., 2019). Sin embargo, no está reportada como endémica en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Gutiérrez et al., 2022).</p> <p>Frente a esta problemática, surgen las técnicas biotecnológicas como una alternativa válida para la recuperación de sus poblaciones, a partir de la producción masiva de plantas, en un ambiente artificial controlado, en ambientes y espacios reducidos. Por ello, en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, con el apoyo logístico y financiero de la Universidad Nacional de Loja, se desarrolló el trabajo de investigación, con la finalidad de contribuir a la propagación y conservación de la especie, para la provincia de Loja y el país.</p> <p><b>OBJETIVO GENERAL:</b></p> <p>Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la influencia de la luz y la oscuridad, en la inducción de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Determinar el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.</li><li>• Evaluar el efecto de la oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.</li><li>• Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación</li></ul>	<p><b>1. Ubicación del sitio de estudio</b></p>  <p>Figura 1. Localización del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UNL.</p> <p><b>2. Metodología para evaluar el efecto del fotoperiodo, oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.</b></p> <p><b>2.1. Obtención del material vegetal</b></p> <p>El material vegetal que se utilizó para la fase de inducción <i>in vitro</i> de brotes <i>de novo</i>, provino de vitroplantas del árbol semillero N° 3, de <i>Cinchona officinalis</i> L.; a partir de callos friables obtenidos en la fase de callogénesis previamente establecida, se seleccionaron callos con características deseables, lo que evidenció vitalidad del material vegetal seleccionado.</p> <p><b>2.2. Preparación del medio de cultivo sólido</b></p> <p>El medio de cultivo se preparó con las 5 sales minerales de Murashige y Skoog (1962), el cual fue suplementado con vitaminas: Thiamina 1,0 mg L<sup>-1</sup> y mio-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>; además, se adicionó la sacarosa al 2,0 % y como solidificante el agar al 0,6 %; las citoquininas fueron el benzil amino purina y kinetina en 3 niveles (0,0; 2,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup>); se ajustó el pH de 5,8 ± 0,2; a continuación, se distribuyó a razón de 25 ml en frascos de vidrio tipo compota y se esterilizaron en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión por 20 minutos.</p>	<p>Dentro de la cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia, los callos fueron inoculados 2 por frasco, finalmente fueron etiquetados y trasladados al cuarto de incubación, donde se sometieron a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, mientras que, en el caso de oscuridad, se cubrieron con una caja de cartulina negra. Las evaluaciones se realizaron por observación directa cada 3 a 4 días a partir del tercer día de la inoculación, durante 90 días.</p> <p><b>2.4. Variables evaluadas</b></p> <p>Se evaluó el número, días a la contaminación, fenolización y mortalidad de las estructuras calogénicas; y, la longitud, número y días a la formación de brotes <i>de novo</i>.</p> <p><b>2.5. Análisis estadístico</b></p> <p>Los datos, se analizaron en el software Excel, InfoStat y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA); y, el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad para identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.</p> <p><b>RESULTADOS</b></p> <p><b>3. Efecto del fotoperiodo, oscuridad y la combinación hormonal de dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.</b></p> <p><b>3.1. Días y porcentaje de contaminación de los callos:</b></p> <p>La contaminación de las estructuras calogénicas en condiciones de fotoperiodo, en los tratamientos T0, T1, T2 y T3 no se evidenció contaminación (0 %); mientras que, el T4 (3,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), presentó tan solo el 6,67 %, a los 66 días de evaluación y el microorganismo causante fue por bacterias. Sin embargo, la contaminación de los callos sometidos a oscuridad total, fue nula del 0 %, en todos los tratamientos, durante los 90 días de evaluación.</p>

## Anexo 7. Certificado de traducción

Lic. Carlos Fernando Velastegui Aguilar  
Certified English Teacher

### CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés, del resumen del trabajo de titulación, titulado: **Proceso morfogénico para la inducción de estructuras de novo, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.**, de autoría de la estudiante Sayda Nidia Ramon Abad, con número de cédula 1104762974, egresada de la carrera de Ingeniería Forestal, de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifica en honor a la verdad y autoriza a la interesada, hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.

Loja, 08 de septiembre del 2023



Lic. Carlos Fernando Velastegui Aguilar  
**LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN MENCIÓN INGLÉS**  
Numero de registro: 1031-2022-2463645  
C.I.: 1105165672