



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

Carrera de Ingeniería Forestal

TESIS

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cinchona
officinalis* L., A PARTIR DE DIFERENTES
FUENTES DE MATERIAL VEGETAL”.**

*Tesis de grado previo a la obtención
del Título de Ingeniero Forestal.*

Autor:

Nelson Ramiro Lima Jiménez

Director:

Ing. José Antonio Moreno Serrano, Mst.

Codirectora:

Ing. Julia Esther Minchala Patiño

**Loja – Ecuador
2016**

CERTIFICACIÓN

Ing. José Antonio Moreno Serrano, Mst.

En calidad de Director de la tesis titulada **“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE MATERIAL VEGETAL”**, de autoría del Señor Egresado de la Carrera de Ingeniería Forestal **Nelson Ramiro Lima Jiménez**, ha sido revisada y aprobada en su integridad dentro del cronograma; por lo que autorizo su presentación y publicación.

Loja, Mayo del 2016

Atentamente:



Ing. José Antonio Moreno Serrano, Mst.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE
Cinchona officinalis L., A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE
MATERIAL VEGETAL”**

TESIS DE GRADO

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

INGENIERO FORESTAL

En la:

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

APROBADA:



Ing. Narcisa Urgiles Gómez, Ph. D.

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL CALIFICADOR



Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

VOCAL



Ing. Marjorie Cristina Díaz López, Mg. Sc.

VOCAL

AUTORÍA

Yo, Nelson Ramiro Lima Jiménez, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autor: Nelson Ramiro Lima Jiménez

Firma: -----

Cédula: 1900673326

Fecha: 16 de mayo del 2016

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

Yo, Nelson Ramiro Lima Jiménez, declaro ser el autor, de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE MATERIAL VEGETAL**”, como requisito para obtener el grado de Ingeniero Forestal, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional

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

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 16 días del mes de mayo del 2016.

Firma:.....

Autor: Nelson Ramiro Lima Jiménez

Número de cédula: 1900673326

Dirección: Loja, Coliseo ciudad de Loja, calles Brasil y Avenida Manuel Agustín Aguirre

Correo electrónico: braiklima_15@hotmail.com

Teléfono celular: 0990308786

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Ing. José Antonio Moreno Serrano, Mst.

Codirectora de tesis: Ing. Julia Esther Minchala Patiño

Tribunal de grado: Ing. Narcisa Urgiles Gómez, Ph. D.

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Ing. Marjorie Cristina Díaz López, Mg. Sc

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi madre y padre, que con su demostración ejemplar me han enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A la Universidad Nacional de Loja, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a todos los docentes que compartieron sus valiosas experiencias y conocimientos para mi formación.

Al Ing. José Antonio Moreno Serrano, director de tesis, por su valiosa guía y asesoramiento en la realización de la misma.

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación; especialmente al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc., e Ing. Julia Minchala Patiño, quienes me permitieron formar parte del proyecto de investigación.

Al equipo técnico del Proyecto y Laboratorio de Micropropagación Vegetal; Ing. Magaly Yaguana, Ing. Cristian Valarezo e Ing. Darlin González, agradezco por sus orientaciones y apoyo desinteresado en el transcurso de la investigación,

A los Señores Miembros del Tribunal Calificador: Ing. Narcisa Urgiles Gómez, Ph. D., Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc., e Ing. Marjorie Cristina Díaz López, Mg. Sc., por las valiosas sugerencias realizadas en la presente investigación.

DEDICATORIA

Este logro es una parte de mi vida, y el comienzo de otra etapa, por esto y más, la dedico a Dios que me cuida y me da fortaleza espiritual en los momentos difíciles.

A mis amados padres Nelson Lima y Olga Yaguana, por brindarme su apoyo incondicional cada momento de mi vida; por sus valiosos consejos, por su inmenso amor y comprensión.

A mis hermanos Shul y Robinson, quienes fueron la motivación principal de mi esfuerzo y sacrificio para cumplir la meta propuesta.

A todos mis familiares, abuelitos, tíos, primos y amigos que me ofrecieron su apoyo en los momentos difíciles y me alentaron a seguir adelante.

Y de manera especial, a una persona que estuvo a mi lado desde el inicio de mi carrera, quien me brindó su amor y comprensión en cada momento y supo tender su mano para apoyarme cuando más lo necesitaba, Jhenny Mendieta.

Ramiro Lima J.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	II
APROBACIÓN.....	III
AUTORÍA.....	IV
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY.....	XIX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Descripción de la Especie <i>Cinchona officinalis</i> L.	3
2.1.1. Antecedentes históricos	3
2.1.2. Etimología	3
2.1.3. Descripción del género <i>Cinchona</i>.....	3
2.1.4. Clasificación botánica de la <i>Cinchona officinalis</i> L.....	4
2.1.5. Descripción botánica	4
2.1.6. Usos	5
2.1.7. Distribución geográfica en el Ecuador.....	5
2.1.8. Categoría de amenaza	5
2.2. Biotecnología	5
2.2.1. Biotecnología vegetal	6
2.2.2. Fundamentos de la propagación de especies vegetales.....	6
2.2.3. Propagación asexual o vegetativa.....	6
2.3. Micropropagación.....	7
2.3.1 Ventajas de la micropropagación.....	7

2.3.2.	Desventajas de la micropropagación	7
2.3.3.	Cultivo <i>in vitro</i>	8
2.3.4.	Cultivo aséptico	8
2.3.5.	Selección del inóculo	8
2.3.6.	Factores externos que inciden en la micropropagación	9
2.3.6.1.	Planta donante	9
2.3.6.2.	Explante	9
2.3.7.	Etapas de la Micropropagación.....	9
2.3.7.1.	Etapa 0: Preparación del material vegetal	10
2.3.7.2.	Etapa 1: Establecimiento del cultivo.....	10
2.3.7.3.	Etapa 2: Multiplicación.....	11
2.3.8.	Medio de Cultivo.....	11
2.3.8.1.	Las sales inorgánicas o minerales.....	12
2.3.8.2.	Compuestos orgánicos	12
2.3.8.3.	Preparaciones naturales complejas.....	14
2.3.8.4.	Materiales inertes.....	14
2.3.9.	Factores ambientales de incubación.....	14
2.3.9.1.	Luz.....	14
2.3.9.2.	Temperatura	15
2.3.9.3.	Humedad	15
2.3.9.4.	Oxígeno	15
3.	METODOLOGÍA	16
3.1.	Ubicación del Área de Estudio	16
3.1.1.	Fase de campo.	16
3.1.1.1.	Quebrada El Naque (Cantón Loja)	16
3.1.1.2.	Quebrada San Simón (Cantón Loja)	17
3.1.1.3.	Sitio Uritusinga (Cantón Catamayo)	17

3.1.1.4.	Parroquia Selva Alegre (Cantón Saraguro):.....	17
3.1.2.	Fase de laboratorio	18
3.2.	Metodología para evaluar la desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L., usando distintas concentraciones y tiempos de inmersión en Hipoclorito de Sodio, durante la fase de implantación de las semillas.....	18
3.2.1.	Selección y desinfección de las semillas	18
3.2.1.1.	Selección de semillas	18
3.2.1.2.	Desinfestación de semillas	19
3.2.2.	Preparación del medio de cultivo	20
3.2.3.	Siembra de semillas <i>in vitro</i>	20
3.2.4.	Diseño experimental	21
3.2.5.	Especificaciones del diseño experimental	22
3.2.6.	Unidad experimental y evaluación	23
3.2.7.	Hipótesis del modelo	23
3.3.	Metodología para evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales, para la fase de multiplicación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> . 24	
3.3.1.	Preparación del medio de cultivo	24
3.3.2.	Siembra <i>in vitro</i> de explantes y condiciones de incubación	25
3.3.3.	Diseño experimental para la fase multiplicación de explantes	26
3.3.4.	Especificaciones del diseño experimental	26
3.3.5.	Unidad experimental y evaluación	27
3.3.6.	Hipótesis del modelo	28
3.4.	Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores involucrados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal.....	28
4.	RESULTADOS	29
4.1.	Desinfección <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	29

4.1.1.	Porcentaje de contaminación.....	29
4.1.2.	Número de días a la contaminación	30
4.2.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	31
4.2.1.	Porcentaje de semillas germinadas	31
4.2.2.	Número de días a la germinación.....	31
4.3.	Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Cinchona officinalis</i> L.	33
4.3.1.	Porcentaje de contaminación.....	33
4.3.2.	Porcentaje de mortalidad.....	33
4.3.3.	Número de brotes formados por explante.....	34
4.3.4.	Tamaño del brote.....	35
4.3.5.	Número de hojas por explante.....	35
4.3.6.	Número de nudos por explante	36
5.	DISCUSIÓN	37
5.1.	Desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	37
5.2.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	38
5.3.	Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Cinchona officinalis</i> L.	40
6.	CONCLUSIONES	42
7.	RECOMENDACIONES	43
8.	BIBLIOGRAFÍA	44
9.	ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962)	12
Cuadro 2. Diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 3.....	21
Cuadro 3. Tratamientos para la desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L...	22
Cuadro 4. Hoja de registro para evaluar la desinfección y germinación de semillas de <i>C. officinalis</i> L., a nivel de laboratorio.....	23
Cuadro 5. Tratamientos para evaluar la interacción de auxinas – citoquininas en la fase de inducción de brotamiento múltiple de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	24
Cuadro 6. Diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 2x2.....	26
Cuadro 7. Hoja de registro para evaluar las variables: porcentaje de contaminación y mortalidad en fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	27
Cuadro 8. Hoja de registro para evaluar las variables en la fase de multiplicación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de ubicación de las cuatro áreas de estudio.....	16
Figura 2.	Selección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L., con las mejores características fenotípicas.	18
Figura 3.	Desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L. en la cámara de flujo laminar.	19
Figura 4.	Enjuague de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L., con agua esterilizada luego de aplicar alcohol etílico y el hipoclorito de sodio	19
Figura 5.	Preparación y esterilización del medio de cultivo.....	20
Figura 6.	Siembra de semilla de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la cámara de flujo laminar.	21
Figura 7.	Preparación del medio de cultivo MS., adicionado la interacción hormonal auxinas – citoquininas.....	25
Figura 8.	Siembra <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	25
Figura 9.	Porcentaje promedio de contaminación de los tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	29
Figura 10.	Número de días a la contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	30
Figura 11.	Porcentaje promedio de germinación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	31
Figura 12.	Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG ₃ aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	32
Figura 13.	Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	33

Figura 14. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	34
Figura 15. Promedio de formación de brotes por explante, en los tratamiento aplicados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de invernadero <i>Cinchona officinalis</i> L.	34
Figura 16. Promedio de altura de los brotes (cm) en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	35
Figura 17. Número promedio de hojas formadas por explante en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	36
Figura 18. Número promedio de nudos formados en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	52
Anexo 2. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de germinación <i>in vitro</i> de semillas <i>Cinchona officinalis</i> L.	54
Anexo 3. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	56
Anexo 4. Imágenes del ensayo de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	59
Anexo 5. Imágenes del ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Cinchona officinalis</i> L.	60
Anexo 6. Imágenes de la toma de datos de los diferentes ensayos durante la investigación	61
Anexo 7. Imágenes de la socialización de la tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.	62
Anexo 8. Imágenes de la socialización de los resultados de la tesis a los estudiantes de Quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal.....	62
Anexo 9. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis	63

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE
Cinchona officinalis L., A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE
MATERIAL VEGETAL”**

RESUMEN

La Cascarilla *Cinchona officinalis* L, es una especie endémica y nativa del valle de Loja, es considerada como uno de los géneros de mayor importancia por su valor medicinal; lo cual ha causado una sobre explotación superando los límites de regeneración natural; es por ello que se encuentra en peligro de extinción. La micropropagación vegetal es una herramienta útil para la conservación de especies amenazadas, mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede incrementar el número de individuos por unidad de superficie de cualquier especie.

En este contexto la micropropagación de *Cinchona officinalis* L., se realizó con el propósito de generar información sobre los procesos biotecnológicos, que permitan la propagación *in vitro* de la especie con fines de conservación.

La presente investigación se desarrolló dentro del marco del proyecto “**Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro***”, en dos fases: de campo y de laboratorio; dentro el periodo comprendido entre mayo 2015 – enero 2016. La fase de campo correspondió a la recolección de material vegetal en los sectores de Loja: en las quebradas del Naque y San Simón, Catamayo sitio Uritusinga y en Saraguro en la parroquia Selva Alegre, sitio Santa Lucía; y, la segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

En la fase de laboratorio se utilizó el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con diversos reguladores de crecimiento. Para el ensayo de desinfección de semillas se aplicó hipoclorito de sodio (Ajax) en tres concentraciones (15, 25 y 50 %) en tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min.) respectivamente, donde los mejores tratamientos para controlar la contaminación fue 50 % de hipoclorito de sodio, durante 5, 10 y 15 min. Para la germinación *in vitro* de semillas se adicionó al medio de cultivo ácido giberélico (AG₃) en tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1,0 mg/l); encontrándose el mayor porcentaje de germinación (74,44 %) en el T3, con una concentración de 1,0 mg/l de AG₃.

Para el ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes, se utilizó tres reguladores de crecimiento, la auxina: ácido naftalenacético (ANA) y dos citoquininas: benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN), en dos concentraciones 0,2 y 2,0 mg/l respectivamente, logrando

los mejores resultados en la combinación hormonal de 0,2 ANA + 2,0 BAP; el mismo que permitió obtener 4,73 brotes desarrollados, con 0,83 cm de altura, 27 hojas y 12,10 nudos promedio formados por cada explante.

La presente investigación permitió ensayar los procesos biotecnológicos para la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. con la finalidad de emprender en el futuro en programas de mejoramiento genético, forestación y reforestación de la especie, que permita la recuperación de ecosistemas nativos degradados especialmente de la región sur del Ecuador.

Palabras clave: *Cinchona officinalis* L., *in vitro*, micropropagación, cascarilla.

SUMMARY

The Cascarilla *Cinchona officinalis* L., is a native and endemic species of the Valley of Loja, it is considered as one of the most important genres for its medicinal value; which has caused over exploitation exceeding the limits of natural regeneration; The refore, it is in danger of extinction. Plant micropropagation is a useful tool for the conservation of endangered species, by using the techniques of *in vitro* culture you can increase the number of individuals per unit area of any species.

In this context the micropropagation of *Cinchona officinalis* L., was carried out in order to generate information on biotechnological processes, which allow the *in vitro* propagation of the species for conservation purposes.

This research was developed within the framework of the project "**identification and description of the current state of *Cinchona officinalis* L., in the province of Loja, and generation of protocols for *in vivo* and *in vitro* propagation**", in two phases: field and laboratory; within the period between May 2015 - January 2016. The field phase corresponded to the collection of plant material in the areas of Loja: in the streams of the Naque and San Simon, Catamayo, Uritusinga sites and Saraguro in Selva Alegre parish, and the second phase was conducted in the laboratory of plant micropropagation of the Universidad Nacional de Loja.

The laboratory phase was used in MS (Murashige and Skoog, 1962) basal culture medium, supplemented with different plant growth regulators. For disinfection of seed testing was applied (Ajax) sodium hypochlorite at three concentrations (15, 25 and 50%) in three times of immersion (5, 10 and 15 min.) respectively, where the best treatments to control pollution was 50% sodium hypochlorite for 5, 10 and 15 min. For the *in vitro* germination of seeds was added to the culture medium (AG₃) gibberellic acid in three concentrations (0,0; 0,5 and 1,0 mg/l); finding the highest percentage of germination (74,44%) in T3, with a concentration of 1,0 mg/l of AG₃.

To test *in vitro* propagation of explants, used three regulators of growth, the Auxin: naphthaleneacetic acid (ANA) and two cytokinins: benzilaminopurina (BAP) and kinetin (KIN), in two concentrations 0,2 and 2,0 mg/l respectively, achieving the best results in the

hormone combination of 0,2 ANA 2.0 BAP; the same one that allowed 4,73 developed buds, with 0,83 cm height, 27 leaves and 12,10 average knots formed by each explant.

This research allowed to rehearse the biotechnological processes for the *in vitro* propagation of *Cinchona officinalis* L. in order to undertake in the future programs of breeding, afforestation and reforestation of the species, which allow the recovery of native ecosystems degraded especially in the Southern region of the Ecuador.

Key words: *Cinchona officinalis* L., *in vitro*, micropropagation, cascarilla.

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

Todos estos aspectos resaltan la necesidad de aplicar técnicas alternativas para la propagación sexual y asexual en condiciones de cultivo *in vitro*, como una herramienta para la conservación y rescate de las especies en peligro de extinción (González, 2002).

Es por ello, que existe una gran importancia en realizar estudios alternativos que permitan la protección y propagación de la especie, ya que aún no se reporta investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. El cultivo de

tejidos *in vitro* de dicha especie es un método alternativo que contribuye a obtener plántulas sanas en mayor número, menor espacio y tiempo.

La presente investigación se realizó con el propósito de generar información sobre los procesos biotecnológicos, que permitan la propagación *in vitro* de mencionada especie, con fines de conservación y aportar al proyecto “**Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro***”, que la Universidad Nacional de Loja lleva a cabo a través del Laboratorio de Micropropagación Vegetal; con la finalidad de emprender programas de forestación y reforestación para recuperar los ecosistemas nativos degradados de la región sur del Ecuador.

Los objetivos que orientaron la presente investigación fueron los siguientes:

Objetivo General

- Aportar a la generación de información sobre los procesos biotecnológicos, que permitan la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación de la especie.

Objetivos Específicos

- Evaluar la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión.
- Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas obtenidas *in vitro*.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

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

2.1.1. Antecedentes históricos

La cascarilla o “quina” es considerada como uno de los principales productos forestales del Ecuador, siendo económicamente más importante desde el punto de vista medicinal simbolizando el origen histórico del “árbol de la vida” o “planta salvadora de la humanidad”. En ese aspecto; la provincia de Loja fue la primera en adquirir fama como la más importante fuente de *Cinchona* (Madsen, 2002), atribuyéndose su origen y principal centro de producción al nudo de Cajanuma (Buitrón, 1999).

Descubierta en el siglo XVII, la cascarilla o quina, contiene en su corteza un compuesto que fue utilizada desde el tiempo de los Incas para curar el paludismo o malaria, y fue considerada como la “Salvación de la Humanidad”, por ser el remedio contra las fiebres palúdicas (Hernández, 2015).

Está constituida por cuatro compuestos (alcaloides), más conocidos y estudiados de *Cinchona* que están presentes en su corteza: cinchona, cinchonidina, quinidina y quinina, siendo el último el más importante antimalárico. En 1820, se aisló el alcaloide quinina con el cual se pudo certificar su contenido en las diferentes especies de *Chinchona* sp. (Tapia, 2013).

2.1.2. Etimología

Este género está dedicado a Ana Osorio, esposa de Luis J. Fernández de Cabrera y Bobadilla, Conde de Chinchón, que logro curarse gracias a la corteza de quina o cascarilla de la fiebre palúdica que padecía en 1632 (Loayza y Sánchez, 2006). De la corteza se obtiene la quinina el más antiguo remedio de la malaria.

2.1.3. Descripción del género *Cinchona*

El género *Cinchona* sp., es nativo de los valles andinos de Sudamérica, pertenece a la familia Rubiaceae y se distribuye desde 10° latitud norte hasta 20° latitud sur, encontrándose en alturas que van desde los 700 hasta los 2 900 m.s.n.m. Estos árboles de quina o cascarilla en estado natural constituyen pocas veces bosques por sí mismos,

generalmente forman grupos esparcidos en medio del bosque, llamados manchas (Campos, *et al.* 2014).

En Ecuador se encuentran más de la mitad de todas las especies del género *Cinchona* sp., principalmente en provincias como Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Garmendia, 1999) (Jorgensen y León, 1999 citado por Rodríguez, 2014).

2.1.4. Clasificación botánica de la *Cinchona officinalis* L

Reino: Plantae

División: Angiosperms

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Cinchona*

Especie: *officinalis*

Nombre Científico: *Cinchona officinalis* L.

Nombre común: Cascarilla.

2.1.5. Descripción botánica

Su tronco alcanza una altura de alrededor de 10 a 16 m, con hojas coriáceas, ovaladas, color verde oscuro, pecioladas y con grandes nervios de 1,8 a 2,7 cm de largo y ancho, sus flores en inflorescencia terminal, rojas, con corola blanca o rosada tubular de 8 a 13 mm de longitud, se agrupan en panículas, frutos en cápsula cilíndrica con tres o cuatro semillas en su interior (Martínez, *et al.* 2013).

La corteza externa es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los árboles de 6 a 8 años de edad pueden alcanzar 12 m de altura. Las ramas principales parten del tronco a una altura más o menos de 6 m; puesto que las ramas bajas son desechadas continuamente (Mahecha, *et al.* 2004 citado por Rodríguez, 2014).

2.1.6. Usos

Cepvi (2015), expresó que uno de los mayores usos es en la medicina, ya que tiene principios medicinales para fiebres, sobre todo de origen tropical y especialmente el paludismo, fiebres de tipo periódico, con piel húmeda y sin irritación nerviosa. Además también estimula el apetito y tonifica el organismo, de acuerdo a Hernández (2015), es muy utilizada en casos de estrés psíquico y físico, arritmias cardiacas, estimula el crecimiento del cabello y evita su caída.

2.1.7. Distribución geográfica en el Ecuador

Es conocido como un árbol nativo de los Andes que se encuentra entre los 1000 a 3500 m.s.n.m. En el Ecuador se encuentra ampliamente distribuido en las provincias de Bolívar, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Jorgensen y León, 1999 citado por Rodríguez, 2014). Según estudios realizados por Garmendia (2005), la especie *Cinchona officinalis*. L., es endémica de la región sur del Ecuador, específicamente del valle de Loja.

2.1.8. Categoría de amenaza

En la lista de especies invasoras de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (2014), ha sido considerado como una de las 100 especies invasoras en condiciones naturales para ciertas especies nativas, no obstante hoy está en peligro de extinción debido a haber sido sobre explotada por su alto valor medicinal, para aprovechar su corteza, el árbol se tala a ras del suelo (Günther, *et al.* 2004).

2.2. Biotecnología

De acuerdo a Duque (2010), la biotecnología se ha utilizado desde muchos años como sinónimo de ingeniería genética o ingeniería de ADN. En la actualidad el manejo del ADN es solo una parte de la Biotecnología Moderna.

A nivel mundial, la Biotecnología se delimita según la acepción dada por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), la cual se definió en el 2002 como: **“la aplicación de la ciencia y la tecnología en organismos vivos, así como en partes de los mismos, sus productos o modelos, para alterar materiales vivos o muertos para la producción de conocimientos, bienes y servicios”** (Duque, 2010).

2.2.1. Biotecnología vegetal

Es una extensión de la propagación de las plantas, con una diferencia muy importante: la biotecnología vegetal, permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada (Monsanto, 2011).

De la misma forma, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes) sobre medios sintéticos en condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras. Para el cultivo de material vegetal separado de la planta es necesario adicionar al medio, los nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibirían a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta (Díaz, 2012).

2.2.2. Fundamentos de la propagación de especies vegetales

La propagación vegetal puede ser definida como la producción de las plantas controladas por el hombre para perpetuar individuos escogidos o grupos de plantas que tienen para él un valor específico. La mayoría de las plantas cultivadas son formas mejoradas que deben la continuidad de su existencia al hecho que han sido propagadas en condiciones cuidadosamente controladas (Jaramillo, 2002)

Para Besnier (1989), la propagación de especies vegetales como actividad consiente del hombre, constituye en sí una verdadera ciencia por los profundos conocimientos que se requieren de la biología de las plantas cultivadas, a la vez que es un arte en cuanto a las habilidades de los creadores y continuadores de los métodos y procedimientos, a veces asombrosos, para obtener plantaciones vegetales cada vez mejores, de cualquier uso, económico y social.

2.2.3. Propagación asexual o vegetativa

También conocida como propagación indirecta. Se efectúa con partes de una planta, provista de yemas y con capacidad de enraizamiento para originar nuevos individuos o insertando dichas yemas a otras plantas afines y capaces del soldar sus tejidos para proseguir su desarrollo normal, de esta manera puede asegurarse la plena transmisión de los caracteres fijos de una variedad vegetal (Sáenz, *et al.* 1993).

Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes que son: 1) la micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivo *in vitro*; 2) la propagación a partir de bulbos, rizomas, estolones, tubérculos o segmentos (esquejes) de las plantas que conserven la potencialidad de enraizar; y, 3) la propagación por injertos de segmentos de la planta sobre tallos de plantas receptoras más resistentes (Espinoza, 2004).

2.3. Micropropagación

Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades, en condiciones asépticas; se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por la Ingeniería Genética, Mutagénesis o Mejoramiento Genético y también para obtener plantas libres de enfermedades u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente (Abdelnour, *et al.* 1994 y Díaz, 2012).

2.3.1 Ventajas de la micropropagación

De acuerdo a Rivero (2011), las ventajas de la micropropagación son:

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

2.3.2. Desventajas de la micropropagación

Estudios realizados por Watad, *et al.* (1992), citado por Tapia (2004), explica que esta técnica presenta varias complicaciones, las más frecuentes al introducir los explantes en cultivo *in vitro* son:

- Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados *in vitro*.

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

Otras de las ventajas según Mejía (1994), expresa que se requiere de personal y equipos especializados, infraestructura con las condiciones adecuadas para los procesos de propagación vegetal, productos químicos costosos y falta de información o literatura relacionada al cultivo “*in vitro*” de especies forestales en procesos de propagación vegetal.

2.3.3. Cultivo *in vitro*

Reiteradamente se menciona este concepto en los reportes de biotecnología de plantas como una forma de indicar que las plantas o partes de plantas estudiadas fueron cultivadas dentro de un contenedor de vidrio (del latín *in*: adentro, *vitro*: vidrio), es decir, en un frasco de vidrio, en una placa petri, en un matraz erlenmeyer, etc. La utilización del término ayuda a entender que las plantas no fueron estudiadas en la naturaleza o en el campo, para lo cual se utiliza el término *in situ* (en el sitio) (Ovando, 2009).

2.3.4. Cultivo aséptico

Debido a que las células vegetales presentan largos tiempos de duplicación comparadas con las células microbianas, se hace necesario mantener los cultivos exentos de contaminación por microorganismos. Una sola célula bacteriana puede invadir y matar rápidamente a un tejido cultivado. Adicionalmente, se menciona como una de las ventajas del cultivo de tejidos vegetales la obtención de plantas sanas, libres de enfermedades, por lo cual se deben extremar las condiciones de asepsia (Kubotal, 2002).

2.3.5. Selección del inóculo

La micropropagación puede iniciarse a partir de cualquier parte de la planta: órganos, tejidos o células, es por eso que la selección del inóculo depende de los objetivos que persigue la investigación. Si la especie aun no es investigada *in vitro* se recomienda usar diferentes fuentes de inóculos como: hojas, tallo, meristemos, semillas, flores. Para la elección del

inóculo es importante considerar la calidad de la planta madre, edad fisiológica tanto de la planta madre como del inóculo, la época del año y el tipo y tamaño del inóculo (Barba, *et al.* 2001).

2.3.6. Factores externos que inciden en la micropropagación

2.3.6.1. Planta donante

La selección de la planta donante es fundamental en la reproducción clonal, pues es determinante en el éxito del cultivo de células, ya que con un material cuidadosamente seleccionado cada especie conserva su homogeneidad y permite mantener el paso de las generaciones (Apolo, 2012).

2.3.6.2. Explante

El concepto de explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser 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 (como en el caso de los protoplastos) (Narváez, 2009).

Según Suarez (2011), el manejo de los explante se tiene que realizar de la siguiente forma.

- **Preparación del explante:** una vez seleccionada la planta y la parte de la planta que dará origen al material, se limpia y lava cuidadosamente, luego se elimina parte del tejido externo y posteriormente se procede a la desinfección superficial.
- **Escisión del explante:** se debe hacer todo dentro de la cámara de flujo y con todo el material esterilizado; después que el tejido esté lavado se puede colocar unos segundos sobre un papel filtro para que se seque un poco, luego se procede al aislamiento del explante que deseamos cultivar (embrión, meristemo, etc.) y lo introducimos en el medio destinado para su desarrollo en esta etapa.

2.3.7. Etapas de la Micropropagación

De acuerdo a Olmos, *et al.* (2004), la regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro etapas principales:

- 1) Establecimiento del cultivo.

- 2) Desarrollo y multiplicación de vástagos.
- 3) Enraizamiento.
- 4) Aclimatación de las plántulas.

Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *in vivo*. En algunos casos es de importancia considerar una etapa previa (Etapa 0), que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento.

2.3.7.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal

El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son:

- 1) El tipo de órgano que sirve como explante.
- 2) La edad ontogénica y fisiológica del mismo.
- 3) La estación en la cual se colecta el material vegetal.
- 4) El tamaño; y,
- 5) El estado sanitario general de la planta donante.

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

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

2.3.7.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. En

esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes.

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

2.3.7.3. Etapa 2: Multiplicación

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

Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica (Gonzalez, 2002).

2.3.8. Medio de Cultivo

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

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

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

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

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

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

2.3.8.1. Las sales inorgánicas o minerales

Se dividen en macro y micro nutrientes que son el resultado de que se han optimizado esfuerzos sobre las necesidades específicas de las plantas. Sin embargo, los mayores nutrientes esenciales que todas las plantas requieren y están presentes en los fertilizantes comunes, también forman parte del medio cultivo: Nitrógeno (N), Fósforo (F), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe) (Abdelnour, 1994).

2.3.8.2. Compuestos orgánicos

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

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

a) Auxinas

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

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

b) Citocininas

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

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

c) Gibberalinas

Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios, (Pierik 1990). Las gibberalinas especialmente el AG₃, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemos caulinares de varias especies vegetales (Rosales, *et al* 2014).

d) Las vitaminas

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

2.3.8.3. Preparaciones naturales complejas

De acuerdo a Abdelnour (1994), comenta que existen un sinnúmero de variedades de sustancias de composición indefinida que han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas se mencionan: el extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada, jugo de naranja y tomate.

2.3.8.4. Materiales inertes

Son compuestos gelificantes que actúan como agentes de soporte por ejemplo: agar, gelrite y fitogel. También se suma el carbón activado; este compuesto en bajas concentraciones contrarresta efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas al medio por el cultivo (Lozada, 2010).

2.3.9. Factores ambientales de incubación

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

2.3.9.1. Luz

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

2.3.9.2. Temperatura

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 (Serrano, *et al.* 1991).

2.3.9.3. Humedad

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

2.3.9.4. Oxígeno

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

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del Área de Estudio

La investigación se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio.

3.1.1. Fase de campo.

La recolección del material vegetal se realizó en árboles identificados en los lugares (Figura 1).

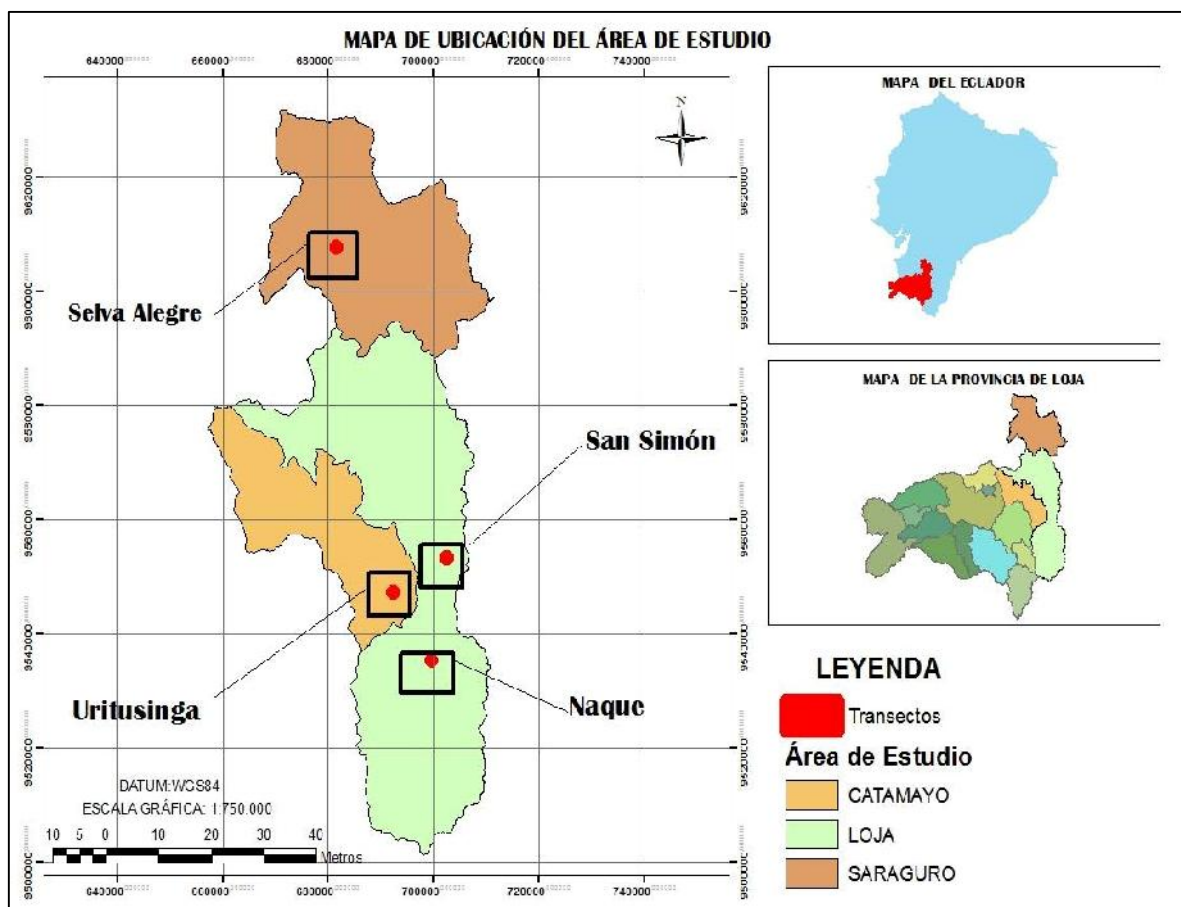


Figura 1. Mapa de ubicación de las cuatro áreas de estudio.

3.1.1.1. Quebrada El Naque (Cantón Loja)

En el cantón Loja, en la parroquia Malacatos se identificó la especie en la Quebrada el Naque misma que se encuentra en parte del bosque secundario entre vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada ya que ha sido utilizada con fines agropecuarios, ubicándose en las siguientes condiciones geográficas:

- Latitud: 53°53'82" S
- Longitud: 72°00'26" O
- Altitud: 1816 m.s.n.m.

3.1.1.2. Quebrada San Simón (Cantón Loja)

En el cantón Loja, en la microcuenca Zamora Huayco se identificó la especie en la Quebrada San Simón misma que se encuentra en tierras agropecuarias en parte de vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes:

- Latitud: 60°77'58" S
- Longitud: 68°15'38" O
- Altitud: 2217 m.s.n.m.

3.1.1.3. Sitio Uritusinga (Cantón Catamayo)

En el cantón Catamayo, en la parroquia El Tambo se identificó la especie en el sitio Uritusinga misma que se encuentra en plantaciones abandonadas de pino entre vegetación arbustiva y herbácea, zona que se encuentra utilizada para el pastoreo, ubicándose en las siguientes condiciones geográficas:

- Latitud: 55°33'79" S
- Longitud: 70°24'92" O
- Altitud: 2438 m.s.n.m.

3.1.1.4. Parroquia Selva Alegre (Cantón Saraguro):

En el cantón Saraguro, en la parroquia Selva Alegre se identificó la especie en el sitio Santa Lucia misma que se encuentra en tierras agropecuarias en parte de vegetación arbustiva y herbácea, esta área se encuentra degradada, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes:

- Latitud: 54°73'10" S
- Longitud: 69°24'35" O
- Altitud: 2744 m.s.n.m.

3.1.2. Fase de laboratorio

Se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra ubicado a 3 km de la Ciudad de Loja, entre las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: 04° 00' 00" S
- Longitud: 79° 12' 00" O
- Altitud: 2135 m.s.n.m.

3.2. Metodología para evaluar la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., usando distintas concentraciones y tiempos de inmersión en Hipoclorito de Sodio, durante la fase de implantación de las semillas.

3.2.1. Selección y desinfección de las semillas

3.2.1.1. Selección de semillas

Las semillas empleadas en el experimento se recolectaron en el campo, provenientes de árboles seleccionados con características fenotípicas sobresalientes, en los cuatro sitios de estudio en la provincia de Loja.

Para preparar las semillas se procedió a eliminar las impurezas, con el apoyo de una lupa manual, seguidamente se seleccionó las mejores semillas con ayuda del estereomicroscopio, considerando características fenotípicas tales como: forma, tamaño, color, madurez fisiológica y buenas condiciones fitosanitarias (Figura 2).

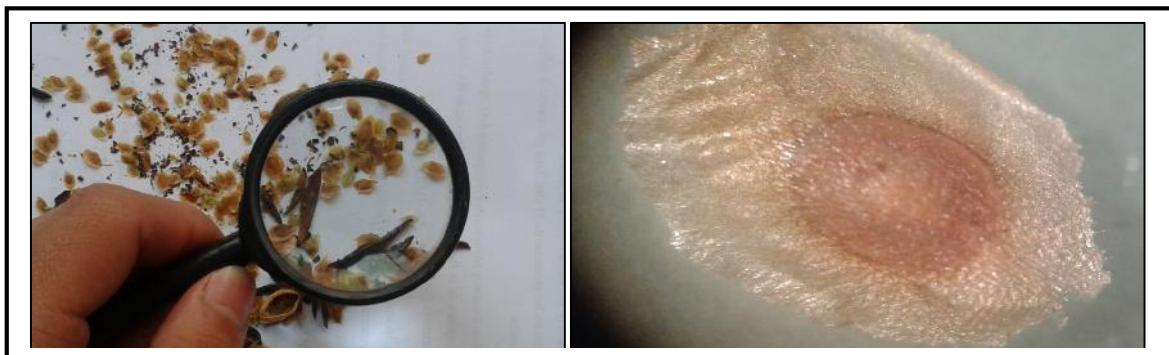


Figura 2. Selección de semillas de *Cinchona officinalis* L., con las mejores características fenotípicas.

3.2.1.2. Desinfestación de semillas

Las semillas seleccionadas de *Cinchona officinalis* L., se agruparon en conjuntos de 30 para facilitar su manipulación debido a su tamaño pequeño, luego se colocaron en tul dentro de frascos de vidrio. La desinfección de las semillas se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, experimentando distintos tratamientos, los cuales varían de acuerdo a los tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos) y concentración de hipoclorito de sodio (15, 25 y 50 % de cloro comercial) respectivamente (Figura 3).

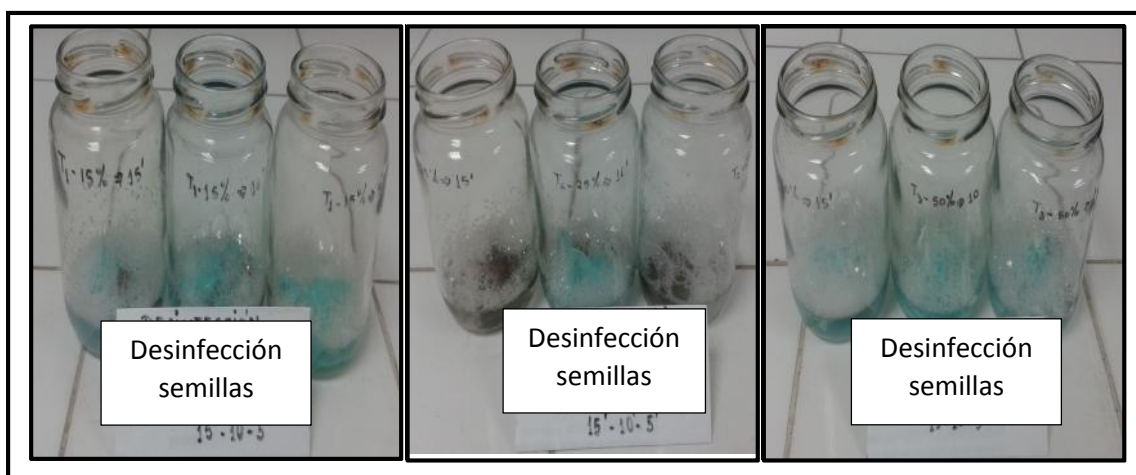


Figura 3. Desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L. en la cámara de flujo laminar.

Luego se agregó alcohol etílico al 70%; estos dos ingredientes fueron removidos con 3 enjuagues con agua destilada esterilizada (Figura 4).



Figura 4. Enjuague de semillas de *Cinchona officinalis* L., con agua esterilizada luego de aplicar alcohol etílico y el hipoclorito de sodio

3.2.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo con las sales minerales MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con vitaminas (1 mg/l de tiamina y 100 mg/l de mio-inositol), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2%, agar 0,6% como agente gelificante y ácido giberélico (AG_3) en tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1 mg/l). El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Seguidamente, se incorporó el agar al medio de cultivo; se utilizó el microondas para diluirlo y se distribuyó 3 ml de medio de cultivo por cada tubo de ensayo; para ser esterilizados en autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos (Figura 5).

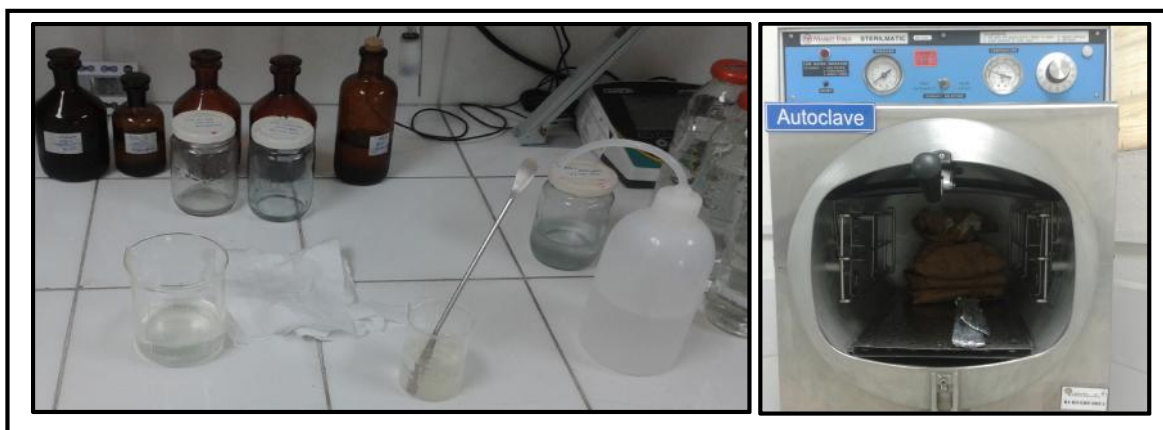


Figura 5. Preparación y esterilización del medio de cultivo.

La inoculación *in vitro* de las semillas se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, a razón de dos semillas por cada tubo de ensayo (Figura 6). Una vez inoculadas las semillas se identificó cada uno de los tratamientos, se ubicaron en el cuarto de incubación o cuarto de luces, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 6. Siembra de semilla de *Cinchona officinalis* L., en la cámara de flujo laminar.

3.2.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con un arreglo factorial de 3 x 3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones. Cuadro 2 y 3, se presentan los tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

Cuadro 2. Diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 3.

FACTORES	NIVELES
A. Porcentaje de concentración de Hipoclorito de Sodio	1. 05 % (D1)
	2. 10 % (D2)
	3. 15 % (D3)
B. Tiempo de inmersión (min)	1. 15 min (M1)
	2. 10 min (M2)
	3. 05 min (M3)

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

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	15 % de hipoclorito de sodio + 15 min., de inmersión	T1 = D1M1
2	15 % de hipoclorito de sodio + 10 min., de inmersión	T2 = D1M2
3	15 % de hipoclorito de sodio + 5 min., de inmersión	T3 = D1M3
4	25 % de hipoclorito de sodio + 15 min., de inmersión	T4 = D2M1
5	25 % de hipoclorito de sodio + 10 min., de inmersión	T5 = D2M2
6	25 % de hipoclorito de sodio + 5 min., de inmersión	T6 = D2M3
7	50 % de hipoclorito de sodio + 15 min., de inmersión	T7 = D3M1
8	50 % de hipoclorito de sodio + 10 min., de inmersión	T8 = D3M2
9	50 % de hipoclorito de sodio + 5 min., de inmersión	T9 = D3M3

3.2.5. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	15
Número de tratamientos	9
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	5
Número total de tubos de ensayo por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	30
Número total de tubos para el ensayo	135
Número de semillas por unidad experimental	10
Número total de semillas	270

3.2.6. Unidad experimental y evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de tubos de ensayo, la cual estuvo conformada por 30 semillas, a razón de dos semillas por tubo de ensayo.

La evaluación se realizó por observación directa, durante 45 días, cada 5 días después de la siembra, los parámetros que se evaluaron fueron: porcentaje de contaminación, días a la contaminación, porcentaje de semillas germinadas y días a la germinación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Hoja de registro para evaluar la desinfección y germinación de semillas de *C. officinalis* L., a nivel de laboratorio.

Fecha de siembra:											
N° días	Fecha	N° total de semillas	N° de semillas contaminadas	% de contaminación	% de semillas germinadas	N° semillas contaminadas	% de contaminación	% de semillas germinadas	N° semillas contaminadas	% de contaminación	% de semillas germinadas
			R1			R2			R3		
Tratamiento 1											
Tratamiento n..											

R = repetición

3.2.7. Hipótesis del modelo

Ho. Las diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio en tiempos diferentes de inmersión, no disminuye el porcentaje de contaminación en semillas de *Cinchona officinalis* L.

Hi. Las diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio en tiempos diferentes de inmersión, disminuyen el porcentaje de contaminación en semillas de *Cinchona officinalis* L.

3.3. Metodología para evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales, para la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas obtenidas *in vitro* o *in vivo*.

El objetivo de esta fase fue evaluar el efecto de la interacción hormonal de una auxina ácido naftalenacético (ANA) con dos citoquininas: benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN); la auxina ANA en una concentración de 0,2 mg/l y las dos citoquininas (KIN y BAP) en dos concentraciones de 0,2 y 2 mg/l respectivamente, con la finalidad de inducir la elongación de los explantes.

Para esta fase se utilizó vitroplantas, de 5 cm de altura promedio, con 1 – 2 nudos, obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., de tal forma que no fue necesario la desinfección de los explantes ya que es material aséptico.

3.3.1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo de sales minerales MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con vitaminas (1 mg/l de tiamina y 100 mg/l de mio-inositol), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2%, agar 0,6% como agente gelificante y se adicionó la interacción de tres hormonas ANA, BAP y KIN, en distintas concentraciones, en esta fase se ensayó cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno (Cuadro 5). El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCL o NaOH 1N (Figura 7).

Luego se distribuyó 25 ml de medio de cultivo en cada frasco de vidrio para ser esterilizados en autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos.

Cuadro 5. Tratamientos para evaluar la interacción de auxinas – citoquininas en la fase de inducción de brotamiento múltiple de explantes de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP	T1 = C1A1D1C1
2	0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP	T2 = C1A1D2C1
3	0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN	T3 = C1A1D1C2
4	0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN	T4 = C1A1D2C2



Figura 7. Preparación del medio de cultivo MS., adicionado la interacción hormonal auxinas – citoquininas.

3.3.2. Siembra *in vitro* de explantes y condiciones de incubación

La inoculación *in vitro* de los explantes, se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se utilizó cajas petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas para realizar el corte de los explantes de un tamaño promedio de 2 a 3 cm, una vez obtenidos los explantes se procedió a sembrarlos, a razón de dos explantes por cada frasco.

Finalmente, se identificó cada uno de los tratamientos, para su traslado al cuarto de incubación, en donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 8).



Figura 8. Siembra *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

3.3.3. Diseño experimental para la fase multiplicación de explantes

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 3x2x2, con 4 tratamientos y 3 repeticiones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 2x2.

FACTORES	NIVELES
A. Tipo de auxinas- citoquininas	1. ANA (A1) 2. BAP (C1) 3. KIN (C2)
B. Concentración en mg/l	1. 0,2 mg/l (C1) 2. 2,0 mg/l (C2)

En el cuadro 5 se observa la definición de los tratamientos evaluados en la interacción de auxinas – citoquininas en la fase de inducción de brotamiento múltiple, a partir de ápices caulinares y segmentos de *Cinchona officinalis* L.

3.3.4. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	5
Número de total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	30
Número total de explantes por frasco	2
Número de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes	120

3.3.5. Unidad experimental y evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de cinco frascos de vidrio, para lo cual se inocularon 10 explantes, a razón de dos explantes por frasco.

La evaluación se realizó por observación directa, cada 5 días, a partir del tercer día (Cuadro 7). Posteriormente se evaluó cada 30 días, durante un periodo de 3 meses (Cuadro 8).

Cuadro 7. Hoja de registro para evaluar las variables: porcentaje de contaminación y mortalidad en fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Ensayo:						
Fecha de siembra:						
Tratamiento:						
N° de días	Fecha	N° total de exp	N° Exp Cont	% de Cont	N° Exp muertos	% de Mort

Exp = explante; Cont = contaminación; Mort = mortalidad.

Las variables a evaluar fueron: porcentaje de contaminación y mortalidad (Cuadro 7), número de brotes/explante, longitud del brote (cm), número de nudos y número de hojas formadas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Hoja de registro para evaluar las variables en la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Ensayo:															
Fecha de siembra:															
T	R	T. exp	explante	Número de brotes/explante			brote (cm)			N° nudos			N° de hojas		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fecha de evaluación															

T= tratamiento; R = repetición; T. exp = tipo de explante.

3.3.6. Hipótesis del modelo

Ho. El balance hormonal auxina-citoquinina no inducen en la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Hi. El balance hormonal auxina-citoquinina inducen en la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L.

3.4. Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores involucrados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal.

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

- Socialización de resultados a través de una exposición a los técnicos y Equipo Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal y a los estudiantes de quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal (Anexo 7 y 8).
- Elaboración de un tríptico y un folleto técnico informativo, con la finalidad de dar a conocer los resultados obtenidos de la presente investigación (Anexo 9).
- Redacción de un artículo científico para difundir los resultados de la investigación, a nivel de la Universidad Nacional de Loja y Carrera de Ingeniería Forestal.

4. RESULTADOS

4.1. Desinfección *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.1.1. Porcentaje de contaminación

Para la desinfección de las semillas de *Cinchona officinalis* L., se aplicó tres concentraciones de hipoclorito de sodio (cloro comercial) en tres tiempos de inmersión; en el cual no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0,3276$) para el porcentaje de contaminación (Anexo 1), el T2 (15 % de hipoclorito de sodio durante 10 min., de inmersión) y el T3 (15 % de hipoclorito de sodio durante 15 min., de inmersión) presentan el valor más alto ($13,33 \pm 4,97$), en comparación del T1 (15 % de hipoclorito de sodio durante 5 min., de inmersión), T4 (25 % de hipoclorito de sodio durante 5 min., de inmersión) y el T6 (25 % de hipoclorito de sodio durante 15 min., de inmersión) que presentaron valores de ($6,67 \pm 4,97$) de contaminación provocada por hongos y bacterias. En el caso de los tratamientos T5 (25 % de hipoclorito de sodio durante 10 min., de inmersión), T7 (50 % de hipoclorito de sodio durante 5 min., de inmersión), T8 (50 % de hipoclorito de sodio durante 10 min., de inmersión) y T9 (50 % de hipoclorito de sodio durante 15 min., de inmersión) no se registró contaminación (Figura 9).

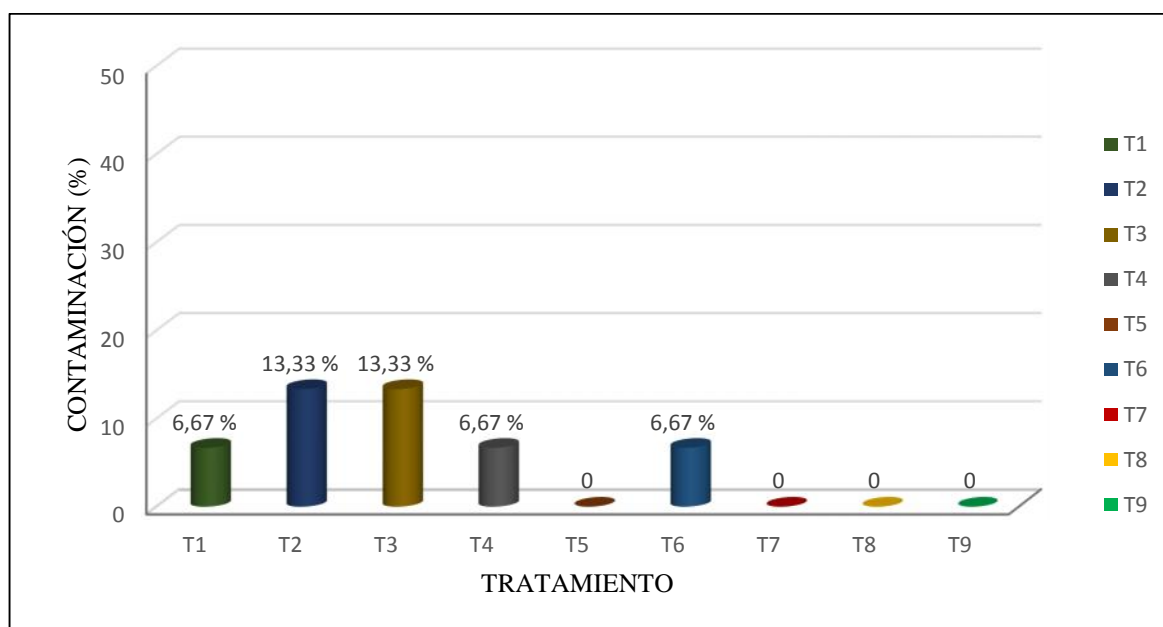


Figura 9. Porcentaje promedio de contaminación de los tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.1.2. Número de días a la contaminación

La contaminación se presentó al quinto día de haber sembrado las semillas para el T1, T2, T3 y T4, para el caso del T6 la contaminación empezó al décimo día; estabilizándose al quinceavo día en el T2; que es el tratamiento que presentó mayor porcentaje de contaminación (Figura 10), a diferencia del T5, T7, T8, T9 que no se encuentra representado en la figura ya que la contaminación fue nula (Anexo 1).

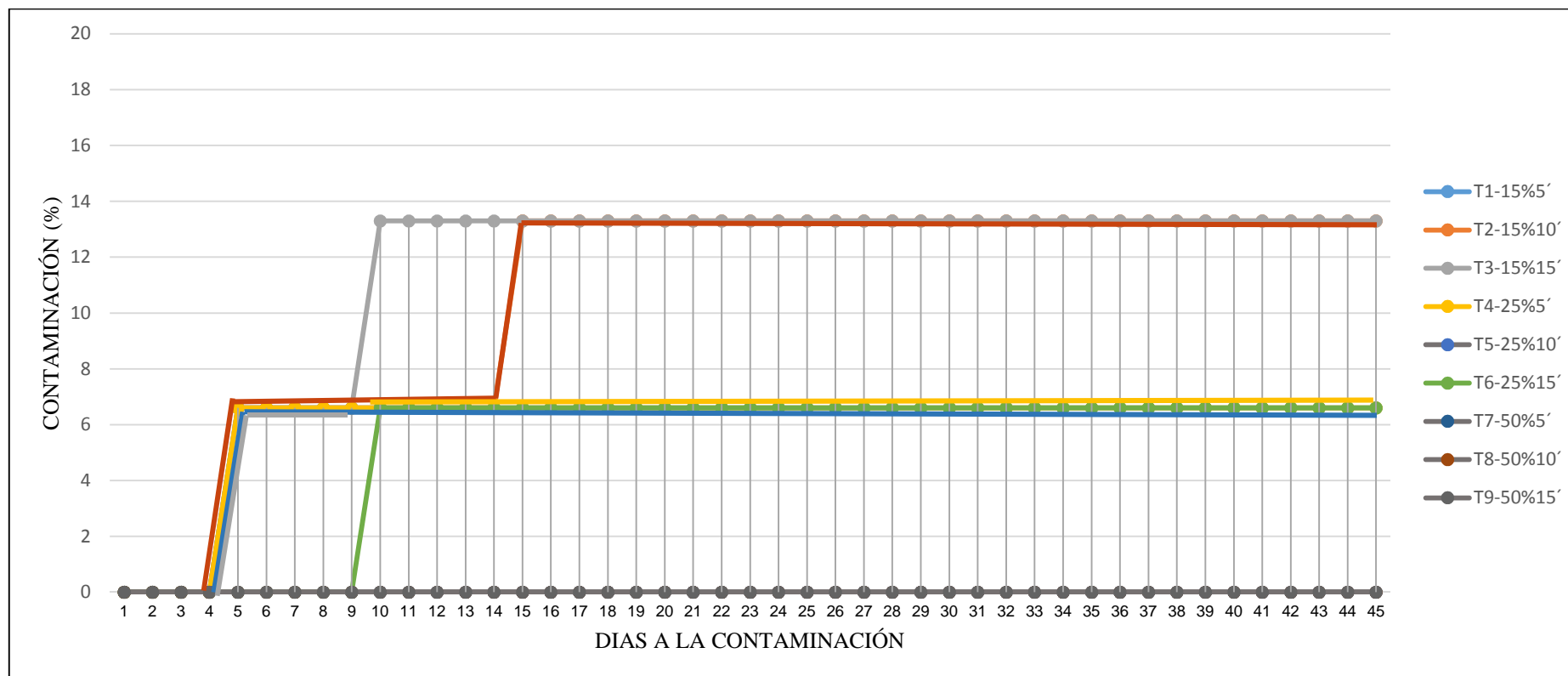


Figura 10. Número de días a la contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.2. Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1. Porcentaje de semillas germinadas

Los resultados obtenidos en la germinación *in vitro* de semillas, aplicando distintas concentraciones de ácido giberélico (AG₃), se encontró diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,0379$) para el porcentaje de germinación de semillas (Anexo 2). El T2 (0,5 mg/l AG₃) presentó el valor más bajo ($41,11 \pm 7,09$), el T1 (0 mg/l AG₃) demostró un valor de ($50 \pm 7,09$), en comparación con el T3 (1,0 mg/l AG₃) que presentó los valores más altos ($74,44 \pm 7,09$) en porcentaje de germinación (Figura 11).

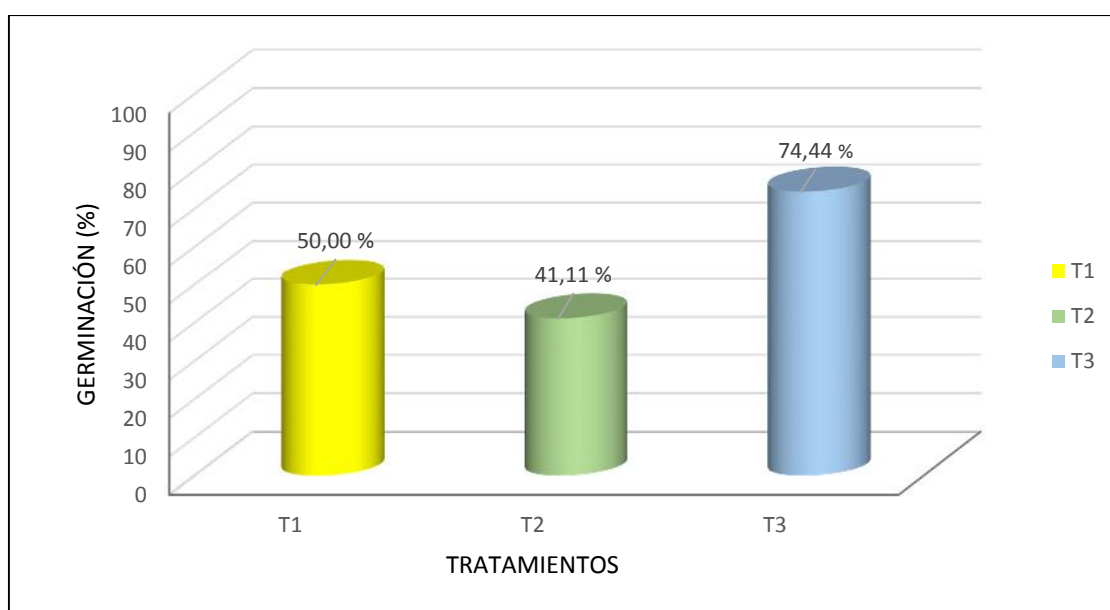


Figura 11. Porcentaje promedio de germinación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.2.2. Número de días a la germinación.

La germinación se presentó diferente para los distintos tratamientos evaluados durante la investigación (Anexo 2), en el T3 (1,0 mg/l AG₃) se inició la germinación a los quince días de inoculadas, en comparación con el T1 (0 mg/l AG₃) y T2 (0,5 mg/l AG₃) que se visualizó a los 20 días. La germinación se estabilizó en el T1 a los 45 días, en el T2 a los 40 días y en el T3 que es el tratamiento que mayor porcentaje (74,44 %) de germinación alcanzó; se estabilizó a los 45 días de inoculadas; en la Figura 12, se muestra las curvas de germinación de los distintos tratamientos, en las cuales se puede observar el comportamiento de los tratamientos durante la investigación experimental.

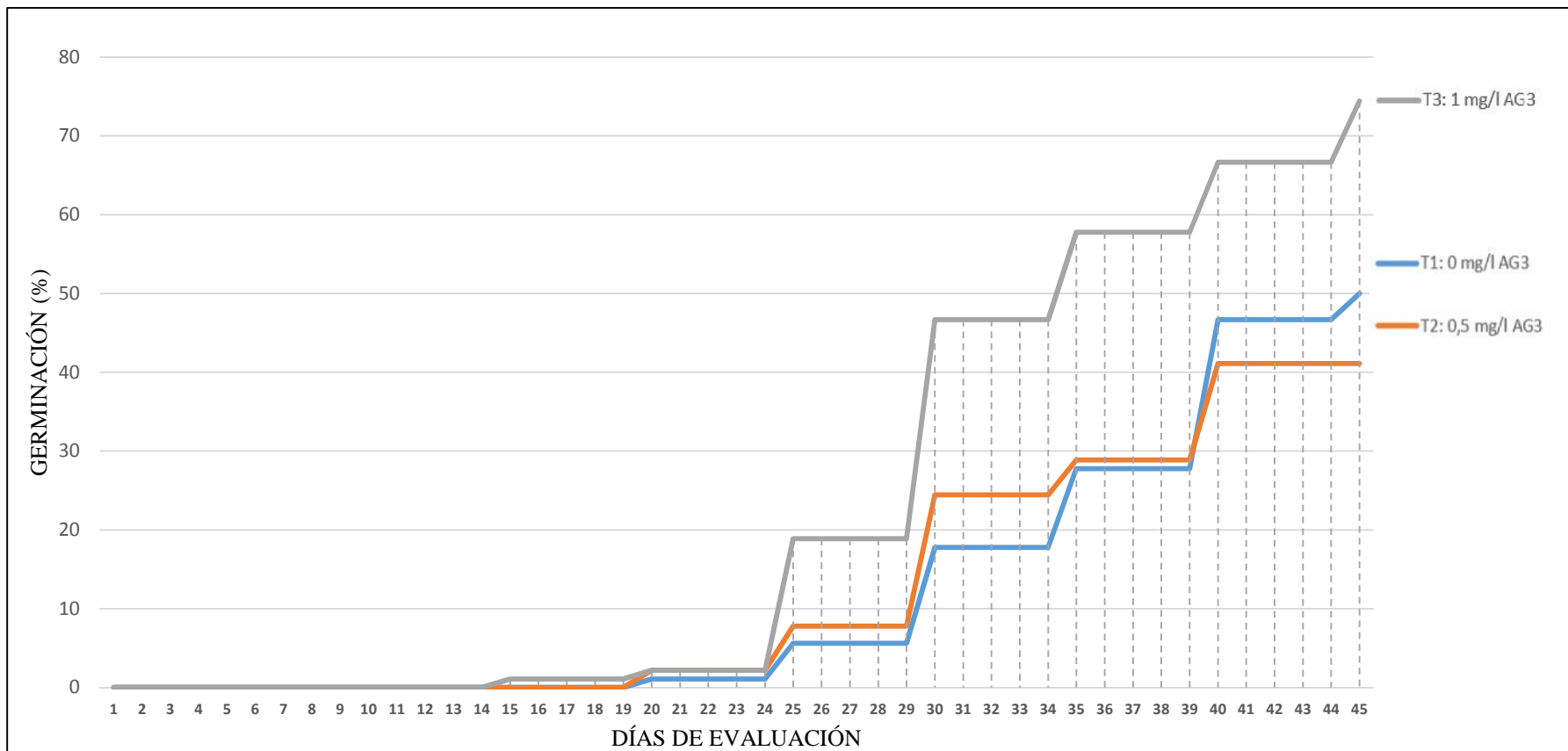


Figura 12. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG₃ aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

4.3. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L.

4.3.1. Porcentaje de contaminación

En la variable porcentaje de contaminación no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,5957$) (Anexo 3), el T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) y T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN) presentaron un porcentaje de contaminación de $(6,67 \pm 4,71)$ causada por hongos y bacterias, a diferencia del T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) y T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) que no se registró contaminación (Figura 13).

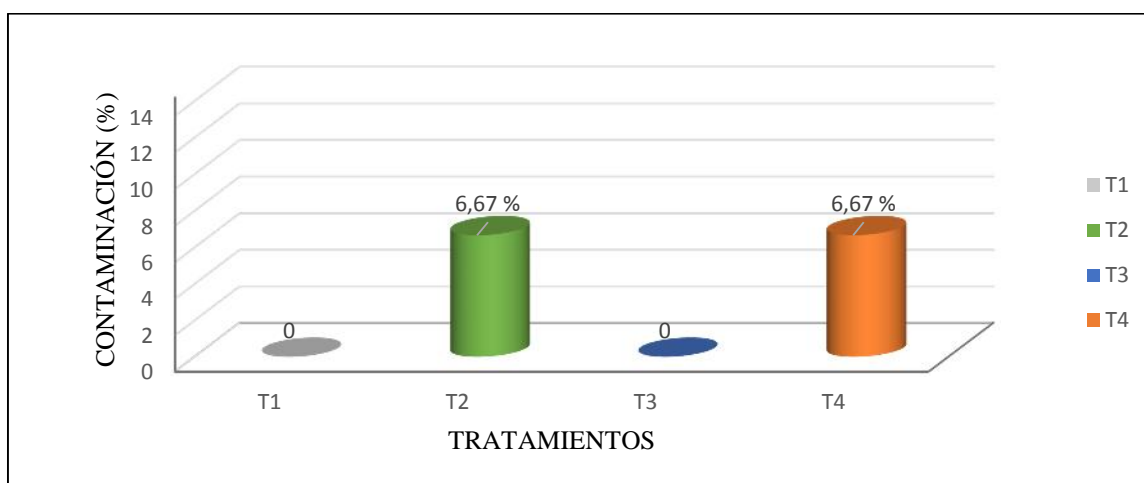


Figura 13. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.3.2. Porcentaje de mortalidad

La evaluación de la variable porcentaje de mortalidad indica que si existe diferencias significativas ($p = 0,0223$) entre tratamientos (Anexo 3), en donde el tratamiento T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) demostró el porcentaje de mortalidad promedio más bajo ($3,33 \pm 6,24$), frente al T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) y T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) con un promedio de $(10$ y $11 \% \pm 6,24)$ de mortalidad respectivamente, el tratamiento que presentó el valor promedio más alto ($23,33 \% \pm 6,24$) es el T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN) de mortalidad, provocada por factores fisiológicos propios de la especie (Figura 14).

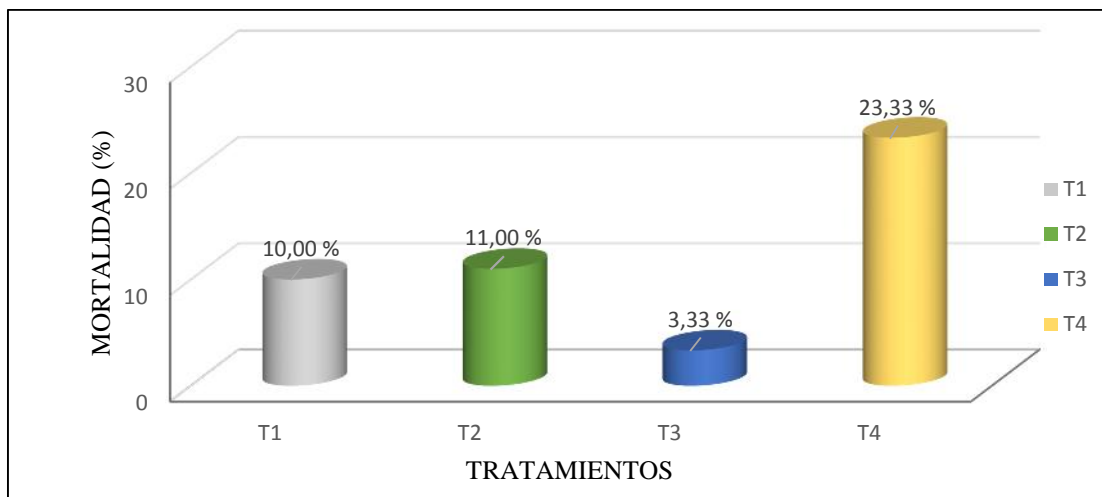


Figura 14. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.3.3. Número de brotes formados por explante

Los resultados obtenidos para la variable número de brotes formados si presentaron diferencias significativas ($p = 0,0035$) entre tratamientos (Anexo 3). El T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN), obtuvo el valor promedio más bajo de número de brotes formados ($1,67 \pm 0,40$); el T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) presentó valores promedios de ($2,50 \pm 0,40$); el T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) obtuvo un valor de ($3,54 \pm 0,40$) frente al T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) que alcanzó el valor promedio mayor de número de brotes formados por cada explante ($4,73 \pm 0,40$) (Figura 15).

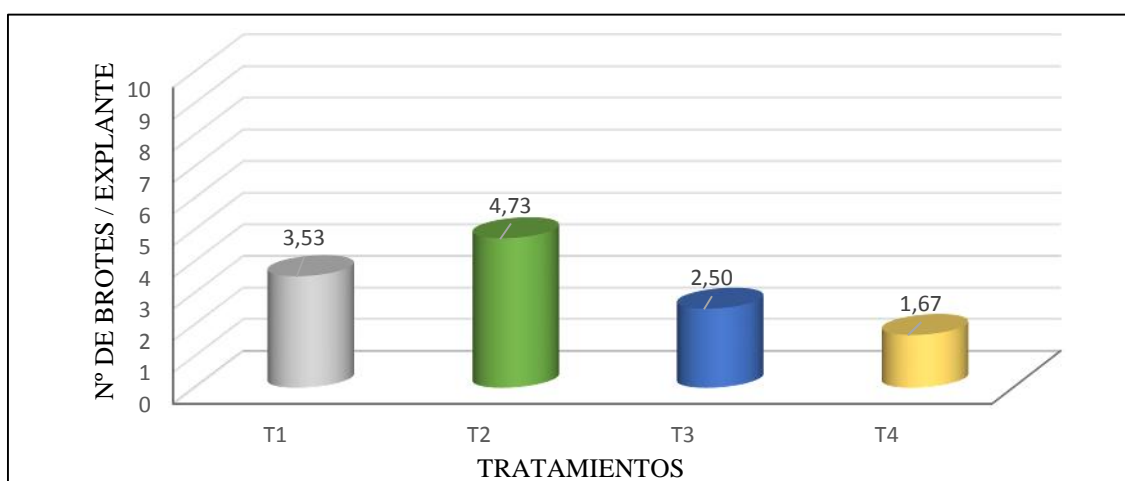


Figura 15. Promedio de formación de brotes por explante, en los tratamiento aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de invernadero *Cinchona officinalis* L.

4.3.4. Tamaño del brote

El tamaño de los brotes no presentó diferencias significativas ($p = 0,3337$) entre tratamientos (Anexo 3). El T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) es el que registró el valor promedio más bajo de 0,67 cm, el T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN) alcanzó un valor promedio de 0,77 cm., ubicándose cerca del T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) con un valor de 0,83 cm de altura del brote; frente al T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) que alcanzó el valor promedio más alto con 1,10 cm de longitud promedio del brote (Figura 16).

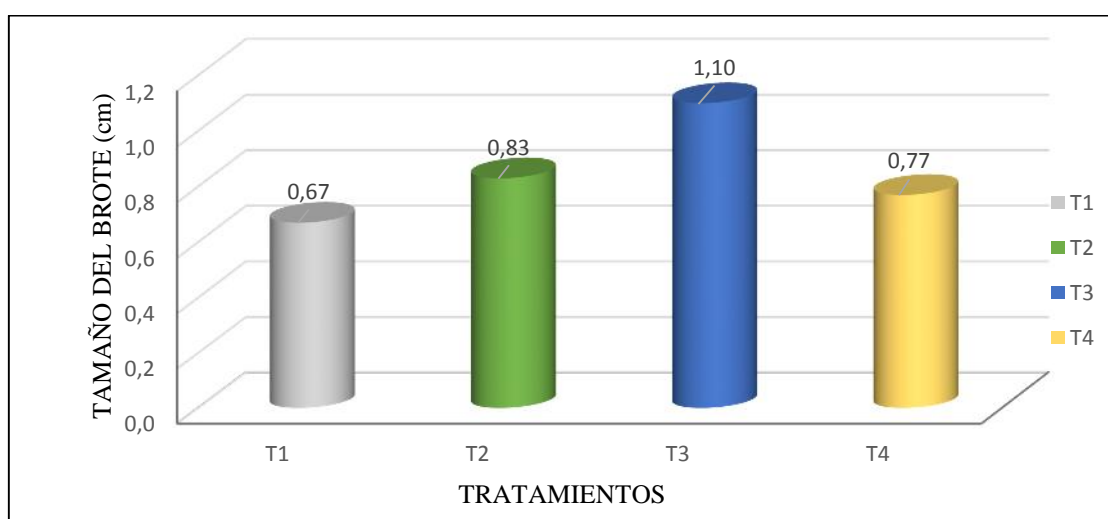


Figura 16. Promedio de altura de los brotes (cm) en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.3.5. Número de hojas por explante

Los resultados obtenidos para la variable número hojas por explante si se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0008$) entre los tratamientos (Anexo 3), el T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN) obtuvo el valor promedio más bajo de hojas formadas por explante ($10,93 \pm 1,64$); frente al T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) alcanzó un promedio de ($16,87 \pm 1,64$) de hojas formadas por explante, el T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) presenta un promedio de ($20,07 \pm 1,64$) y el T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) demostró el valor promedio mayor ($27 \pm 1,64$) del número de hojas formadas por explante (Figura 17).

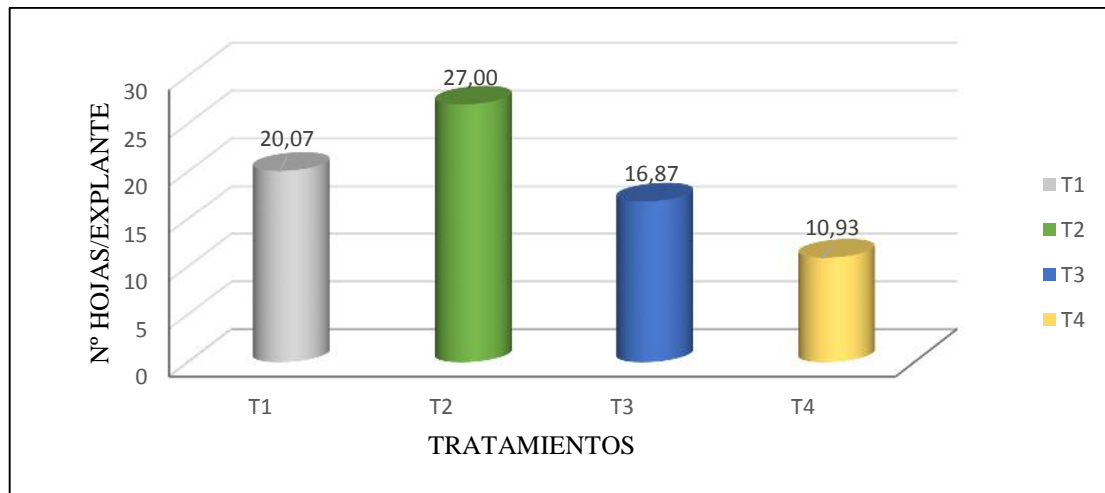


Figura 17. Número promedio de hojas formadas por explante en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.3.6. Número de nudos por explante

En la evaluación de la variable número de nudos promedio por explante, existió diferencias significativas ($p = 0,0007$) entre tratamientos (Anexo 3), donde el tratamiento T4 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de KIN) tiene el valor promedio más bajo de nudos formados por explante ($4,83 \pm 0,74$), frente al T2 (0,2 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de BAP) que presenta el valor promedio más alto ($12,10 \pm 0,74$) del número de nudos formados por explante si embargo el T1 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de BAP) y T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN) presentan valores medios ente ($6,90$ y $9,03 \pm 0,74$) de nudos formados por explante (Figura 18).

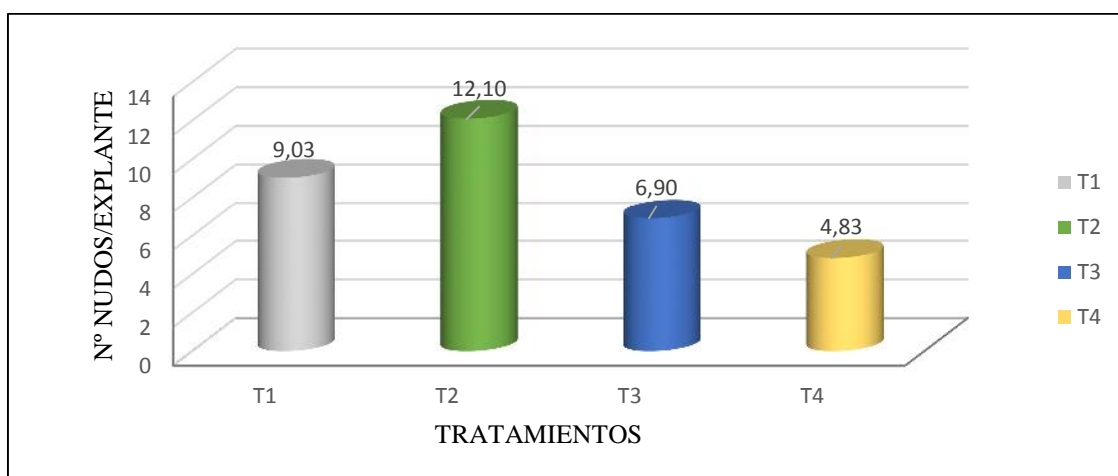


Figura 18. Número promedio de nudos formados en los diferentes tratamientos aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

5. DISCUSIÓN

5.1. Desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

La contaminación inicial por hongos y bacterias de las semillas influye negativamente durante la germinación *in vitro* y también en la supervivencia posterior de las plántulas. Esto se puede atribuir a la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero representan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Castro, 2001). Esta asociación afecta directa o indirectamente el proceso de micropropagación; de manera directa al contaminar y matar los embriones; y de manera indirecta mediante los tratamientos de desinfección aplicados y que pueden ser tóxicos para la semilla (Kunneman y Faaij-Groenen 1998).

De igual manera George (1993), indica que la contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material vegetal, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio, de los cuales; los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras (Leifert *et al.* 1994), denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips).

Leifert, *et al.* (1994), asegura que los vitropatógenos pueden ser dañinos para el cultivo de tejidos vegetales, ya que compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos, aunque en la actualidad no se encuentran muchos trabajos en la literatura científica que expliquen el mecanismo de acción de los contaminantes, que los hacen perjudiciales para las plantas *in vitro*.

En los tratamientos aplicados para la desinfección de las semillas de *C. officinalis* L.; se demostró que el hipoclorito de sodio (NaOCl) en altas concentraciones y diferentes tiempos de inmersión disminuyen la contaminación de las semillas; observándose en el T7 (50 % de NaOCl durante 5 min., de inmersión), T8 (50 % de NaOCl durante 10 min.,

de inmersión) y T9 (50 % de NaOCl durante 15 min., de inmersión), los cuales presentan 0 % de contaminación, esto concuerda con estudios realizados por Hernández y Gonzáles (2010) y Conde (2015); quienes manifiestan que utilizando concentraciones de 50 % de NaOCl se disminuye el porcentaje de contaminación.

Por el contrario, los tratamientos que tuvieron bajas concentraciones de NaOCl presentaron niveles altos de contaminación como se puede observar en los tratamientos: T2 y T3 que alcanzaron un porcentaje de 13,33 % de contaminación, el cual tenía una concentración de 15 % de NaOCl, de la misma manera los tratamientos: T4 y T6 con un 6,67 % de contaminación con el 25 % de NaOCl. La contaminación se observa a partir del quinto día de inoculadas las semillas, estabilizándose al quinceavo día.

También se pudo observar que la mayor parte de los contaminantes detectados correspondieron a hongos filamentosos y bacterias. Esto corrobora lo señalado por Folgueras, *et al.* (2001). Das y Pal (2005) y Rodríguez (2008) que indican que los contaminantes más comunes en la siembra *in vitro* de semillas son los hongos y bacterias, ya que permanecen adheridas a las semillas en condiciones naturales.

Por tal razón, si se aumenta la concentración de NaOCl se disminuye el porcentaje de contaminación, de manera que se evita la pérdida de cuantiosas cantidades de material vegetal provocada por hongos y bacterias.

5.2. Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

Las giberelinas son reguladores del crecimiento que inducen varios procesos del crecimiento y desarrollo como, la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray y Estelle 1998).

Además, Hartmann y Kester, 1997 citado por Pérez (2000), mencionan que las hormonas desempeñan un papel muy importante en la fisiología de las semillas; en la mayoría el de ácido giberélico (AG₃) mejora la velocidad de germinación, el porcentaje de germinación y apoya al crecimiento inicial de las plántulas.

En la presente investigación se aplicó tres concentraciones de AG₃, (0,0; 0,5 y 1,0 mg/l), la cual presentó diferencias significativas entre tratamientos. El T3 con una concentración de 1,0 mg/l de AG₃ obtuvo el valor más alto de 74,44 % de germinación, que coincide con lo manifestado por La Asociación Nacional del café (2004), en estudios realizados en *Cinchona officinalis* L., utilizando concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/l de AG₃ arrojando el 88,67 y 83,33 % de germinación respectivamente.

Sin embargo, Campos, *et al.* (2014), al ensayar en *Cinchona pubescens* aplicando una concentración de 1000 mg/l AG₃ obtuvieron valores bajos de 33,34 % de germinación, lo que difiere con los resultados obtenidos en la presente investigación observado en el T3 con un 74,44 % de germinación a una concentración de 1,0 mg/l AG₃. Zurita, *et al.* (2014), manifiestan que se debe utilizar bajas concentraciones de AG₃ (1,0 mg/l), ya que induce a la germinación de las semillas y en altas concentraciones inhibe la germinación.

Con respecto a los días a la germinación *in vitro* las semillas, se presentó a los 15 días en el T3 y se estabilizó a los 45 días de sembradas, estos resultados son similares a los obtenidos por Jäger (2011), quien afirma que las semillas de *Cinchona pubescens* germinan entre 10 a 40 días utilizando la misma cantidad de 1,0 mg/l de AG₃.

El ácido giberélico en una concentración de 1,0 mg/l, incrementó esta variable, superior y diferente a lo reportado en los tratamientos de 0,0 y 0,5 mg/l. Las menores velocidades de germinación se presentaron en los tratamientos 0,0 y 0,5 mg/l de ácido giberélico, mientras que a una concentración de 1,0 mg/l se acortó el periodo de germinación de las semillas. En general se observó que conforme aumenta la concentración de ácido giberélico, aumenta la velocidad de germinación, lo cual concuerda con lo mencionado por López y González (1996), quienes señalan que la germinación *in vitro* tiene ventajas, ya que aumenta la tasa de germinación, reduce el tiempo y homogeniza la germinación, gracias al fitorregulador de crecimiento de acción hormonal (AG₃) que estimula la germinación de las semillas.

5.3. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L.

Los explantes cultivados *in vitro* no se comportan completamente autotróficos, ya que el medio de cultivo proporciona agua, nutrientes, azúcares y reguladores de crecimiento (Fuentevilla, 2004). Los nutrientes están involucrados en diferentes procesos fisiológicos, como activación de enzimas, regulación del metabolismo y en los componentes estructurales, se ha demostrado que las plantas con desbalance nutricional se convierten más susceptibles a las enfermedades (Pérez, *et al.* 2010; Barceló, *et al.* 2007; Kirkby y Römheld, 2007). Una deficiencia puede desarrollarse cuando la concentración del AG₃ en la solución nutritiva es baja, de tal manera que no puede ser utilizada por la planta.

Los tejidos vegetales solo crecerán *in vitro* si se suministra un medio específico que cubra sus necesidades. Tanto el tipo de medio del cultivo como los suplementos necesarios, reguladores de crecimiento o vitaminas pueden requerir un ajuste de acuerdo a la especie (Bacchetta, *et al.* 2008). El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

Pérez (1998), asegura, que es necesario adicionar al medio de cultivo algunas hormonas especialmente (auxinas-citocininas), ya que en la micropropagación *in vitro* de explantes inducen a la división celular. Pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos (Howell, *et al.* 2003). Coenen y Lomax (1997), afirman que las hormonas son claves para inducir la formación de nuevos brotes en diversos explantes *in vitro* (hojas, raíces, medula, cotiledones).

En la presente investigación, de acuerdo a los resultados alcanzados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes, el tratamiento que obtuvo el mayor tamaño del brote fue el T3 (0,2 mg/l de ANA + 0,2 mg/l de KIN), con 1,10 cm de altura promedio; pero fue el tratamiento que menor número de brotes obtuvo, disminuyendo a la par el número de nudos y hojas. Esto se debe a que la combinación hormonal no permitió la brotación del explante, el cual solo se desarrolló en altura, concordando con lo expresado por Pedroza (2005), quien manifiesta que los requerimientos hormonales son específicos para cada especie vegetal.

De este modo, la mejor combinación hormonal (auxinas-citocininas) para la formación de brotes, nudos y hojas por explante en *Cinchona officinalis* L, fue el T2 (0,2 mg/l de ANA + 2 mg/l de BAP), logrando obtener los mejores resultados con un número promedio de (4,73; 27 y 12,10) respectivamente, lo que corrobora con estudios realizados por Díaz (2012), en *Cedrela montana* quien manifiesta que utilizando 2 mg/l de BAP sin combinación con ANA obtuvo un promedio de 3 brotes por cada explante, Daquinta (2003), asegura que a medida que aumenta la concentración de BAP, se alcanzan mejores niveles de brotación en especies forestales.

Otros estudios realizados por Santos (2011), en *C. officinalis* L., sin adicionar al medio de cultivo MS ningún tipo de hormonas alcanzó una altura de 1.01 cm en brotes y un total de 4,1 brotes por cada explante, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que se alcanzó una altura promedio de 1,10 cm y se formó un numero promedio de 4,73 brotes por cada explante. Sin embargo, Santos (2011), obtuvo esos resultados a los 90 días, en la presente investigación se adicionó al medio de cultivo una combinación hormonal en el T2 de (0,2 de ANA y 2,0 de BAP) la que permitió tener los mismos resultados pero en 45 días. Esto demuestra que el ANA promueve la división celular, estimulando el crecimiento vegetativo de los explantes; y, el BAP induce la formación de nuevos brotes, permitiendo así la aparición de nudos y a su vez nuevas hojas.

En este mismo sentido, Jordan y Caseretto (2006), afirman que si existe en el medio de cultivo un nivel relativamente alto de citoquininas (BAP) vs., auxinas (ANA), el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes. Si por el contrario, los niveles de las dos hormonas se invierten, de manera que la relación de auxina es más alta vs. las citoquininas, la expresión del tejido cambia y se originan raíces.

6. CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección *in vitro* de las semillas de *Cinchona officinalis* L., se comprobó que el hipoclorito de sodio (NaOCl) en altas concentraciones (50 %), en los tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos), la contaminación de las semillas fue nula.
- La concentración de 1,0 mg/l de ácido giberélico (AG₃) que se adicionó al medio de cultivo (MS), fue la más adecuada para la germinación *in vitro* de las semillas de *Cinchona officinalis* L, con un 74,44 % de germinación, en un tiempo de 45 días, luego de la inoculación *in vitro* de las semillas.
- En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L (ápices caulinares y segmentos nodales), el mejor resultado en la formación de brotes, nudos y hojas, se obtuvo en el tratamiento de la combinación hormonal T2 (0,2 mg/l de ANA + 2 mg/l de BAP); con un número promedio de 4,73; 27,00 y 12,10 respectivamente.

7. RECOMENDACIONES

- Para lograr un mayor porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., se recomienda realizar la siembra a pocos días de haber realizado la recolección.
- En la germinación de semillas se recomienda usar el medio de cultivo MS suplementado con 1,0 mg/l de ácido giberélico (AG₃) para obtener mayor número de semillas germinadas.
- En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales), se recomienda adicionar al medio de cultivo MS un balance hormonal auxinas - citoquininas, con una menor concentración de ANA y una mayor concentración de BAP.
- Consolidar una alianza estratégica entre la Universidad Nacional de Loja, GADs Parroquiales y otras instituciones no gubernamentales con interés en proyectos de investigación en micropropagación vegetal, con el fin de recuperar ecosistemas degradados y de esa manera lograr vincularse con la población.
- Continuar con estudios similares con la especie *Cinchona officinalis* L., con la finalidad de lograr el mejoramiento genético de la especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A; Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 38p.
- Alarcón, M; García, J; Rojas, S. 2006. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Propagación asexual de plantas. 60p.
- ANACAFE (Asociación Nacional del café). 2004. Cultivo de Quina: Programa de diversificación de ingresos en la empresa cafetalera.
- Andersson, L; Taylor, C; 1994. “Rubiaceae *cinchoneae coptosapelteae*”. En: Harling G, Andersson L (Eds), Flora of Ecuador no 50. Council for nordic publications in Botany. Museo Botánico. Dinamarca. 114p.
- Apolo, M. 2012. Germinación en laboratorio e influencia de los hongos micorrízicos y la aplicación de nutrientes en el crecimiento de dos procedencias de *Cinchona pubescens*, a nivel de invernadero. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja. EC. 78p.
- Bacchetta, G; Bueno, A; Fenu, G; Jiménez, B; Mattana, E; Piotto, B; y Virevaire, M. 2008. Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias - La Caixa. 378p.
- Barba, A; Luna, B; Romero, J. 2001. Micropropagación de plantas. Primera edición. México. Trillas. 107p.
- Barceló, J; Nicolás, G; Sabater, B; Sánchez, R. 2007. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid – ES.
- Besnier, R; 1989. Semillas. Biología y tecnología. Madrid. 625p
- Buddenhagen, C; Renteria, J; Gardener, M; Wilkinson, S; Soria, M; Yanez, P; Tye, A; Valle, R. 2004. Control of a highly invasive tree *Cinchona*, in Galápagos. Weed technology 18: 1194-1202p.
- Buitrón, G. 1999. Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. Ecuador: TRAFFIC International.

Campos, J; Cerna, L; Chico, J. 2014. Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. Revista Científica de Estudiantes. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. (En línea). Consultado el 15 dic. 2015. Disponible en: file:///C:/Users/R-LIMA/Downloads/637-1463-1-PB%20(3).pdf.

Cárdenas, R. 2006. Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile. 97p.

Castro, D. 2001. Micropropagación de *Cedrela odorata* L., Universidad de Colombia, 17p.

Cepvi, 2015. Psicología, medicina, salud y terapias alternativas. Enciclopedia de plantas medicinales descripción y usos medicinales; Quina *Cinchona officinalis*. (En línea). Consultado 05 abr. 2015. Disponible en: <http://www.cepvi.com/medicina/plantas/quina.shtml#.VSN2PRqPhTQ>.

COENEN C & TL LOMAX. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends Plant Science 2: 351-356p.

Conde, V. 2015. Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de hualtaco *loxopterygium huasango* spruce ex engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 125 p.

Daquinta, M; Rodríguez, L; Ramos, L; Capote, R. 2003. Manejo biotecnológico de especies forestales y bambúes en Cuba. XII World Forestry Congress. Québec City, Canadá.

Das, M; Pal, A. 2005. *In vitro* regeneration of *bambusa cao* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in axillary buds. 112p.

Días, G. 2012. Procesos morfogénicos *in vitro* de Cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) Inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 141 p.

Duque, J. 2010. Biotecnología. Panorámica del sector. 114p.

- Espinoza, C. 2004. Revista ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas, patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micro propagadas y de semillas. Volumen XXXV-Nº 1 y 2. EC. 82 pág.
- Folgueras, M; Herrera, L; Carrazana, D. 2001. La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de semillas tropicales. 185p.
- Fuentevilla, C. 2004. Propagación *in vitro* de algunas especies de *Leucocoryne*. pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Área de Hortalizas y Flores. Quillota-Chile. Pág. 76.
- 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, Universsidad Técnica Particular de Loja. UTPL. EC. 185p.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5. Part 1. 2. Ed. Exegeties Ltd. 1993. 130 – 143p.
- Gonzalez, M. 2002. Manual de laboratorio de técnicas de micropropagación, Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid-España. ES.
- Gray, W; Estelle, M. 1998. Biochemical genetics of plant growth. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 196-201p.
- Günther, S; Stimm, B; Weber, M. 2004. Silvicultural contributions towards sustainable management and conservation of forest genetic resources in Southern Ecuador. (En línea). Consultado el 07 abr. 2015. Disponible en: http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_307/pdf/article.pdf.
- Hartman, H; Kester, D. 1997. Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 p.
- Hernández, P. 2015. Tratado metódico y práctico de materia médica y de terapéutica. Fundado en la ley de los semejantes; China – *Cinchona officinalis* – Quina – Materia médica. (En línea). Consultado 05 abr. 2015. Disponible en: <http://honatur.com/china-cinchona-officinalis-quina-materia-medica/>

- Hernández, Y; González, M. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos tropicales, 31(4), 19p.
- HOWELL SH, LALL S & P CHE. 2003. Cytokinins and shoot development. Trends Plant Science 8: 453- 459p.
- IUCN. 2014. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. (En línea). Consultado el 07 abr. 2015. Disponible en: <http://www.iucn.org/es/sobre/>
- Jäger, H. 2011. Cinchona pubescens. Enzyklopädie der Holzgewächse. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Alemania (in press).
- Jaramillo, A. 2002. Distribución y métodos de propagación del Capotillo *Anthurium giganteum* Engl., en los bosques de la parroquia Molleturo, Provincia del Azuay. Tesis de grado. Carrera de Ingeniería Forestal, UNL. Loja – EC. 52 p
- Jordan, M; Caseretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. (En línea). Consultado el 25 abr. 2016. Disponible en: <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Kirkby, A; Römheld, V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 543. The International Fertilizer Society, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom. 21p.
- Kubotal, C; Ezawa, M; Kozai, T; Wilson, S. 2002. *In situ* estimation of carbón balance of *in vitro* sweet potato and tomato plantlets cultur ed with varying initial sucrose concentrations in the medium. Journal of American Society of Horticultural Science. 127: 963–970p.
- Kunneman, B; Faaij-Groenen, G. 1994. Elimination of bacterial contaminants: a matter of detection and transplanting procedures in: bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures ishs acta hort. 225: 183 -188p.

Leifert, C; Morris, C; Waites, W. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences. Vol. 13p. 139-183p.

Lluna, R. 2006. Hormonas vegetales; crecimiento y desarrollo de la planta. (En línea). Consultado 07 abr. 2015. Disponible en: http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh196_2/22_27.pdf

Loayza, T; Sánchez, E. 2006. La corteza de Loja. Revista Ecuador Tierra Incógnita. EC. 1-4 p.

López, E; González, P. 1996. A propósito de semillas. Enc. En la Biol., 33: 3p. Ltd. 1993. 130 – 143p.

Lozada, P. 2010. Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo *in vitro* de tomate de árbol (*Solanum betaceae*). Tesis Ing. Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. 92p.

Madsen, J. 2002. Historia cultural de la cascarilla de Loja, Botánica austroecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Ediciones Abya Yala, Quito-Ecuador. 385-399p.

Martínez, A; Guallart, R; Fernández, F; Gómez, M; Martínez, J. 2013. Quino / *Cinchona officinalis* / el árbol de la Quina. (En línea). Consultado el 02 abr. 2015. Disponible en: <http://elarbormiamigo-encinarosa.blogspot.com/2013/01/quino-cinchona-officinalis-el-arbol-de.html>

Mejía, A. 1994. Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones, propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*. La Molina Perú. 79p.

Monsanto. 2011. Conceptos básicos de biotecnología vegetal. (En línea). Consultado el 10 jul. 2015. Disponible en: <http://www.monsanto.com/global/es/productos/pages/conceptos-basicos-de-biotecnologia-vegetal.aspx>.

Mroginski, L; Roca, W; 2008. Unidad de Investigación de Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Establecimiento de cultivos vegetales. (En

línea). Consultado el 07 abr. 2015. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agriculturacapitulo2.pdf>.

Narváez, S. 2009. Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa, variedad Akito (rosa sp. var Akito). Departamento de ciencias de la vida. Carrera de Ciencias Agropecuarias – I.A.S.A. Gral. Carlo Magno Andrade Paredes.

Nieto, M. 2000. Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. 184-232p.

Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Echenique, V.*

Ovando, I. 2009. Manual de cultivo de tejidos vegetales para ingenieros biotecnólogos; qué es el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales. (En línea). Consultado el 07 abr. 2015. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Manual%20c%20in%20v.pdf>.

Pedroza, J.; Fernández, C.; Suárez, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *in vitro* cell. Dev. Biol. Plant. 41. 838-843p.

Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. 391p.

Pérez, J; Albany, N; Vilchez, J; León, S; Molina, M. 2010. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, Departamento de Química. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2010, 27: 447-459p.

Pérez, M. 2000. Ensayo para mejorar la germinación de la Grosella tropical (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels). Zamorano, tesis previa para obtener el título de Ing. Agrónomo. Honduras. 22p.

Rivero, M. 2011. Cultivo de tejidos vegetales I. Agrobiotecnología Curso 2011. Universidad de Buenos Aires. Departamento de fisiología, biología molecular y celular. 85p.

Rodríguez, F. 2014. Inoculación *in vitro* de hongos micorrízicos (MUCL 46238; MUCL 43204) independientemente en *Cinchona officinalis*. Tesis de Grado. Carrera de Bioquímica y Farmacia. UTPL. Loja-EC

Rodríguez, M; Matchus, J; Gersty, A; Santana, M. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en Ñame (*Didcorea alata* L.). Intercadencia. 33(7). 11p.

Rosales, F; Pérez, G; Santizo, M. 2004. Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.).

Sáenz, H; Sánchez, L; 1993. Ensayos de propagación vegetativa por estacas de cuatro especies arbóreas ornamentales. Tesis de grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 68p.

Santos, A. 2010. Influencia de la disminución de nutrientes, y agentes osmóticos sobre el crecimiento de los tejidos de *C. officinalis*. Tesis de Ingeniería en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Particular de Loja. UTPL. Loja-EC. 80p.

Santos, A. 2011. Modificación de nutrientes y agentes osmóticos sobre la limitación del crecimiento *in vitro* de *Cinchona officinalis*, l.: como herramienta de conservación. Tesis previa para obtener el título de Ing. Gestión Ambiental. UTPL. Loja-EC. 37p.

Serrano, M; Piñol, T; 1991. Biotecnología vegetal. Ciencias de la vida. Editorial SINTESIS. S. A. España. 285p.

Sierra, R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito. 194p.

Sitbon, F; Perrot, C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiol Plant* 100: 443–455p.

Suarez, F. 2011. “Micropropagación *In vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido Md-2, A partir de cortes de yemas laterales y apicales”. Previa a la obtención de grado académico o título. Escuela Politécnica del Ejército. 82p.

Tapia, C. 2004. Iniciación *in vitro* de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile e Iniciación *in vitro* de *Herbertia lahue* una Iridácea chilena de interés ornamental.

Tesis Lic. Agr. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Vegetales. 43p.

Tapia, J. 2013. Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de quina (*Cinchona officinalis*) en el Cantón Loja. Universidad San Francisco de Quito. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Agropecuarias. Quito. 83p.

Zurita, W; Gómez, J; Atrián, E; Hernández, A; Granados, M; García, J; Sánchez, N. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del Cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (TILIACEAE). Polibotánica, (38), 129-144p.

9. ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Cont	10	20	42,16	13,33
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0
T2	1	% Cont	10	20	42,16	13,33
	2	% Cont	10	20	42,16	13,33
	3	% Cont	10	0	0	0
T3	1	% Cont	10	20	42,16	13,33
	2	% Cont	10	20	42,16	13,33
	3	% Cont	10	0	0	0
T4	1	% Cont	10	0	0	0
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	20	42,16	13,33
T5	1	% Cont	10	0	0	0
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0
T6	1	% Cont	10	20	42,16	13,33
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0
T7	1	% Cont	10	0	0	0
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0
T8	1	% Cont	10	0	0	0
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0
T9	1	% Cont	10	0	0	0
	2	% Cont	10	0	0	0
	3	% Cont	10	0	0	0

Promedios \pm error estándar de la variable: Porcentaje de contaminación			
Tratamiento	% contaminación	p - valor	CV
T1	6,67 \pm 4,97 A		
T2	13,33 \pm 4,97 A		
T3	13,33 \pm 4,97 A		
T4	6,67 \pm 4,97 A		
T5	0 \pm 4,97 A	0,3276	165,99
T6	6,67 \pm 4,97 A		
T7	0 \pm 4,97 A		
T8	0 \pm 4,97 A		
T9	0 \pm 4,97 A		

LSD Fisher =0,05; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Registro diario del porcentaje de contaminación de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.									
Nº de días	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0
6	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0
7	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0
8	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0
9	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0
10	6,67	6,67	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
11	6,67	6,67	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
12	6,67	6,67	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
13	6,67	6,67	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
14	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
15	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
16	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
17	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
18	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
19	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
20	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
21	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
22	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
23	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
24	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
25	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
26	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
27	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
28	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
29	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
30	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
31	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
32	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
33	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
34	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
35	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
36	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
37	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
38	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
39	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
40	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
41	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
42	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
43	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
44	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0
45	6,67	13,33	13,33	6,67	0	6,67	0	0	0

Anexo 2. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de germinación *in vitro* de semillas *Cinchona officinalis* L.

Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Germinación	30	50	50,85	9,28
	2	% Germinación	30	53,33	50,74	9,26
	3	% Germinación	30	46,67	50,74	9,26
T2	1	% Germinación	30	23,33	43,02	7,85
	2	% Germinación	30	46,67	50,74	9,26
	3	% Germinación	30	53,33	50,74	9,26
T3	1	% Germinación	30	63,33	49,01	8,95
	2	% Germinación	30	70	46,61	8,51
	3	% Germinación	30	90	30,51	5,57

Promedios \pm error estándar de la variable: Porcentaje de germinación			
Tratamiento	% germinación	p - valor	CV
T1	50 \pm 7,09 AB	0,0379	22,24
T2	41,11 \pm 7,09 A		
T3	74,44 \pm 7,09 B		

LSD Fisher = 0,05; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Registro diario del porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.			
Nº de días	Tratamientos		
	T1	T2	T3
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	1,10
16	0	0	1,10
17	0	0	1,10
18	0	0	1,10
19	0	0	1,10
20	1,10	2,20	2,20

...Continúa

...Continuación Anexo 2

21	1,10	2,20	2,20
22	1,10	2,20	2,20
23	1,10	2,20	2,20
24	1,10	2,20	2,20
25	5,60	7,80	18,90
26	5,60	7,80	18,90
27	5,60	7,80	18,90
28	5,60	7,80	18,90
29	5,60	7,80	18,90
30	17,78	24,44	46,67
31	17,78	24,44	46,67
32	17,78	24,44	46,67
33	17,78	24,44	46,67
34	17,78	24,44	46,67
35	27,78	28,89	57,78
36	27,78	28,89	57,78
37	27,78	28,89	57,78
38	27,78	28,89	57,78
39	27,78	28,89	57,78
40	46,67	41,11	66,67
41	46,67	41,11	66,67
42	46,67	41,11	66,67
43	46,67	41,11	66,67
44	46,67	41,11	66,67
45	50,00	41,11	74,44

Anexo 3. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información							
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	
T1	1	% Contaminación	10	0	0	0	
	1	% Mortalidad	10	0	0	0	
	1	N° Brotes	10	4,70	2,54	0,80	
	1	Tamaño del brote (cm)	10	0,61	0,35	0,11	
	1	N° Hojas	10	20,40	8,15	2,58	
	1	N° Nudos	10	9,30	3,92	1,24	
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	2	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33	
	2	N° Brotes	10	2,70	1,83	0,58	
	2	Tamaño del brote (cm)	10	0,58	0,50	0,16	
	2	N° Hojas	10	18,20	11,31	3,58	
	2	N° Nudos	10	8,10	5,02	1,59	
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	3	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00	
	3	N° Brotes	10	3,20	1,81	0,57	
	3	Tamaño del brote (cm)	10	0,83	0,37	0,12	
	3	N° Hojas	10	21,60	11,34	3,58	
	3	N° Nudos	10	9,70	6,25	1,98	
	T2	1	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
		1	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
		1	N° Brotes	10	4,30	4,11	1,30
		1	Tamaño del brote (cm)	10	0,92	1,00	0,32
		1	N° Hojas	10	24,70	17,74	5,61
		1	N° Nudos	10	10,40	8,22	2,60
		2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
		2	% Mortalidad	10	0,00	0,00	0,00
		2	N° Brotes	10	4,90	2,60	0,82
2		Tamaño del brote (cm)	10	1,02	0,36	0,12	
2		N° Hojas	10	32,20	13,93	4,41	
2		N° Nudos	10	13,90	7,59	2,40	
3		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
3		% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00	
3		N° Brotes	10	5,00	3,13	0,99	
3		Tamaño del brote (cm)	10	0,55	0,29	0,09	
3		N° Hojas	10	24,10	15,12	4,78	
3		N° Nudos	10	12,00	8,31	2,63	
T3		1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
		1	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00
		1	N° Brotes	10	2,40	1,90	0,60
		1	Tamaño del brote (cm)	10	0,68	0,53	0,17
		1	N° Hojas	10	14,60	7,38	2,33
		1	N° Nudos	10	5,80	3,58	1,13
		2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
		2	% Mortalidad	10	0,00	0,00	0,00

...continúa

...continuación Anexo 3

	2	N° Brotes	10	3,30	1,83	0,58
	2	Tamaño del brote (cm)	10	1,53	2,39	0,76
	2	N° Hojas	10	20,10	8,75	2,77
	2	N° Nudos	10	8,60	4,20	1,33
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	0,00	0,00	0,00
	3	N° Brotes	10	1,80	1,40	0,44
	3	Tamaño del brote (cm)	10	1,08	0,44	0,14
	3	N° Hojas	10	15,90	10,25	3,24
	3	N° Nudos	10	6,30	4,03	1,27
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
	1	N° Brotes	10	2,10	1,97	0,62
	1	Tamaño del brote (cm)	10	0,80	0,75	0,24
	1	N° Hojas	10	11,80	10,35	3,27
	1	N° Nudos	10	5,70	5,23	1,65
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00
T4	2	N° Brotes	10	1,30	0,95	0,30
	2	Tamaño del brote (cm)	10	0,95	0,52	0,16
	2	N° Hojas	10	10,80	5,43	1,72
	2	N° Nudos	10	4,40	2,07	0,65
	3	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	N° Brotes	10	1,60	2,01	0,64
	3	Tamaño del brote (cm)	10	0,57	0,75	0,24
	3	N° Hojas	10	10,20	11,93	3,77
	3	N° Nudos	10	4,40	5,25	1,66

Continúa Anexo 3...

...Continuación Anexo 3

Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.						
	% Contaminación	% Mortalidad	Nº brotes/explante	tamaño del brote (cm)	Nº hojas/explante	Nº nudos/explante
tratamientos	p-valor = 0,5957	p-valor = 0,0223	p-valor = 0,0035	p-valor = 0,3337	p-valor = 0,0008	p-valor = 0,0007
	CV = 244,95	CV = 92,58	CV = 22,52	CV = 32,33	CV = 15,17	CV = 15,58
T1	0 \pm 4,71 A	10 \pm 6,24 A	3,53 \pm 0,40 BC	0,67 \pm 0,16 A	20,07 \pm 1,64 B	9,03 \pm 0,74 B
T2	6,67 \pm 4,71 A	11 \pm 6,24 A	4,73 \pm 0,40 C	0,83 \pm 0,16 A	27 \pm 1,64 C	12,10 \pm 0,74 C
T3	0 \pm 4,71 A	3,33 \pm 6,24 A	2,50 \pm 0,40 AB	1,10 \pm 0,16 A	16,87 \pm 1,64 B	6,90 \pm 0,74 AB
T4	6,67 \pm 4,71 A	23,33 \pm 6,24 A	1,67 \pm 0,40 A	0,77 \pm 0,16 A	10,93 \pm 1,64 A	4,83 \pm 0,74 A

LSD Fisher =0,05; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Anexo 4. Imágenes del ensayo de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

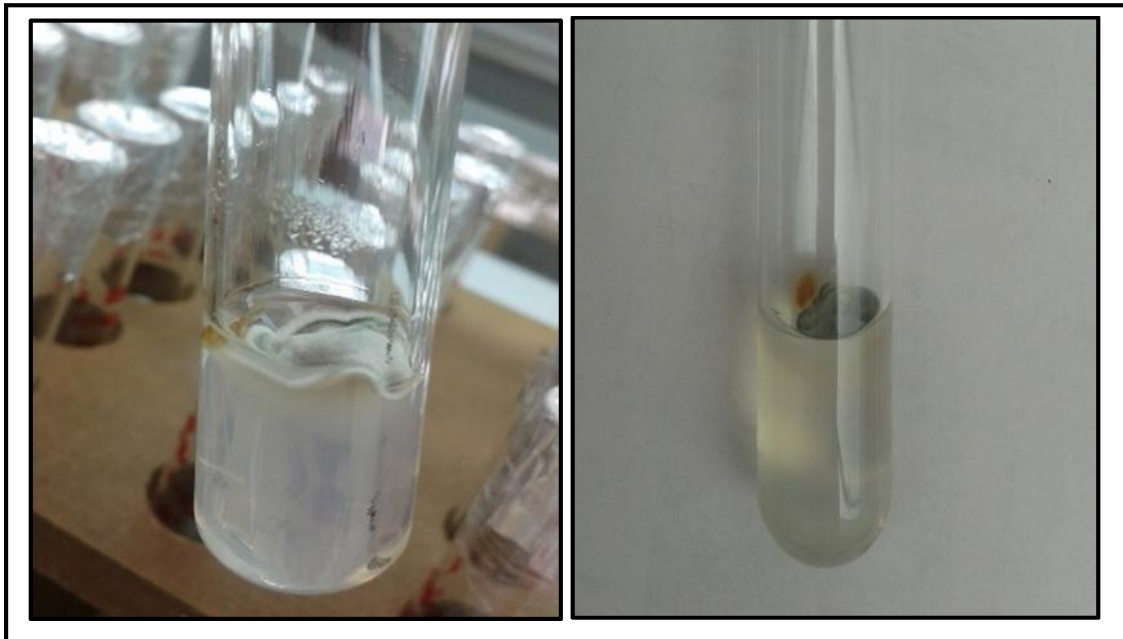


Foto 1. Semillas contaminadas por hongos y bacterias



Foto 2. Germinación *in vitro* de semillas con el T3 (1mg/l AG₃).

Anexo 5. Imágenes del ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L.

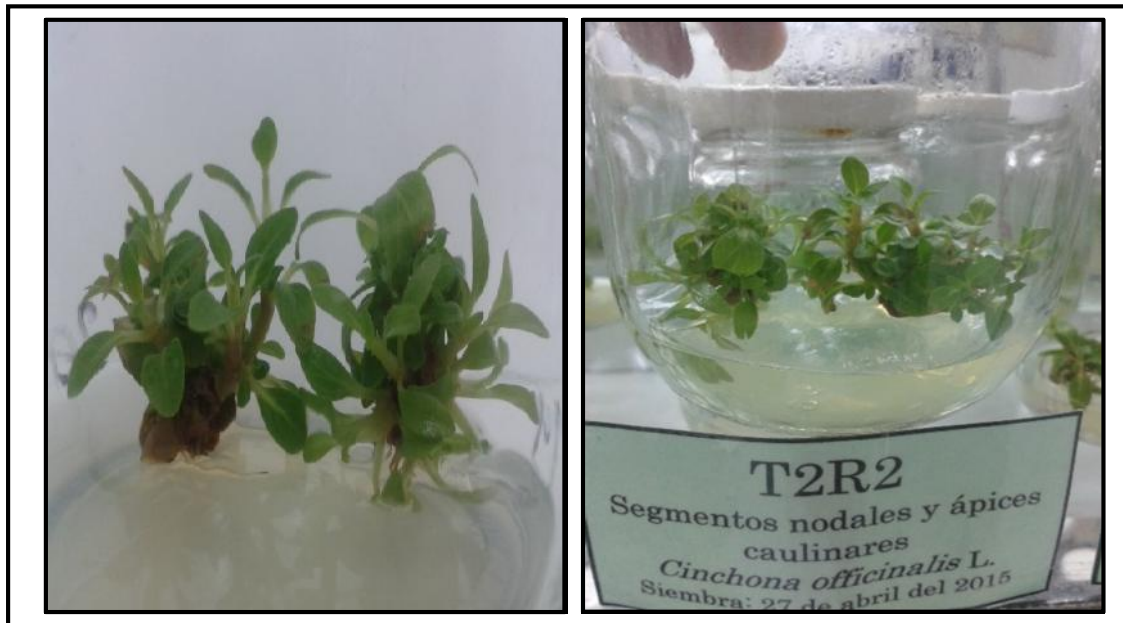


Foto 3. Explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) evaluados a los 45 días en el T2 (0,2 ANA 2 BAP), el cual presentó los mejores resultados.



Foto 4. Explantes (segmentos nodales y ápices caulinares) contaminados por hongos.

Anexo 6. Imágenes de la toma de datos de los diferentes ensayos durante la investigación

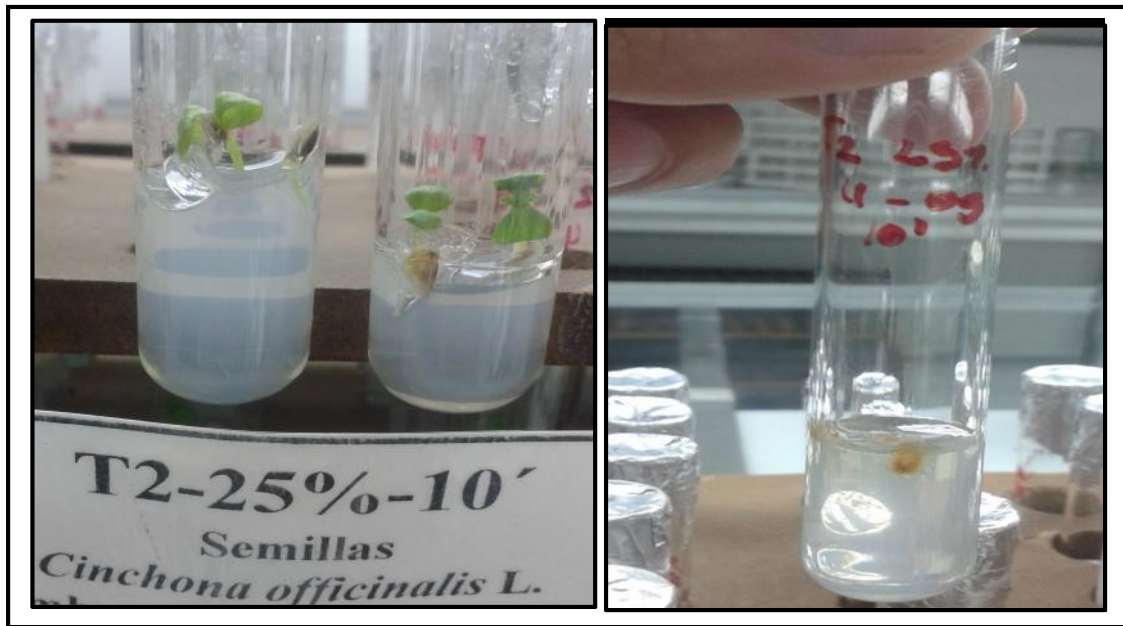


Foto 7. Toma de datos del ensayo de germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., durante la investigación.



Foto 8. Toma de datos del ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante la investigación.

Anexo 7. Imágenes de la socialización de la tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.



Foto 9. Socialización de la tesis al Equipo Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal

Anexo 8. Imágenes de la socialización de los resultados de la tesis a los estudiantes de Quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal



Foto 10. Socialización de los resultados de la tesis a los estudiantes de Quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal.

Anexo 9. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis



tratamientos	Variables			
	Nº brotes	Tamaño del brote (cm)	Nº nudos	Nº nudos
T1	3,53	0,67	20,07	9,03
T2	4,73	0,83	27	12,10
T3	2,50	1,10	16,87	6,90
T4	1,67	0,77	10,93	4,83

CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., se demuestra que el hipoclorito de sodio en altas concentraciones y diferentes tiempos de inmersión disminuyen la contaminación de las semillas; observadas en el T7 (50% de NaOCl durante 5 min., de inmersión), T8 (50% de NaOCl durante 10 min., de inmersión) y T9 (50% de NaOCl durante 15 min., de inmersión), permitiendo obtener un 0% de contaminación por hongos y bacterias endógenas que permanecen latentes en la semilla de la especie.
- La concentración de 1 mg/L de ácido giberélico (AG₃) que se adicionó al medio de cultivo (MS), fue la más adecuada ya que permitió la obtención de un mayor número de semillas geminadas (74,44%) en el tiempo de 45 días luego de la inoculación.

- En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales), se obtuvo el mejor resultado en la formación de brotes, nudos y hojas; con un número promedio de (4,73; 27 y 12,10) respectivamente por explante en *Cinchona officinalis* L., utilizando una combinación hormonal (auxinas-citoquinina) de (0,2 mg/l de ANA + 2 mg/l de BAP) aplicado en el T2.
- Los resultados obtenidos en la presente investigación; muestran que esta técnica *in vitro* puede ser utilizada como protocolo de micropropagación de *Cinchona officinalis* L., para la recuperación y conservación de la especie.

RECOMENDACIONES

- Para lograr un mayor porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., se recomienda realizar la siembra a pocos días de haber realizado la recolección.
- En la germinación de semillas se recomienda usar el medio de cultivo MS suplementado con ácido giberélico (AG₃) para obtener mayor número de semillas germinadas.
- Para evitar la contaminación en la siembra *in vitro* se recomienda seguir minuciosamente los protocolos de asepsia que el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja contempla en el reglamento interno.
- Consolidar una alianza estratégica entre la Universidad Nacional de Loja, GADs parroquiales y otras instituciones no gubernamentales con interés en proyectos de investigación en micropropagación vegetal, con el fin de recuperar ecosistemas degradados y de esa manera lograr vincularse con la población.



Ingeniería Forestal

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

AREA AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERIA FORESTAL
Laboratorio de Micropropagación Vegetal

“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES DE MATERIAL VEGETAL”.







Responsable: Ramiro Lima.
Director: Ing. José Moreno Serrano, Mst.
Codirectora: Ing. Julia Esther Minchala Patiño

LOJA – ECUADOR
2016

Cara anterior

La destrucción de los recursos naturales en el Ecuador cada vez es más acelerada y alarmante, sobrepasando su capacidad natural de reposición. En la Región Sur, el panorama no es distinto, especies nativas importantes por sus múltiples beneficios, forestales, medicinales, alimenticios, ornamentales, etc., desaparecen cada día.

INTRODUCCIÓN

En los bosques de la provincia de Loja se explotó la cascarilla hasta el siglo XIX, debido a sus propiedades medicinales, ya que contiene metabolitos secundarios (alcaloides) en su corteza.

Es por ello, que existe una gran importancia en realizar estudios alternativos que permitan la protección y difusión de la especie, ya que aún no se ha reportado investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

General

- Aportar a la generación de información sobre los procesos biotecnológicos, que permitan la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación de la especie.

Específicos

- Evaluar la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión
- Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la fase de multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas obtenidas *in vitro*.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló en El Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja

2. Metodología para evaluar la desinfección de semillas

Se probaron nueve tratamientos, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (15, 25 y 50%) con tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min.) respectivamente. Se evaluó el % de contaminación y número de días a la contaminación.

3. Metodología para evaluar la germinación *in vitro* de semillas.

Se Probó tres tratamientos, adicionando AG₃ al medio de cultivo MS en tres concentraciones (0; 0,5 y 1 mg/L) respectivamente. Se evaluó el % de semillas germinadas y días a la germinación.

4. Metodología para evaluar la multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales).

Se utilizaron plántulas germinadas *in vitro* de 5 cm de altura y de 1 - 2 nudos para la obtención de explantes, se empleó del medio de cultivo MS, suplementado con la interacción hormonal de una auxina ácido naftalenacético (ANA) con dos citoquininas: benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN); la auxina ANA en una concentración de 0,2 mg/L y las dos citocininas (KIN y BAP) en dos concentraciones de 0,2 y 2 mg/L respectivamente. Se evaluó % de contaminación, % de mortalidad, número de brotes/explante, longitud del brote (mm), número de nudos y de hojas formadas.

RESULTADOS

1. Desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L.

La aparición de la contaminación se evidenció al quinto día a partir de la siembra. A continuación se muestran los promedios del porcentaje de contaminación alcanzado en cada tratamiento.



2. Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

La germinación se inició a los quince días y se estabilizó a los 45 días. A continuación se presenta los promedios de porcentaje de germinación de cada tratamiento.



3. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Cinchona officinalis* L.

Promedio del porcentaje de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis*.

Cara posterior