UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES.

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN VEGETAL

"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L. PROVENIENTES DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA"

Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniera Forestal

AUTORA: Katherine Isabel Méndez Montaño.

DIRECTOR: Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán Mg.

LOJA- ECUADOR

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

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

DIRECTOR DE TESIS

En calidad de director de la tesis titula **"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA"**, de autoría de la señorita **KATHERINE ISABEL MENDEZ MONTAÑO** con cédula de identidad N° 11500334419, egresada de la carrera de Ingeniería Forestal, ha sido dirigida, revisada y desarrollada dentro del cronograma aprobado, por tal razón autorizo su presentación y publicación.

Loja, 29 de agosto del 2018

Atentamente,

.....

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

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN:

En calidad de presidenta del Tribunal de Calificación de la Tesis titulada **"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L, PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA"** de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal **Katherine Isabel Méndez Montaño**, portadora de la cédula N° 1150034419, se informa que la misma ha sido revisada e incorporadas todas las observaciones realizadas por el Tribunal Calificador, y luego de su revisión se ha procedido a la respectiva calificación. Por lo tanto, autorizo la versión final de la tesis y la entrega oficial para la sustentación pública.

Loja, 06 de noviembre de 2018

Atentamente,

.....

Ing. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo, Mg. Sc.

PRESIDENTA

....

Ing. Nohemí del Carmen Jumbo Benítez, Mg. Sc. Ph. D. Darwin Alexander Pucha Cofrep

VOCAL **VOCAL**

AUTORÍA

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

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

Autora: Katherine Isabel Méndez Montaño

Firma: .....

Cédula: 1150034419

Fecha: Loja, 09 de noviembre de 2018

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

Yo, Katherine Isabel Méndez Montaño declaro ser autor de la tesis titulada **"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L, PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA"**, como requisito para optar al grado de: Ingeniera Forestal, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de si contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

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

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

Para constancia de esta autorización, en la cuidad de Loja, a los nueve días del mes de noviembre del dos mil dieciocho, firma el autor:

Firma: .....

Autor: Katherine Isabel Méndez Montaño

Número de cédula: 1150034419

Dirección: Loja; Cantón Loja; Parroquia el Sagrario, Av. 24 de mayo y mercadillo

Correo electrónico: kathhymendes@gmail.com

Celular: 0997307548

DATOS COMPLEMENTARIOS:

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

Tribunal de grado: Ing. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo, Mg. Sc. PRESIDENTA

Ing. Nohemí del Carmen Jumbo Benítez, Mg. Sc VOCAL

Ph. D. Darwin Alexander Pucha Cofrep VOCAL

AGRADECIMIENTO

Primeramente, quiero agradecer a Dios por su amor y su bondad que me ha permitido terminar esta hermosa etapa de mi vida, llena de satisfacción y miles de experiencias, gracias a él esta meta está cumplida.

Gracias a la Universidad Nacional de Loja, a través de la Carrera de Ingeniería Forestal y a cada uno de sus docentes, que me acogieron y me dieron la mejor de las satisfacciones, formar parte de la familia Forestal. Mil gracias por compartir sus conocimientos y convertirse no solo en docentes sino en amigos quienes no dudaron en brindarme su apoyo y su ayuda cuando los necesitaba.

Agradecer a mi director de tesis al Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, infinitamente gracias por su paciencia y ayuda en todo este proceso, sus consejos y su sabiduría me dieron la oportunidad de crecer como estudiante y como persona ¡Gracias!

De igual forma agradecer a la Ing. Agro. Magaly Yaguana Arévalo y al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal por su dedicación, su apoyo y su tiempo, les estoy eternamente agradecida.

Así mismo, a los miembros del Tribunal Calificador Ing. Paulina, Ing. Nohemí, y Dr. Darwin por sus valiosos consejos y sugerencias realizadas en la presente investigación

Finalmente, gracias a mis padres y hermanos (a), por ser los principales motores de mis sueños, gracias por confiar y creer en mi y en mis expectativas, gracias por cada palabra de aliento y los buenos momentos que compartimos juntos. Así mismo a mis amigos/amigas que compartieron junto a mi toda esta etapa de formación universitaria gracias por su apoyo y amistad, más que compañeros amigos.

Les estaré eternamente agradecida, Dios los bendiga .....

DEDICATORIA

*A **Dios** porque, cada día bendice mi vida dándome la oportunidad de estar y disfrutar de las personas que mas amo, y por permitir formarme como una profesional.*

*A mis amados padres **Merci G. Montaño** y **Milton A. Méndez**, las personas a quien más amo, por esforzarse día y noche por darme siempre más de lo esperado, gracias por mostrarme el camino a la superación y a salir adelante en los momentos más difíciles. Por sus palabras de aliento motivación e inspiración. No me va alcanzar la vida para agradecer tanto sacrificio y tanto amor. Todo esto es por ustedes **¡Los amo papás!**.*

*A mis hermanos **Andrés, Priscila y José Ignacio** quienes a pesar de las dificultades que hemos vivido juntos siempre han estado ahí para mi con su cariño y sobre todo con su apoyo.*

*A mi **Abuelita Teresa y mi Tía Magali** por apoyarme incondicionalmente y estar conmigo en cada momento, por su amor y su cariño se han convertido en parte importante de mi vida **¡Las adoro!***

*A mi apoyo incondicional, mi querido **Tío Dr. Mario Méndez**, que a pesar de la distancia ha estado pendiente de mí y de mi formación profesional día a día, apoyándome y dándome la mano cuando lo necesito.*

*Finalmente, a mi amigo y compañero de vida **Jimmy**, por hacer de esta experiencia las más bonita y gratificante, llena de sueños y metas, por su amor y su tiempo.*

¡Con amor!

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Contenido **Pág.**

CARATULA……i

CERTIFICACIÓN…….ii

APROBACIÓN……..iii

AUTORÍA……...iv

CARTA DE AUTORIZACIÓN…….v

AGRADECIMIENTO……...vi

DEDICATORIA……vii

RESUMEN……....xix

ABSTRAC…….……xxi

1. INTRODUCCIÓN. 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA. 3

2.1. Antecedentes históricos de la especie *Cinchona*. 3

2.2. Descripción del género *Cinchona.* 4

2.3. Descripción botánica y taxonómica de *Cinchona officinalis* L. 5

2.3.1. Descripción botánica. 5

2.3.2. Descripción taxonómica. 5

2.4. Importancia de la conservación *Cinchona officinalis* L. 6

2.5. Importancia de la Biotecnología vegetal en la propagación de las plantas. ... 7

2.5.1. Micropropagación vegetativa *"in vitro".* 7

2.6. Organogénesis de tejidos vegetales *"in vitro"*. 10

2.7. El medio de cultivo para la propagación *"in vitro"*. 12

2.7.1. Las sales minerales del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). 12

2.8. Reguladores de Crecimiento. 13

2.8.1. Auxinas. 13

2.8.2. Citoquininas. 13

2.8.3. Giberelinas.....14

2.9. Vitaminas.....14

2.10. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos *"in vitro"*. 15

2.10.1. El inóculo o explante.....15

2.10.2. Factores físicos.....15

2.11. Cultivo de callos.....15

2.12. Oxidación fenólica. 16

2.12.1. Oxidación fenólica en cultivo de tejidos 16

2.12.2. Daños provocados al explante por oxidación fenólica.....17

2.13. Estructuras de *Novo*.....17

2.14. Estudios similares.....17

3. METODOLOGÍA..... 19

3.1. Ubicación del área de estudio.....19

3.1.1. Fase de campo. 19

3.2. Metodología para probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.....20

3.2.1. Germinación "in vitro" de semillas de *Cinchona officinalis* L, provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco. 20

3.2.2. Obtención de explantes para la formación de callos. 21

3.2.3. Fase de formación de callos. 22

3.3. Metodología para determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras de Novo de *Cinchona officinalis* L. 27

3.3.1. Selección de material vegetal.....27

3.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido. 28

3.3.3. Inoculación *"in vitro"* de los callos. 29

3.3.4. Diseño experimental para la formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.....30

3.4. Metodología para la difusión y publicación de los resultados de la investigación a actores sociales interesados. 32

4. RESULTADOS. 33

4.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L. 33

4.1.2. Número de dias a la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Uritusinga. 35

4.1.3. Número de días a la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Zamora Huayco. 36

4.1.4. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Uritusinga. 38

4.1.5. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Zamora Huayco. 39

4.1.6. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro* provenientes del sitio Uritusinga. 40

4.1.7. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, provenientes del sitio Zamora Huayco. 41

4.1.8. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Uritusinga. 42

4.1.9. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Zamora Huayco. 43

4.1.10. Color del callo de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Uritusinga 44

4.1.11. Color del callo de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Zamora Huayco. 45

4.1.12. Porcentaje de Friabilidad de callos de *Cinchona officinalis* L, provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco. 46

4.2. Determinación del mejor balance hormonal para la formación de estructuras de Novo de *Cinchona officinalis* L. 47

4.2.1. Número de brotes de *Novo* por callo de *Cinchona officinalis* L. inoculados in vitro provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco. 47

4.2.2. Número de días a la formación de brotes de *Novo* de los callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga. 49

4.2.3. Número de días a la formación de brotes de Novo por callo de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco. 51

4.2.4. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Uritusinga. 52

4.2.5. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de C*inchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Zamora Huayco. 53

4.2.6. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados i*n vitro* del sitio Uritusinga. 54

4.2.7. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados i*n vitro*, del sitio Zamora Huayco. 55

4.2.8. Porcentaje de mortalidad de estructuras de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L. inoculados *in vitro*, del sitio Uritusinga. 56

4.2.9. Porcentaje de mortalidad de estructuras de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., inoculados i*n vitro*, del sitio Zamora Huayco. 57

4.3. Difusión de la información a actores sociales interesados. 58

5. DISCUSIÓN. 60

5.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L. provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco. 60

5.2. Determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras de Novo de *Cinchona officinalis* L., provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco. 62

6. CONCLUSIONES. 65

7. RECOMENDACIONES. 67

8. BIBLIOGRAFÍA. 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido **Pag.**

Figura 1. Flores del árbol de *Cinchona officinalis* L…… 5

Figura 2. *Cinchona officinalis* L.: a) árbol, b) hojas, c) flores, y d) frutos con semillas…… 6

Figura 3. Mapa de ubicación de sitios de muestreo (Uritusinga y Zamora Huayco) …….. 19

Figura 4. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación vegetal de la Universidad Nacional de Loja…… 20

Figura 5. Siembra de semillas de C*inchona officinali*s L., b) Germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L…… 21

Figura 6. a) Siembra de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L; b) Fase de brotamiento de *Cinchona officinali*s L… 22

Figura 7. a) Preparación medio de cultivo MS sólido/fase callos; b) ajuste de pH……... 22

Figura 8. a) Disección de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinali*s L; b) Inoculación de explantes…… 24

Figura 9. Obtención de material vegetal a ser utilizado en la fase de formación de brotes de *Novo* de *Cinchona offici*nalis L. a) Sitio Uritusinga; b) Sitio Zamora Huayco…… 28

Figura 10. Preparación medio de cultivo sólido MS para la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L……... 28

Figura 11. Disección e inoculación de callos a ser utilizados en la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L…… 30

Figura 12. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de dos sitios de estudio… 33

Figura 13. Formación de callos de *Cinchona officinalis* L, de dos sitios de estudio: a) Uritusinga; b) Zamora Huayco…….. 34

Figura 14. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L. sitio Uritusinga…….. 36

Figura 15. Fase de formación de callos; a) Primeros 15 días de evaluación; b) Valoración final (60 días) en la formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga……. 36

Figura 16. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del itio Zamora Huayco…… 37

Figura 17. Fase de formación de callos; a) Primeros días 10 de evaluación; b) valoración final (55 días) en la formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 37

Figura 18. Organogénesis directa durante la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L a) Sitio Uritusinga, b) Sitio Zamora Huayco…… 38

Figura 19. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 39

Figura 20. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 40

Figura 21. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 41

Figura 22. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 42

Figura 23. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 43

Figura 24. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, sitio Zamora Huayco…… 44

Figura 25. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 45

Figura 26. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco……. 46

Figura 27. Porcentaje de friabilidad de callos de *Cinchona officinalis* L, de los sitios Uritusinga y Zamora Huayo…… 47

Figura 28. Porcentaje promedio de formación de estructuras de *Novo* obtenidos a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco…… 48
Figura 29. Brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L; a) Uritusinga; b) Zamora Huayco..... 49
Figura 30. Formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., después de 100 días de exposición en cada uno de los tratamientos evaluados, del sitio Uritusinga……. 50
Figura 31. Formación de brotes de *Novo*; a) Primeros 30 días de evaluación; b) Evaluación final (100 días) en la formación de brotes *Novo* de *Cinchona officinalis* L, sitio Uritusinga…… 51
Figura 32. Formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 80 días de evaluación en cada uno de los tratamientos; del sitio Zamora Huayco…… 52
Figura 33. Formación de brotes de *Novo*; a) Primeros 30 días de evaluación; b) valoración final (80 días) en la formación de estructuras de brotes de Novo de *Cinchona officinalis* L, sitio Zamora Huayco… 52
Figura 34. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga……. 53
Figura 35. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 54
Figura 36. Porcentaje de oxidación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 55
Figura 37. Porcentaje de oxidación fenólica de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 56
Figura 38. Porcentaje de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 57
Figura 39. Porcentaje de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 58
Figura 40. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico y docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal..... 59

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido		Pág.
Cuadro 1.	Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog – MS……	13
Cuadro 2.	Ubicación de los sitios de estudio en la provincia de Loja……..	19
Cuadro 3.	Concentraciones hormonales auxina- citoquinina para la formación de callos de *Cinchona officinalis* L……	23
Cuadro 4.	Interacción de auxinas-citoquininas para la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L…….	24
Cuadro 5.	Tratamientos evaluados en la interacción de auxina-citoquinina para la formación de callos de *Cinchona officinalis* L……...	25
Cuadro 6.	Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L……	27
Cuadro 7.	Efecto de la interacción auxina-citoquinina en la formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L……..	29
Cuadro 8.	Tratamientos evaluados para el efecto de la interacción auxina-citoquinina en la fase de formación de Estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L……	30
Cuadro 9.	Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de brotes de estructuras de *Novo de Cinchona officinalis* L……..	32
Cuadro 10.	Resultados estadísticos obtenidos de la variable porcentaje de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…….	34
Cuadro 11.	Resultados estadísticos obtenidos de la variable porcentaje de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…….	35
Cuadro 12.	Número de explantes contaminados por cada tratamiento evaluado de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…….	38
Cuadro 13.	Número de explantes contaminados por cada tratamiento evaluado de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…	39

Cuadro 14. Número de explantes con oxidación fenólica por cada tratamiento evaluado; del sitio Uritusinga…… 40
Cuadro 15. Número de explantes con oxidación fenólica por tratamiento; sitio Zamora Huayco……. 41
Cuadro 16. Registro de mortalidad de explantes durante la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, sitio Uritusinga……. 42
Cuadro 17. Registro de mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L, muertos durante la fase de formación de callos, del sitio Zamora Huayco…… 43
Cuadro 18. Registro de la variable color del callo en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga……. 44
Cuadro 19. Registro de la variable color del callo en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 46
Cuadro 20. Resultados estadístico-obtenidos en la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga……. 48
Cuadro 21. Resultados estadístico-obtenidos en la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco…… 49
Cuadro 22. Registro de callos contaminados de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Uritusinga……. 53
Cuadro 23. Registro de callos contaminados de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Zamora Huayco…….. 54
Cuadro 24. Registro de oxidación fenólica de brotes de *Novo* en *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga……. 55
Cuadro 25. Registro de brotes de *Novo* con oxidación fenólica, sitio Zamora Huayco……. 56
Cuadro 26. Porcentaje de mortalidad de brotes de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga…… 57
Cuadro 27. Registro de mortalidad de brotes de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L del sitio Zamora Huayco…… 58

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido **Pág.**

Anexo 1. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis……. 77

“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L. PROVENIENTES DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”.

RESUMEN

Cinchona officinalis L. es una especie vegetal emblemática de la provincia de Loja, debido a su valor medicinal, cultural e histórico, se le conoce como el Árbol Nacional del Ecuador (Anda, 2002), pese a la importancia histórica y económica que tiene el árbol de quina, actualmente está catalogada como una especie potencialmente amenazada a nivel nacional debido a la sobre explotación por el comercio de su corteza, para extraer principalmente el alcaloide denominado quinina, única cura contra la malaria durante los siglos XVII, XVIII, XIX y mediados del siglo XX. Además, de prácticas de quema en agricultura migratoria, actividades antrópicas de alto impacto para la expansión de la frontera agrícola y ganadera, actividades que han influenciado sobre la regeneración y recuperación de la especie (Acosta, 1947).

Actualmente las poblaciones de *Cinchona officinalis* L., se encuentras amenazadas por su alta dificultad de propagación "*in vivo*", la tasa germinación de sus semillas es muy baja, aunque todavía pueden encontrar individuos aislados en potreros, formando pequeños relictos boscosos, ubicados en pendientes pronunciadas y lugares con acceso limitado (Menesses, 2017).

En este contexto, la presente investigación de la especie *Cinchona officinalis* L., se realizó con el propósito de aportar con protocolos para las fases de inducción de callos y estructuras de *Novo*, con fines de conservación y mejoramiento genético. El presente trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación "**Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja",** mismo que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

Para la obtención del material vegetal se colectaron frutos de dos sitios de estudio: Uritusinga (Cantón Catamayo); y Zamora Huayco (Cantón Loja), las semillas fueron sembradas en condiciones *in vitro* para garantizar la obtención de material inocuo para las diferentes fases de laboratorio.

Para la fase de formación de callos, se utilizó segmentos nodales de vitroplantas *Cinchona officinalis* L., los explantes se inocularon en medio de MS sólido, suplementados con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: ANA en concentraciones de 1,0; y 2,0 mg/l, y BAP en concentraciones de 0,0; y 0,5 mg/l. En el presente estudio se logró determinar que

el medio de cultivo que mostró mejores resultados para el sitio de Uritusinga fue aquel que estuvo suplementado con reguladores de crecimiento en concentraciones de ANA 2,0 mg/l y 0,5 mg/l BAP (T4) logrando un 50.83% de formación de callos; mientras que para el sitio de Zamora Huayco la combinación de ANA 2,0 mg/l y 0,0 mg/l BAP (T2) resultó ser la más afectiva obteniéndose un 70% de formación de callos.

Para la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., los callos fueron inoculados en medio de cultivo MS sólido suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: ANA en concentraciones de 0,3; 0,6; y 1,0 mg/l, y BAPA en concentraciones de 1,0; 1,5; y 2,0 mg/l. En la etapa final del presente estudio se logró determinar que el mejor medio de cultivo para la formación de estructuras de *Novo* de material proveniente del sector Uritusinga estuvo suplementado con ANA 0,6 mg/l y 1,5 mg/l BAP (T2) alcanzando el 14.54% de formación de estructuras de *Novo*; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco la combinación de ANA 0,3 mg/l y 1,0 mg/l BAP (T1) resultó ser la más afectiva obteniéndose un 20% de formación de estructuras de *Novo*.

ABSTRAC

Cinchona officinalis L. is an emblematic plant species of the province of Loja, due to its medicinal, cultural and historical value, it is known as the National Tree of Ecuador (Anda, 2002). Despite, the historical and economic importance of the cinchona tree, it is currently cataloged as a potentially endangered species at national level due to the over exploitation by the bark trade, to extract mainly the alkaloid called quinine, the only cure against malaria during the seventeenth, eighteenth, nineteenth and mid-twentieth centuries. Besides, burning practices in migratory agriculture, anthropic activities of high impact for the expansion of the agricultural and livestock border, activities that have influenced on the regeneration and recovery of the species (Acosta, 1947).

Nowadays, the populations of *Cinchona officinalis* L., are endangered by their high difficulty of propagation "in vivo", the rate of germination of their seeds is very low, although they can still find isolated individuals in paddocks, forming small relict forests, located in steep slopes and places with limited access (De la Torre et al., 2013).

In this context, the present research of the species *Cinchona officinalis* L., was done with the purpose of providing protocols for the induction phases of callus and structures of Novo, for conservation and genetic improvement purposes. The present work was developed in the framework of the research project "Biotechnological processes to initiate the genetic improvement of *Cinchona Officinalis* L., coming of relict forests of the province of Loja", which is done in the Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

To obtain the plant material, were collected fruits from two study sites: Uritusinga (Canton Catamayo); and Zamora Huayco (Canton Loja), the seeds were sowned in vitro conditions to guarantee the obtaining of innocuous material for the different phases of laboratory.

For the callus formation phase, were used nodal segments from vitroplant *Cinchona officinalis* L., the explants were inoculated in solid MS medium, supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations: ANA in concentrations of 1.0; and 2.0 mg / l, and BAP in concentrations of 0.0; and 0.5 mg / l. In the present study was achieved to determine that the crop medium that showed the best results for the Uritusinga site was which that was supplemented with plant growth regulators in concentrations of ANA 2.0 mg / l and 0.5 mg / l BAP (T4) achieving a 50.83% of callus formation; while for the Zamora Huayco site, the

combination of ANA 2.0 mg / l and 0.0 mg / l BAP (T2) was the most affective, getting a 70% of callus formation.

For the phase of Novo structures formation of *Cinchona officinalis* L., the callus was inoculated in solid MS crop medium supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations: ANA in concentrations of 0.3; 0.6; and 1.0 mg / l, and BAPA in concentrations of 1.0; 1.5; and 2.0 mg / l. In the final stage of the present study was achived to determine that the best crop medium for the formation of Novo structures of material coming of the Uritusinga site was supplemented with ANA 0.6 mg / l and 1.5 mg / l BAP (T2) reaching 14.54% of formation of Novo structures; while, for the Zamora Huayco site, the combination of ANA 0.3 mg / l and 1.0 mg / l BAP (T1) was the most affective, getting a 20% of *Novo* structures.

1. INTRODUCCIÓN.

La biodiversidad de nuestro planeta es el resultado de millones de años de evolución, a través de lo cual, se han originado gran variedad de formas y tamaños de organismos; es así qué, en América Latina, los andes tropicales constituyen la región de mayor diversidad biológica de la tierra, aunque ocupa apenas el 1% de su superficie (Myers *et al.*, 2000). El Ecuador es considerado un país megadiverso debido al número de especies que posee por unidad de superficie (283 791 km^2) (Bravo., 2006; Hurtado y Granizo 2001); las razones que explican esa inmensa diversidad son la combinación de factores, geológicos, biogeográficos, ecológicos y evolutivos (Bravo, 2006; Burneo, 2009).

En el Ecuador, una de las provincias con mayor biodiversidad es Loja, la cual está ubicada en la Región Sur del país, la diversidad biológica está influenciada por su ubicación geográfica, diversidad de pisos altitudinales, la depresión de Huancabamba, geomorfología y cuencas hidrográficas que generan hábitats y micro hábitats, que facilitan las condiciones para el desarrollo de flora y fauna (Cuesta *et al*., 2013; Vázquez *et al.*, 2005).

Dentro de esta diversidad, resalta una especie endémica representativa en la provincia de Loja *Cinchona officinalis* L., denominado como el "árbol de la vida", cuyo hábitat se halla entre los 500 y 2500 m.s.n.m. (Harling, 1986; Garmendia 1999, 2005). De acuerdo con Cuvi (2011), la importancia de esta especie radica en su corteza, teniendo sus mayores usos en la medicina, contiene principios terapéuticos contra enfermedades graves como la malaria o paludismo (fiebre amarilla) (Buitrón, 1999).

Actualmente, las poblaciones naturales de C*inchona* continúan reduciéndose principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria, explotación de madera/cascara y actividades antrópicas de alto impacto; lo cual, acompañado de la baja tasa de germinación que presentan sus semillas, limita la regeneración natural, y la misma propagación de la especie (Cruz e Irigoyen, 2005; Epiquién, 2009).

Existe por lo tanto, la necesidad de investigar metodologías alternativas que permitan su multiplicación y conservación, aplicando para ello la técnica biotecnológica denominada micropropagación *in vitro*, la misma que aplicada a especies vegetales permite obtener plantas "elite", que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético y para la obtención de plántulas mejoradas, las que, posteriormente puedan ser utilizadas en

programas de reforestación y forestación, con el propósito de recuperar ecosistemas degradados, convirtiéndose en una alternativa viable de apoyo al sector forestal.

En este contexto, el desarrollo de la presente investigación contribuye a la generación de conocimientos sobre procesos biotecnológicos de *Cinchona officinalis* L., con la finalidad de obtener estrategias de multiplicación de esta especie vegetal. Cabe señalar, que el presente estudio se desarrolló en un periodo de 14 meses (Julio 2017- agosto 2018) el mismo que forma parte del proyecto de investigación titulado: "Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja"; mismo que es ejecutado en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional. En la presente investigación se plantearon los objetivos que se detallan a continuación.

Objetivo General:

- Contribuir a la generación de información sobre procesos biotecnológicos para la inducción de callos y estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Objetivos Específicos:

- Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis L.*
- Determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L.
- Difundir y publicar los resultados de la investigación a actores sociales interesados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Antecedentes históricos de la especie *Cinchona*.

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" (Hernández, 2015).

Sus virtudes fueron reconocidas en Europa recién en 1631, fecha en que fue llevada por el jesuita Alonso Messia Venegas a Roma, enviado por el primer farmacéutico del Colegio Máximo de San Pablo de Lima, el jesuita italiano Agustino Salumbrino quien había observado en el Perú su uso para eliminar tembladeras; luego, fue difundida y comercializada por los jesuitas e importada oficialmente por Francia (Martin, 2001).

Durante la segunda mitad del siglo XVII se realizaron estudios botánicos de especies y variedades de quina, incluidas en el género biológico *Chinchona* o *Cinchona*, por una leyenda que asegura curó a la condesa Ana de Chinchón, esposa del virrey del Perú. Por este nombre se la conoció desde mediados del siglo XVIII, cuando el naturalista sueco Carlos Linneo hizo su clasificación científica. Algunos consideran a la corteza de cascarilla como nombre originario de la quina, "la más importante planta medicinal de ultramar", que según estas versiones habría sido descubierta a comienzos del siglo XVII en el Virreinato del Perú, Corregimiento de Loja, cerca del pueblo de Malacatos, hoy Ecuador (Cuvi y Acosta, 2005; Madsen, 2002).

La quina o quinina tuvo tres momentos importantes de explotación en Ecuador, el primero desde 1633 cuando desde Loja se enviaba hacia Cuenca o Guayaquil la corteza del árbol para su comercialización. La segunda época surgió a partir de 1850 en la época republicana de Ecuador a raíz de la creación de la provincia del Azuay. El tercer momento de esplendor de la quina en Ecuador corresponde a la segunda guerra mundial, pues desde 1941 ejércitos de varias naciones se desplazaron a zonas tropicales como el sudeste asiático y el Pacífico, dónde eran frecuentes las afecciones por paludismo o malaria (Cuvi y Acosta, 2005).

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).

Hasta el siglo XIX esta planta fue la más sobreexplotada en los bosques andinos de Loja, debido a sus propiedades medicinales y curativas que se hallan en la corteza (Nieto, 2000). Actualmente, esta especie se la encuentra en la provincia de Loja está catalogada como amenazada, pese a que ya no se la extrae (Valencia *et al.*, 2000).

Las poblaciones naturales de esta especie se están reduciendo principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria y explotación de la madera (Mejía *et al*., 2012; Tapia, 2013).

2.2. Descripción del género *Cinchona.*

Cinchona es una planta fanerógama, perteneciente a la familia Rubiaceae y es nativa de los valles andinos de Sudamérica (Buitron, 1999; Jager, 2011). Se distribuye a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes desde los 12° latitud norte hasta los 20° latitud sur, encontrándose en alturas que van desde los 700 hasta los 2000 m.s.n.m (Garmendia, 2005). 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).

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). Algunas especies de este género producen quinina, un alcaloide con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas.

El descubrimiento de sus propiedades supuso una revolución en medicina, y aún, hoy en día, sigue siendo utilizada la quinina con fines médicos (Cuvi, 2011).

Según estudios realizados por Garmendia (2005) la especie de *Cinchona officinalis* L. se la conoce como endémica de la región sur del Ecuador específicamente del valle de Loja.

2.3. Descripción botánica y taxonómica de *Cinchona officinalis* L.

2.3.1. Descripción botánica.

Según Pollito (1989) y Missouri Botanical Garden, (2017), la descripción botánica de *Cinchona* es:

Figura 1. Flores del árbol de *Cinchona officinalis* L.

Nombre común: cascarilla, quinina

Nombre científico: *Cinchona officinalis* L.

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: *Cinchona*

2.3.2. Descripción taxonómica.

Segun (Mahecha *et al.*, 2004; Jorgensen y León, 1999; Andersson y Taylor, 1994; Andersson, 1999; Garmendia, 2005; Galeano, 2009; Martínez, *et al.*, 2013; Álvarez, 2014; Romero, 2017) la descripción de *Cinchona officinalis L*, corresponde a la siguiente:

Cinchona officinalis L., es un árbol de 11 a 15 m de altura, de 30 a 40 cm de diámetro de tallo; ramificación simpodial, con copa globosa irregular, bastante densa. La corteza es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular.

La forma de la hoja varia de casi orbicular o lanceolada a elíptico-ovalada, de 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho Simples, opuestas y decusadas. Ápice agudo, acuminado, obtuso o redondo; base obtusa; borde entero, ligeramente sinuado o sinuado. Forma de la hoja elíptico-oblonga o elíptico-ovada. Pinnatinervia recta-curva; haz glabro o ligeramente pubescente, envés con pubescencia escasa o abundante de tipo ceroso. Estípulas aovadas y caducas.

Flores hermafroditas, actinomorfas; cáliz gamosépalo, con 5 lóbulos pequeños; corola blanco-roja, con pétalos fundidos Las flores se encuentran en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, son hermafroditas, actinomorfas, la corola es blanca-roja.

Los frutos son cápsulas de color marrón oscuro, de forma elipsoide. Es una cápsula septicida seca dehiscente polis pérmica, ovoide alargada que puede contener de 12 a 90 semillas se separa longitudinalmente a través de las ranuras carpelares desde la base al ápice del fruto, originando dos valvas o lóculos. El pericarpio es delgado pero leñoso de consistencia dura, la superficie de forma fisurada color café a marrón oscuro con presencia de diminutos tricomas color blanco.

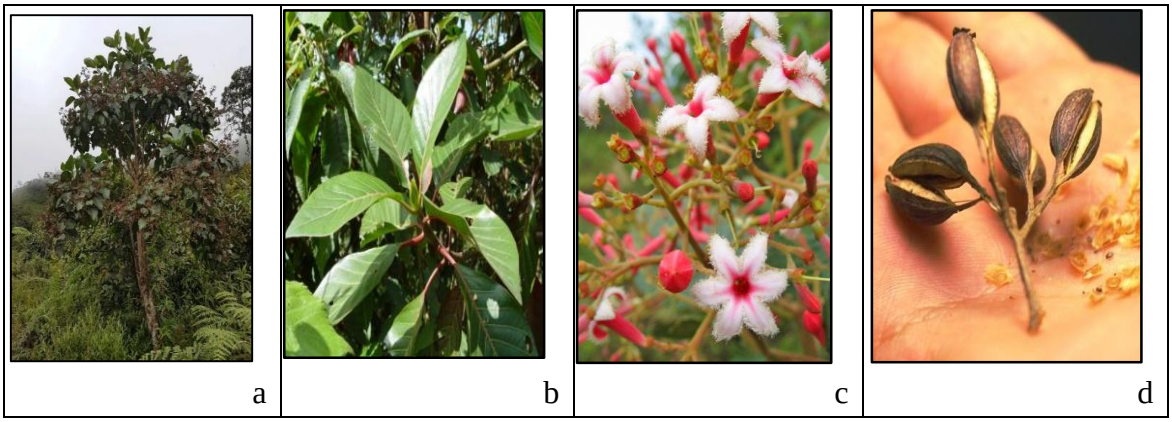

Figura 2. *Cinchona officinalis* L: a) árbol, b) hojas, c) flores, y d) frutos con semillas.

2.4. Importancia de la conservación *Cinchona officinalis* L.

Cinchona officinalis L. es una planta que ha sido utilizada para la obtención de la quinina, constituye un agente antifiebre útil en la prevención y tratamiento de la malaria y el paludismo o fiebre amarilla. Su uso culinario tal vez insospechado es en la coctelería a través de mezclas con agua tónica. La quinina extraída de la corteza de estos árboles da el sabor amargo a este tónico que ha conquistado el mercado de bebidas gaseosas, especialmente en Europa y Estados Unidos.

Es anecdótico que después de más de cuatro siglos de su descubrimiento como tónico medicinal andino, regrese a nuestros países también en forma de tónico, esta vez gaseoso, para su deleite en cócteles (Russell, 2012). También se usa para curar neumonías, acelerador del parto, tónico capilar para evitar la caída del cabello, desordenes del ritmo cardiaco, calambres e indigestión. Es depurativa pues favorece la eliminación de toxinas por piel y orina (Galeano, 2009).

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 la sobre explotación por su alto valor medicinal (Galeano, 2009).

2.5. Importancia de la Biotecnología vegetal en la propagación de las plantas.

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

La biotecnología ha permitido la obtención de resultados positivos en diferentes sectores de producción que van desde mejoramiento del AND (ingeniería genética), cultivo de tejidos vegetales, cultivo de células de mamíferos, biocatalizadores, tratamiento y reutilización de productos residuales por métodos biotecnológicos (biorremediación), fermentaciones, hasta la obtención biotecnológica de combustibles y materia prima orgánica como alternativa al petróleo (Díaz, 2012; Monsanto 2011).

2.5.1. Micropropagación vegetativa "*in vitro*".

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes) sobre medios sintéticos en recipientes de vidrio y 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 foto sintetizadores de la planta (Díaz, 2012).

Los procedimientos empleados en el cultivo de tejidos requieren de la instalación de laboratorios y la aplicación de técnicas asépticas similares a los empleados para el cultivo de hongos, bacterias y otros microorganismos. (Hudson y Hartman, 1987). Esta técnica moderna es un buen complemento de la producción de plantas en vivero, al permitir producir un material de alta calidad genética que podrá ser reproducido en forma masal (Gonzales, 2002).

La micropropagación permite la producción de plantas con características genéticas similares a la planta que les dio origen y es una de las técnicas más factibles de utilizar a corto plazo en el sector forestal. El establecimiento *in vitro* permite un rápido aumento en el

número de plantas, la producción de plántulas durante todo el año, la obtención de plantas con elevada calidad sanitaria (Castillo *et al*., 1992; Lallana y Lallana, 2003); además, hace posible la recuperación de caracteres morfológicos juveniles mediante la ruptura de relaciones existentes entre el explante y el conjunto de planta madre (Mroginsky y Roca, 2000).

Sin embargo, en algunas especies, generalmente leñosas, el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales (explante) está en gran medida limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Hudson *et al,* 1987).

2.5.1.1. Ventajas del cultivo "*in vitro*".

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

- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- Permite la ampliación de la base genética de una especie.
- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.
- Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año.
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales). (Mejía *et al.,* 2012).

2.5.1.2. Desventajas del cultivo "*in vitro*".

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

- Técnica sensible a contaminación por hongos y bacterias
- Necesidad de acceso a instrumental e infraestructura especializada

- Capacitación para aprender las técnicas *in vitro*.
- Necesidad del desarrollo empírico de las técnicas y protocolos que se van a utilizar para cada especie o tejido.
- Propensión del tejido a oxidación y crecimiento anómalo.
- Existencia de pérdidas durante los trasplantes.

2.5.1.3. Fases de la micropropagación vegetativa "*in vitro*".

a. FASE 0: Preparación de la planta madre.

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se debe contar con explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas (Castillo, 2004; Wegier 2013).

b. FASE 1: Desinfección del material vegetal.

De la planta madre, se extraerán los explantes que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc., a los cuales se hará una desinfección para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabaja en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal (Castillo, 2004).

c. FASE 2: Introducción del material "*in vitro*".

Los explantes desinfectados se introducirán en un recipiente de vidrio conteniendo medio de cultivo de iniciación estéril para poder controlar la sanidad y la viabilidad. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

d. FASE 3: Cultivo de callos.

Un callo consiste en una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, un callo se forma en el corte de un tallo o raíz. Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales

rudimentarias con zonas de diferenciación vascular. Una de las características importantes de callo, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas (Haccius, 1978).

Los callos pueden ser amarillentos, blancos, verdes, o coloreados con antocianinas. La pigmentación será en todo el callo, o en algunas regiones sin pigmentar. Su anatomía, es de variación considerable a lo largo de la diferenciación celular (Armijos,2016). Después que el callo ha crecido asociado al tejido original por un tiempo, se vuelve necesario pasarlo a un medio fresco. El crecimiento en un mismo medio por un período extenso provocará el agotamiento de nutrientes y una desecación gradual del agar por la pérdida del agua.

Los metabolitos secretados por los callos se pueden acumular en niveles tóxicos en el medio (Bu'Lock, 1991). Un callo friable puede ser subdividido con una espátula fina o con un bisturí, y transferido directamente a la superficie del nuevo medio. Solamente se debe transferir tejido sano, el tejido marrón, necrótico debe ser eliminado (Bull *et al.*, 1982).

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Litz y Jarret, 1991). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 30-40 días en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2-5 mm. Para la fase de formación de plantas a partir de callos según la vía (organogénesis y embriogénesis somática) que se utilice, será necesaria emplear un balance hormonal diferente. La edad del callo juega un papel fundamental junto con el genotipo en los porcentajes de regeneración alcanzados (Pérez *at al.*, 2002; Pérez, 1988).

2.6. Organogénesis de tejidos vegetales *"in vitro"*.

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

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

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

2.6.1. Organogénesis directa.

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

2.6.2. Organogénesis indirecta.

Es el desarrollo de masas de células desorganizadas y en proceso de desdiferenciación y rediferenciación denominado callo (Adobkar *et al*., 2012). Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, los cuales interactúan con los fitorreguladores endógenos para llegar a un

equilibrio para la formación de órganos (organogénesis), una vez llegado a esto la producción de callo se detiene (Cardoza,2005; Roben *et al.*, 1993).

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

La inducción de plantas vía callo ha sido usada para la producción de plantas transgénicas en las cuales el callo es transformado y las plantas son regeneradas (Mathur y Koncsz, 2005).

2.7. El medio de cultivo para la propagación "*in vitro*".

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua estéril. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias (Ochoa, 2014; Peña *et al*., 2003).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *"in vitro*" ni "*in vivo"*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (Figueroa, 2015). El medio de cultivo empleado en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal es el de Murashige y Skoog (MS) (1962), debido a que puede ser empleado en un amplio rango de especies forestales y de interés agronómico.

2.7.1. Las sales minerales del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Las sales minerales se dividen en macro y micro nutrientes (sulfato de manganeso, zinc, cobre y hierro; ácido bórico; yoduro de potasio; molibdato de sodio; cloruro de cobalto), los compuestos del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), conocido como medio MS (Cuadro 1).

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

Solución madre	Componentes	mg/l
NITRATOS	Nitrato de amonio	1 560, 00
	Nitrato de potasio	1 900, 00
SULFATOS	Sulfato de magnésio	370, 00
	Sulfato de magnésio	16,90
	Sulfato de zinc	8,60
	Sulfato cúprico	0,03
HALOIDES	Cloruro de potasio	440,00
	Yoduro de potasio	0,83
	Fosfato de potasio	170,00
P, B, Mo	Ácido bórico	6,20
	Molibdato de sodio	0,25
Na, Fe, EDTA	Sulfato ferroso	27,80
	Ácido Etildiaminotetraacetico	37,30

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

2.8. Reguladores de Crecimiento.

2.8.1. Auxinas.

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo "*in vitro*" las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). Él IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento (Jácome, 2013).

2.8.2. Citoquininas.

Las funciones destacables de las citoquininas son la estimulación de la división celular, la inhibición de desarrollo de raíces laterales, el rompimiento de la latencia de yemas axilares, retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales y promueven la organogénesis en los callos celulares, (Roca, 1991; Roca y Mroginski 1993). Las citoquininas más utilizadas se encuentran la bencil amino purina (BAP), 2 isopentil adenina (2IP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg/L, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (Murashige y Skoog, 1962).

Para estimular una proliferación de tejidos en los cultivos se utiliza frecuentemente una baja concentración de citoquininas, por el contrario, si se utiliza una elevada concentración, se favorece a la proliferación *in vitro* de meristemos axilares en cultivo de ápices y para reprimir la obtención de macollos de yemas, si se utiliza una concentración moderada de citoquininas, esta favorece a la formación de nuevas yemas sobre callos (Margara, 1998).

2.8.3. Giberelinas.

Su nombre proviene del hongo Gibberella fujikuroi de donde fueron extraídas originalmente. El ácido giberélico fue la primera de esta clase de hormona en ser descubierta. Son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo (Raisman, 1999).

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 giberelinas especialmente el AG_3, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemos caulinares de varias especies vegetales (Roca, 1991; Roca y Mroginski, 1993).

2.9. Vitaminas.

La vitamina que se ha demostrado consistentemente como más importante dentro de un medio de cultivo es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizados con frecuencia para estimular procesos específicos: biotina, acido nicotínico, piridoxina, riboflavina (Abdelnour y Escalant, 1994).

En muchos cultivos resulta beneficioso el mio-inositol, a razón de 100 ppm, entre otros compuestos benéficos se encuentra el ácido pantoténico (0.1 ppm) y la biotina (0.1 ppm). Todos estos materiales son solubles en agua y se deben preparar como soluciones concentradas (Hartman, 1997).

2.10. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos "*in vitro*".

2.10.1. El inóculo o explante.

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc., excisado del material parental para iniciar el cultivo in vitro. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, este variaría de acuerdo al objetivo perseguido. En general, factores como el genotipo, edad de la planta, y su estado fisiológico son importantes de considerar.

2.10.2. Factores físicos.

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

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

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

2.11. Cultivo de callos.

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

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

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

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

2.12. Oxidación fenólica.

Según Preece y Compton (1991), la oxidación fenólica es un aspecto común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una herida. La oxidación fenólica suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido y generalmente precede a la inhibición del crecimiento y, en los casos graves, a la necrosis y muerte del tejido.

2.12.1. Oxidación fenólica en cultivo de tejidos

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

- Es reportado en un amplio rango de vegetales.
- Es más agudo en las especies leñosas.
- Constituye en múltiples ocasiones una seria dificultad para el establecimiento de los cultivos *in vitro.*

.

2.12.2. Daños provocados al explante por oxidación fenólica.

Según Hu y Wang (1983) son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación, debido a que después de oxidados se convierten a la vez en fuertes agentes oxidantes.

Estos compuestos oxidados son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática, lo cual puede resultar en un oscurecimiento letal de los explantes.

2.13. Estructuras de *Novo.*

Según Aguilera (2012) se considera estructura de *Novo* al brote adventicio que se obtiene de una célula callogénica en base a la totipotencia celular (potencial para regenerar una nueva planta completa).

2.14. Estudios similares.

Gonzales (2017) realizó estudios para la "Inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis L.,* a nivel de laboratorio en la provincia de Loja" iniciando con la fase de implantación (desinfección y germinación), en donde utilizó el medio de cultivo basal de MS (Murashige y Skoog, 1962), agregando diferentes reguladores de crecimiento. Para el ensayo de desinfección de semillas se aplicó hipoclorito de sodio al 50 % (NaClO) y peróxido de hidrogeno al 2 % (H_2O_2) en dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos), donde la utilización de 50 % de NaClO y 2 % de H_2O_2 durante 5 y 10 minutos respectivamente, controlaron eficientemente la contaminación (0,0%). Por otra parte, el efecto de desinfección con NaClO 50 % y H_2O_2 2 % durante 5 minutos, más la adición de 1,0 mg/l de AG_3 al MS líquido, resultó efectivo sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., obteniendo resultados del 86,67 % y 80 % de germinación respectivamente

Para la fase de inducción de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., los explantes se cultivaron en medio de MS sólido, suplementados con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: 2, 4-D en concentraciones de 1,0; 2,0 y 3 mg/l, y BAP en una concentración de 0,5 mg/l. Se observó que la combinación de dos sustancias de reguladores de crecimiento es necesaria para la obtención de mejores porcentajes de

formación de callo. Así, con el uso solo de auxinas, se obtuvo un 51,67 % de formación de callos con una concentración de 1 mg/l de 2.4-D (T1). La combinación de auxinas y citoquininas resultó ser la más efectiva, obteniéndose 65 % de formación de callos con la combinación de 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP (T4); los resultados dependieron de la concentración de auxina/citoquinina empleada.

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

Es importante mencionar que existe poca información acerca de investigaciones sobre el cultivo de tejidos para la inducción a callos y estructuras de *Novo*, por lo que, es necesario el desarrollo de trabajos de investigación que permitan conocer diferentes experiencias en tejidos a nivel *in vitro.*

3. METODOLOGÍA.

3.1. Ubicación del área de estudio.

3.1.1. Fase de campo.

La fase de campo se ejecutó en los sitios de: Uritusinga (Cantón Catamayo), y Zamora Huayco (Loja) (Figura 3); sitios en los que se recolectó material vegetal necesario de los individuos previamente seleccionados y codificados de cada sitio (Cuadro 2).

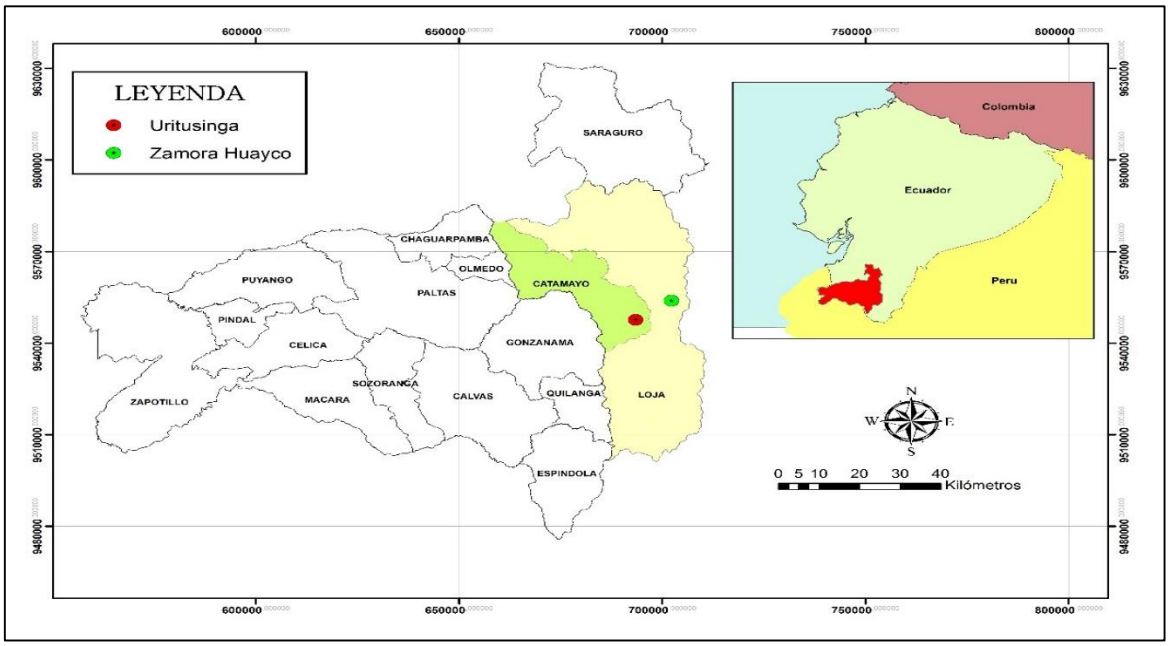

Figura 3. Mapa de ubicación de sitios de muestreo (Uritusinga y Zamora Huayco)

Cuadro 2. Ubicación de los sitios de estudio en la provincia de Loja.

Sitio	Ubicación	Código del árbol
Uritusinga	Catamayo	UrA5
Zamora Huayco	Loja	ZHA2

Las semillas colectadas en cada sitio fueron llevadas al Laboratorio de Micropropagación Vegetal debidamente codificadas, donde se realizó su limpieza y selección en base a características fenotípicas como: forma, tamaño, color y condiciones fitosanitarias.

3.1.2. Fase de Laboratorio.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional

de Loja, lugar donde se ejecuta el proyecto marco de investigación **"Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja",** del cual es parte el presente trabajo de tesis y donde se establecieron los ensayos *in vitro* para la formación de callos y estructuras de *Novo* a partir de explantes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L (Figura 4).

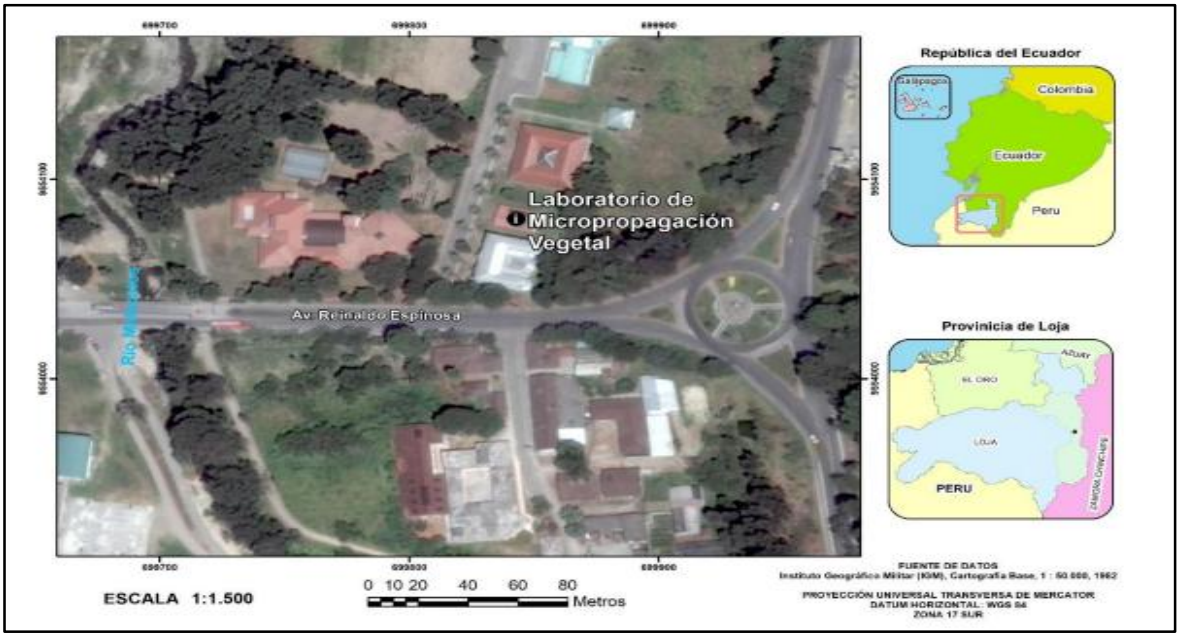

Figura 4. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación vegetal de la Universidad Nacional de Loja

3.2. Metodología para probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

3.2.1. Germinación *"in vitro"* de semillas de *Cinchona officinalis* L, provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

El medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas fue el de Murashige & Skoog (MS-1962) líquido, suplementado con vitaminas (1 mg/l de tiamina y 100mg/l mio-inositol), y sacarosa como fuente de carbohidratos al 2%.

El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N respectivamente. Finalmente se vertió en tubos de ensayo y se esterilizó en la autoclave, juntamente con los materiales necesarios para la siembra.

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 50% por un lapso de 3 minutos, seguidamente se realizaron tres enjuagues. La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar, a razón de dos semillas de *Cinchona officinalis* L., por tubo de ensayo, finalmente se etiquetó y codificó cada tubo de ensayo de acuerdo con su lugar de procedencia (Uritusinga A5; Zamora Huayco A2) y se colocaron en el cuarto de incubación (Figura 5).

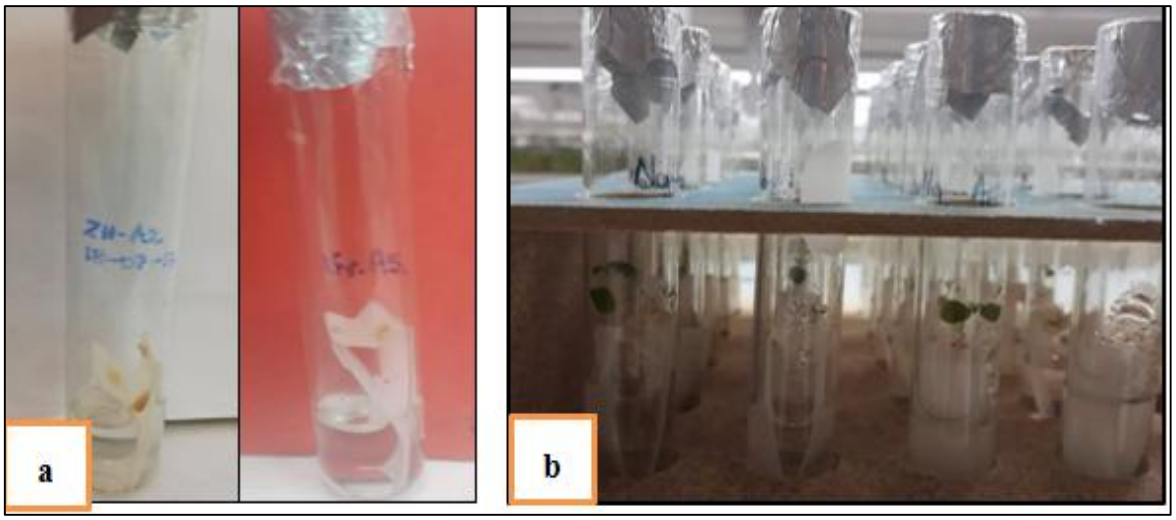

Figura 5. a) Siembra de semillas de *Cinchona officinalis* L., b) Germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L.

3.2.2. Obtención de explantes para la formación de callos.

3.2.2.1. Fase de brotamiento de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

Una vez obtenidas las vitroplantas de *Cinchona officinalis* L, antes de pasar a la fase de formación de callos fue necesario trabajar en una fase intermedia denominada fase de brotamiento, la cual nos permitió obtener suficiente material vegetal para proceder a la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L., para lo cual, se aplicó el mejor tratamiento para brotamiento obtenido por Chamba (2017) en su investigación "Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas en la Argelia -Loja"; en donde el mejor tratamiento estuvo compuesto de 0,5 mg/l ANA + 2,5 mg/l BAP (Figura 6).

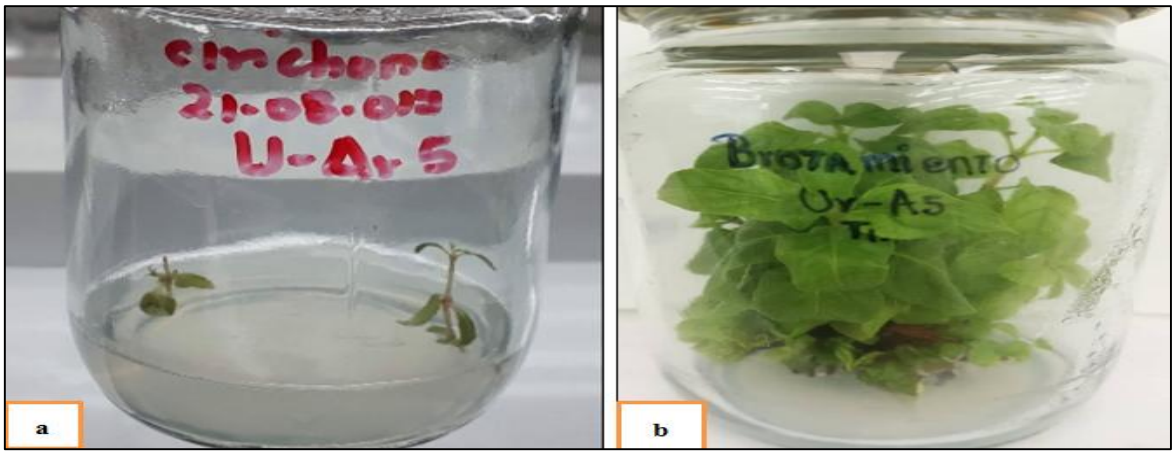

Figura 6. a) Siembra de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L; b) Fase de brotamiento de *Cinchona officinalis* L

3.2.3. Fase de formación de callos.

3.2.3.1. Preparación del medio de cultivo para la formación de callos para material proveniente de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

El medio de cultivo estuvo constituido por sales minerales MS (Murashige & Skoog), suplementado con Thiamina 5 mg/l y Mio- Inositol 100mg/l, sacarosa como fuente de carbohidratos al 3.0%, agar 0.6%, ANA (ácido naftalenacético) y BAP (Bencil amino purina) en diferentes concentraciones como se muestra en la figura 7 y cuadro 3. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCL o NaOH 1N.

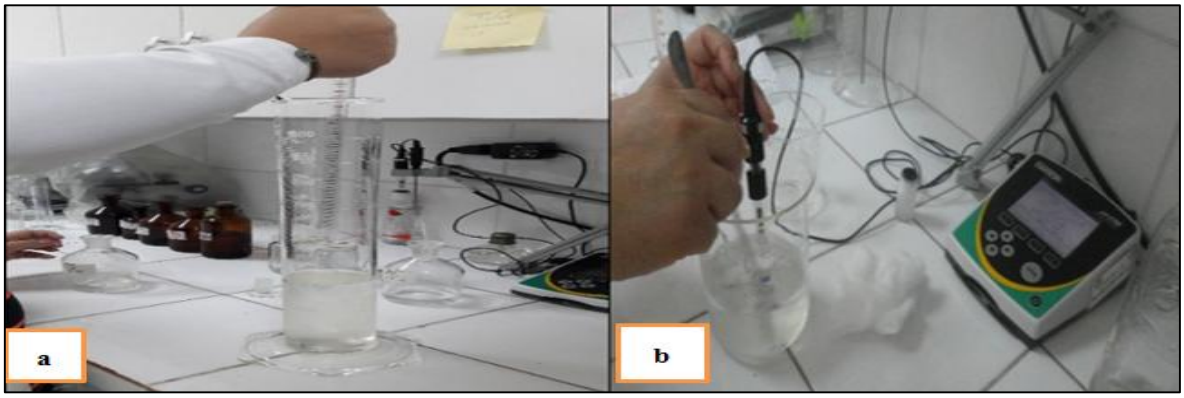

Figura 7. a) Preparación medio de cultivo MS sólido/fase callos; b) ajuste de pH.

Cuadro 3. Concentraciones hormonales auxina citoquinina para la formación de callos de *Cinchona officinalis* L

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/l)	
	ANA	**BAP**
T1	1,0	0,0
T2	2,0	0,0
T3	1,0	0,5
T4	2,0	0,5

Una vez terminada la preparación del medio de cultivo, este fue distribuido en 120 frascos de vidrio a razón de 30 ml/frasco, luego se esterilizaron en la autoclave a 120 ºC a una temperatura y 1,5 kg/cm^2 de presión, durante 20 minutos.

Es importante mencionar que el número de tratamientos utilizados en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, estuvo en función de la disponibilidad de material vegetal recolectado de cada uno de los sitios de estudio. Por lo tanto, para este objetivo se realizaron cuatro tratamientos (Cuadro 3).

3.2.3.2. Inoculación o siembra "*in vitro*" de explantes.

La inoculación "*in vitro*" de los explantes de *Cinchona officinalis* L. se realizó en la cámara de flujo laminar garantizando condiciones de total asepsia; en donde, se trabajó con ápices caulinares y segmentos nodales; para lo cual, se diseccionaron segmentos de hojas que incluyeron parte del pecíolo segmentado, a razón de 2 explanes/frasco (Figura 8). El instrumental de disección fue bisturí, pinza, tijeras y cajas petri previamente esterilizadas.

Cabe señalar, que al trabajar con vitroplantas asépticas no fue necesario aplicar protocolos de desinfección al material vegetal utilizado.

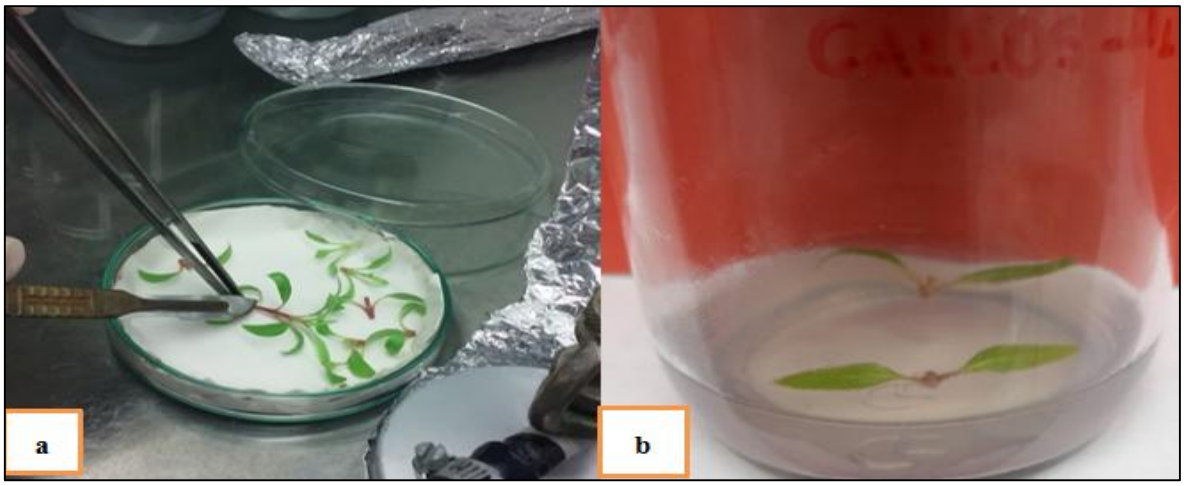

Figura 8. a) Disección de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L; b) Inoculación de explantes

Posteriormente se trasladaron los frascos debidamente etiquetados, al cuarto de incubación para su desarrollo, manteniéndolos a una temperatura constante de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.2.4. Diseño experimental para la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con una distribución factorial (4 X 3), 4 tratamientos y 3 repeticiones por unidad experimental. El cuadro 4 muestra la interacción de auxinas – citoquininas empleadas en la inducción de callos a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, mientras que en el cuadro 5 se exponen los tratamientos evaluados.

Cuadro 4. Interacción de auxinas – citoquininas para la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

Factores	Concentraciones
Nivel de concentración de Auxinas (ANA)	1,0
	2,0
Nivel de concentración de Citoquininas (BAP)	0,0
	0,5

Cuadro 5. Tratamientos evaluados en la interacción de auxina-citoquinina para la formación de callos de *Cinchona officinalis* L

Tratamientos	Descripción	Código
T1	1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP	**A1B1**
T2	2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP	**A1B2**
T3	1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP	**A2B1**
T4	2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP	**A2B2**

3.2.4.1. Especificaciones del diseño experimental.

Unidad experimental (Conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	12
Número total de explantes por frasco	2
Numero de explantes por unidad experimental	10
Numero de frascos por tratamiento	60
Número total de explantes por ensayo.	120

3.2.3.2. Hipótesis del modelo.

Ho. La combinación de diferentes concentraciones de auxinas - citoquininas no influyen en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

H1. La combinación de diferentes concentraciones de auxinas - citoquininas influyen en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

3.2.3.3. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

Para evaluar el efecto de la combinación de las diferentes concentraciones hormonales de auxinas ANA y citoquininas: BAP en la fase de formación de callos, de las diferentes

variables evaluadas, se utilizó el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al., 2017); se realizó un análisis de varianza (ANOVA); y la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas entre las medias y varianzas de cada tratamiento utilizado y así, poder determinar si existen diferencias significativas en lo que respecta al sitio de colecta.

3.2.5. Parámetros evaluados.

La evaluación se efectuó a través de observación directa durante 60 días para el sitio de Uritusinga, ya que los explantes utilizados mantenían buenas condiciones fenotípicas y el medio de cultivo se encontraba en condiciones óptimas y adecuadas para el desarrollo del mismo; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco las evaluaciones se realizaron durante 55 días, tiempo en el cual los explantes utilizados comenzaron a perder su viabilidad presentando indicios de contaminación y oxidación fenólica, por ende fue necesario el término de su evaluación.

Cada uno de la evaluación se realizaron 5 días después de realizada la inoculación de explantes de *Cinchona officinalis* L. Las variables evaluadas fueron:

- Número de callos por explante
- Número de días a la formación de callos
- Porcentaje de contaminación
- Porcentaje de mortalidad
- Color del callo.
- Porcentaje de oxidación.
- Friabilidad del callo

La toma de datos se realizó aplicando el formato detallado en el cuadro 6.

Cuadro 6. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L

Sitio de colecta:														
Fecha de siembra:														
# de explantes:														
Sitio	**N° de árbol**	**Tratamiento**	**Repetición**	**N° Frasco**	**N° Explante**	**N° días a la formación de callos (%)**							**Color**	**Friabilidad**
						5	**10**	**15**	**20**	**25**	**..**	**n**		
		Tn	R1	1	E.1									
					E.2									
				2	E.1									
					E.2									
				3	E.1									
					E.2									

FORMACIÓN DE CALLO	**COLOR**	**FRIABILIDAD**
0%: Sin formación **25%:** Pobre (callo en ¼ del explante) **50%:** Regular (callo en ½ explante) **75%:** Bueno (callos en ¾ del explante) **100%:** Muy bueno (callo formado en todo el explante)	**Crema** **Carmelita - Marrón**	**F:** Friable **NF**: No friable

Fuente: Proyecto *Cinchona* – LMV y Autora, 2018.

3.3. Metodología para determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

3.3.1. Selección de material vegetal.

El material vegetal utilizado en la fase de formación de brotes de *Novo* fueron las mejores formaciones callosas de cada uno de los tratamientos evaluados en el objetivo anterior, tomándose en cuenta su tamaño, color, y estructura (Figura 9).

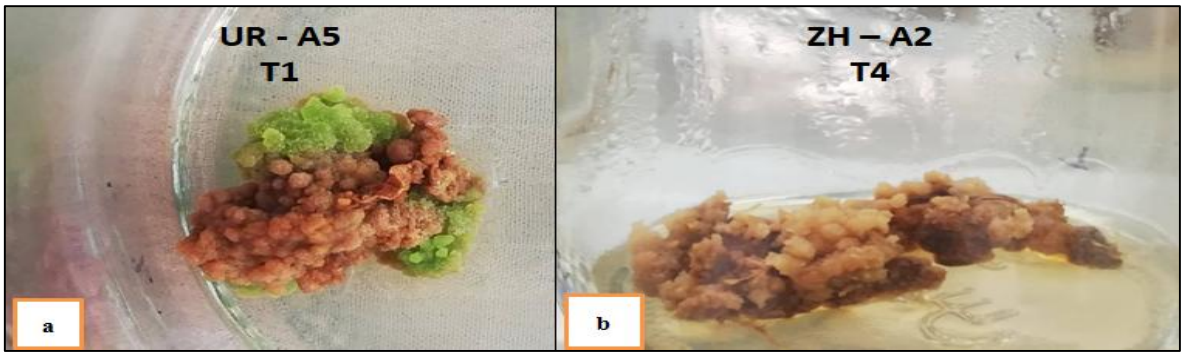

Figura 9. Obtención de material vegetal a ser utilizado en la fase de formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L. a) Sitio Uritusinga; b) Sitio Zamora Huayco.

3.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido.

El medio de cultivo estuvo constituido por sales minerales de Murashige & Skoog (MS), suplementado con Thiamina 5 mg/l y Mio- Inositol 100mg/l, sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar 0.6 %, (Figura 10); ANA (ácido naftalenacético) y BAP (bencil amino purina) en diferentes concentraciones cada una, como se muestra en el cuadro 7.

Figura 10. Preparación medio de cultivo sólido MS para la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Es importante mencionar que el número de tratamientos evaluados en la fase de formación de estructuras de *Novo* en cada uno de los ensayos establecidos, tanto para el sitio de Uritusinga como para el sitio de Zamora Huayco estuvo en función de la disponibilidad de material vegetal obtenido de la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L. Por lo tanto, para este objetivo se realizaron tres tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones hormonales auxina-citoquinina para la formación de estructuras de N*ovo* de *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/l)	
	ANA	**BAP**
T1	0,3	1,0
T2	0,6	1,5
T3	0,9	2,0

El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCL o NaOH 1N. Una vez terminada la preparación del medio de cultivo fue distribuido en 90 frascos de vidrio a razón de 30 ml/frasco; finalmente el medio fue esterilizado en el autoclave a 120 ºC de temperatura y 1,5 kg/cm2 de presión, durante 20 minutos, al igual que el material de disección necesario para la inoculación.

3.3.3. Inoculación "*in vitro*" de los callos.

La inoculación "*in vitro*" de callos para la formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L. se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de total asepsia, con la ayuda de cajas petri, bisturí, y pinzas; cada callo obtenido de *Cinchona officinalis* L, fue diseccionado en 4 partes iguales, cada sección constituyó un explante, para la inoculación se utilizaron dos explantes por frasco (Figura 11).

Posteriormente, fueron sometidos a un proceso de incubación, donde se los mantuvo a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Figura 11. Disección e inoculación de callos a ser utilizados en la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

3.3.4. Diseño experimental para la formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en un arreglo trifactorial 3 x 3 (3 tratamientos y tres repeticiones) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tratamientos evaluados para el efecto de la interacción auxina-citoquinina en la fase de formación de Estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Descripción	Código
T1	0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP	A1B1
T2	0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP	A1B2
T3	0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP	A1B3

3.3.4.1. Especificaciones del diseño experimental.

Unidad experimental (Conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	3
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	12
Número total de explantes por frasco	2
Número de explantes por unidad experimental	10

Número total de frascos del ensayo	45
Número total de explantes por ensayo.	90

3.3.4.2. Hipótesis del modelo.

Ho. La aplicación de diferentes concentraciones hormonales no influye en la formación de estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L.

H1. La aplicación de diferentes concentraciones hormonales influye en la formación de estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L.

3.3.4.3. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales de auxinas ANA y citoquininas BAP en la fase de formación de estructuras de brotes de *Novo*, se manipularon los datos de las diferentes variables evaluadas con ayuda del software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al., 2017);donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas entre las medias y varianzas de cada tratamiento utilizado y si existen diferencias significativas en lo que respecta al sitio de colecta.

3.3.5. Parámetros evaluados.

La evaluación se la llevó a cabo por observación directa durante 100 días para el sitio de Uritusinga, el material obtenido de la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, presentó condiciones de asepsia y mayor viabilidad, lo que permitió realizar las evaluaciones durante mucho más tiempo. Mientras que, para el sitio de Zamora Huayco las evaluaciones se realizaron durante 80 días, tiempo en el cual el material vegetal obtenido en la fase anterior comenzó a perder su viabilidad y a mostrar indicios de contaminación y oxidación fenólica.

las variables evaluadas para la fase de formación de estructuras de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L fueron:

- Número de días a la formación de estructuras de *Novo*
- Número de brotes de *Novo* por callo
- Porcentaje de oxidación

- Porcentaje de contaminación
- Porcentaje de mortalidad

Una vez terminada la inoculación de callos para la fase de formación de estructuras de brotes de *Novo* se tomaron registros cada 5 días, a partir de la siembra (Cuadro 9).

Cuadro 9. Hoja de registro para la toma de datos en la fase de formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Sitio de colecta:													
Fecha de siembra:												# Explantes.	
Sitio	**N° árbol**	**Tratamientos**	**Repeticiones**	**N° Frasco**	**N° Explante**	**N° días a la formación de brotes**							**Promedio de brotes**
						5	**10**	**15**	**20**	**25**	**…**	**N**	
					E.1								
				1	E.2								
		Tn	R1		E.1								
				2	E.2								
					E.1								
				3	E.2								

Fuente: Proyecto *Cinchona* – LMV y Autora, 2018.

3.4. Metodología para la difusión y publicación de los resultados de la investigación a actores sociales interesados.

Dada la importancia que representa la generación de información sobre el presente tema en estudio, para la difusión se realizaron varias actividades en el transcurso del desarrollo de la investigación, tales como:

- Socialización del proyecto de tesis al Equipo Técnico y Docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración y publicación del documento de tesis.

4. RESULTADOS.

4.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L.

4.1.1. Porcentaje de formación de callo por explante de *Cinchona officinalis* L. provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

Para el caso de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Uritusinga, al término de 60 días de evaluación el tratamiento T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con 50,83%; mientras que, el tratamiento T1(1,0 mg/l ANA + 0,0mg/l BAP) presentó menor porcentaje de formación de callos con 33,50% (Figura 12 y 13).

Asi mismo, para los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de Zamora Huayco al término de 55 días de evaluación se logró determinar que el tratamiento T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) alcanzó el mayor porcentaje de formación de callo con 70%; y, el tratamiento T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) presentó el menor porcentaje de formación de callos con 22,50 (Figura 12 y 13).

Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se observó que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos, tanto para el sitio de Uritusinga (Cuadro 10), como para el sitio de Zamora Huayco (Cuadro 11).

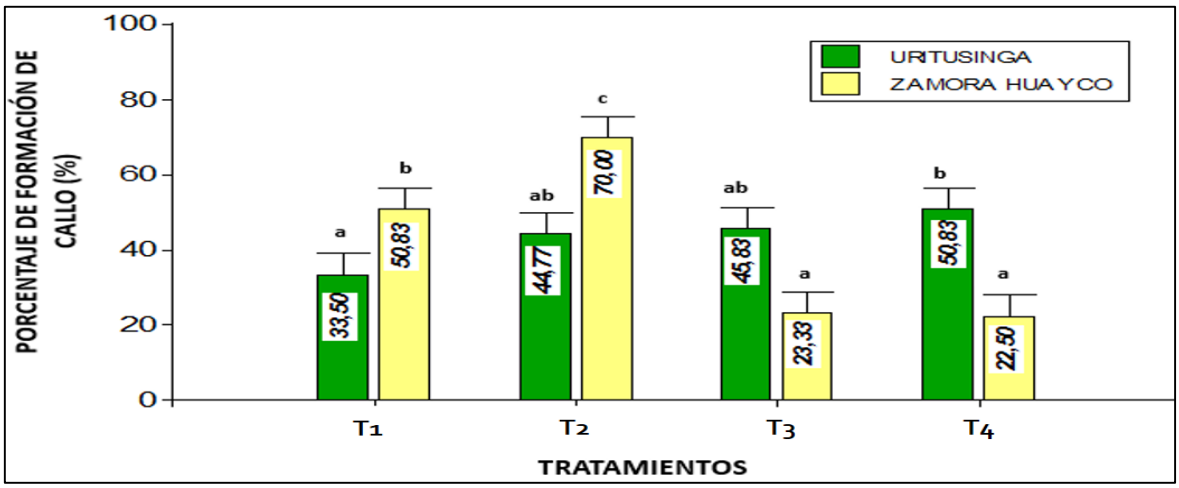

Figura 12. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de dos sitios de estudio.

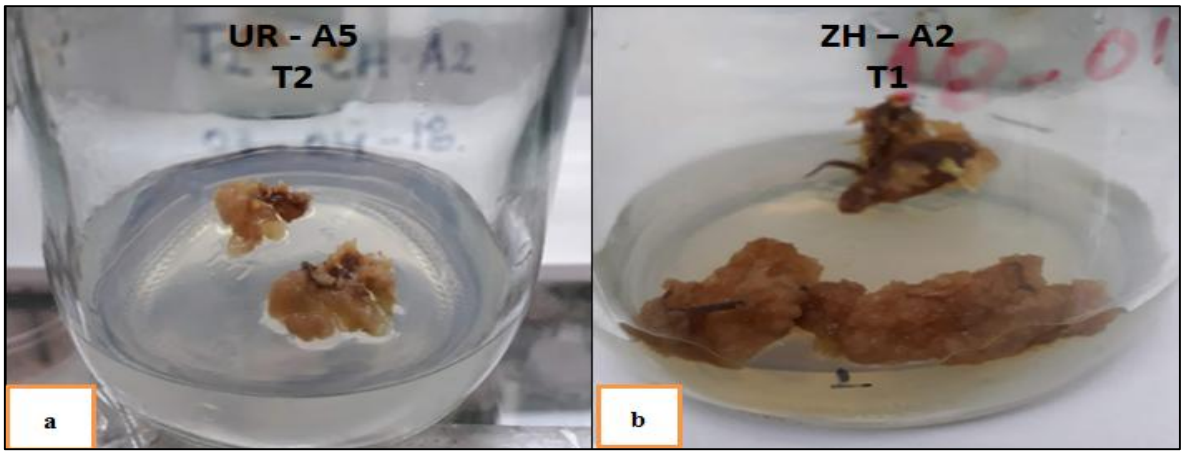

Figura 13. Formación de callos de *Cinchona officinalis* L, de dos sitios de estudio: a) Uritusinga; b) Zamora Huayco.

Cuadro 10. Resultados estadísticos obtenidos de la variable porcentaje de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga

ANÁLISIS DE VARIANZAS					
Variable		**N**	**CV**		
% formación de callo		120	70,57		
FUENTE DE VARIACIÓN	**SC**	**GL**	**CM**	**F**	**p-valor**
MODELO	7489,17	3	1596,39	1,69	0,0173
TRAT	7489,17	3	1596,39	1,69	0,0173
ERROR	1097,20	116	945,86		
TOTAL	114509,17	119			
TEST: LSD FISHER					
Tratamientos	**Medias**	**N**	**E.E.**	**Rangos**	
T1	33,5	30	5,62	A	
T2	44,77	30	5,62	AB	
T3	45,83	30	5,62	AB	
T4	50,83	30	5,62	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,05)					
***LSD FISHER**: Least significant difference (Diferencia menos significativa):					
SC: Suma de cuadrados	**E.E:** Error estándar		**N**: Número		
GL: Grados de libertad	**CM:** Cuadrado medio				
CV: Coeficiente de Variación	**F:** Estadístico F				

Cuadro 11. Resultados estadísticos obtenidos de la variable porcentaje de formación de callos de *Cinchona officinalis* L., del sitio Zamora Huayco.

ANÁLISIS DE VARIANZAS					
Variable		**N**	**CV**		
% formación de callo		120	73,56		
FUENTE DE VARIACIÓN	**SC**	**GL**	**CM**	**F**	**p-valor**
MODELO	47708,33	3	1502,78	16,93	0,0001
TRAT	47708,33	3	1502,78	16,93	0,0001
ERROR	108958,33	116	93930,86		
TOTAL	156666,67	119			
TEST: LSD FISHER					
Tratamientos	**Medias**	**N**	**E.E.**	**Rangos**	
T1	50,83	30	5,6	A	
T2	70	30	5,6	A	
T3	23,33	30	5,6	B	
T4	22,5	30	5,6	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)					
***LSD FISHER**: Least significant difference (Diferencia menos significativa):					
SC: Suma de cuadrados	**E.E:** Error estándar			**N**: Número	
GL: Grados de libertad	**CM:** Cuadrado medio				
CV: Coeficiente de Variación	**F:** Estadístico F				

También, es importante mencionar que se determinó el mayor porcentaje promedio de formación de callos para los sitios de estudio (Uritusinga y Zamora Huayco), en donde el T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) presentó el 57.39%; mientras que, el tratamiento que obtuvo el menor porcentaje promedio de formación de callo fue el T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) con un 34,58%.

4.1.2. Número de dias a la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Uritusinga.

La formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L, para el sitio de Uritusinga se presentó 10 días después del establecimiento del ensayo, en donde los explantes fueron expuestos a diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas; finalmente, se lograrón estabilizar a los 60 dias de evaluación, al someter los resultados al

análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se observó que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos. (Figura 14 y 15).

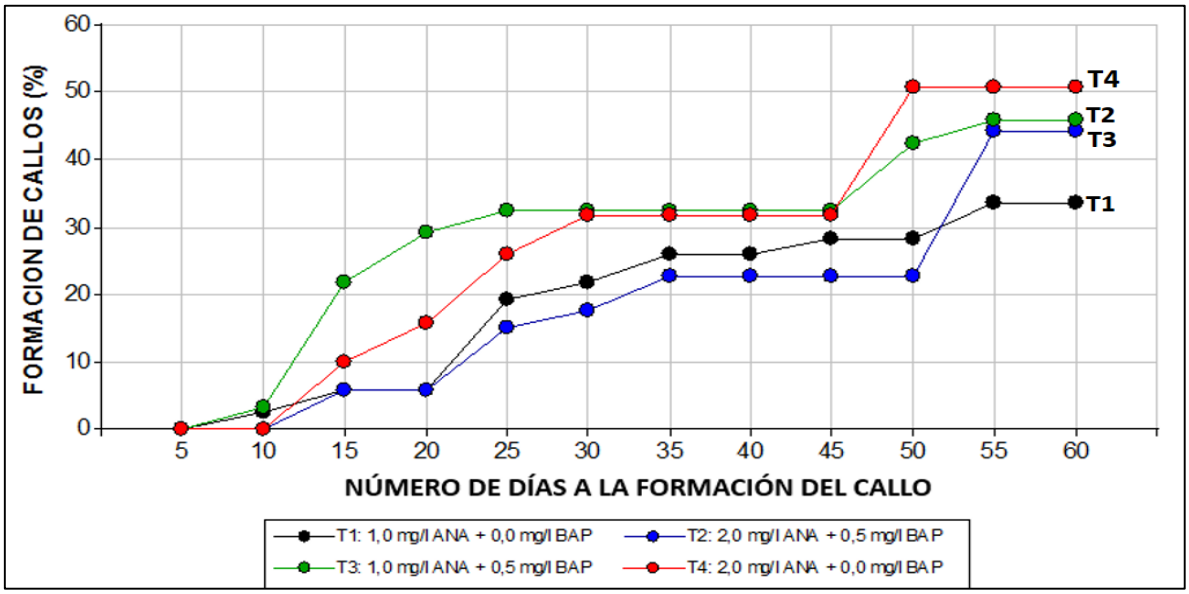

Figura 14. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

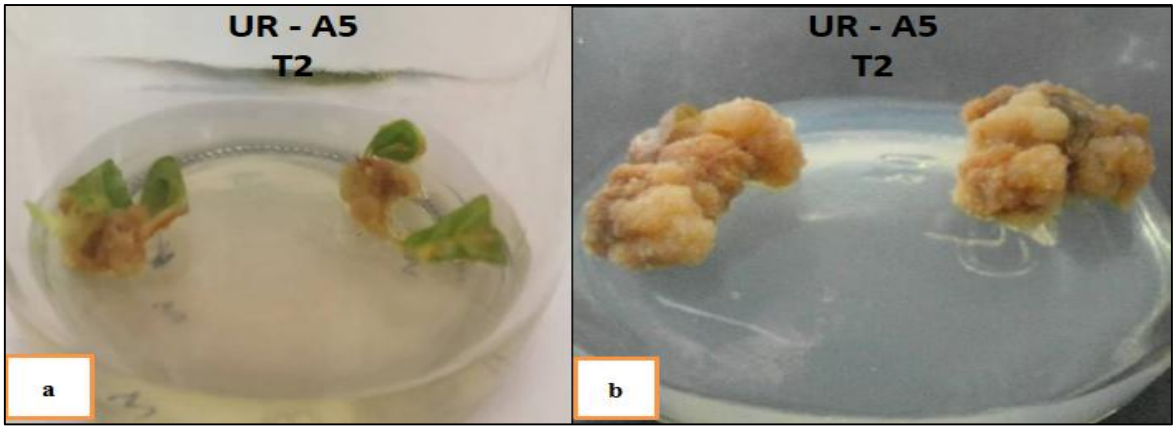

Figura 15. Fase de formación de callos; a) Primeros 15 días de evaluación; b) Valoración final (60 días) en la formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.1.3. Número de días a la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Zamora Huayco.

Para explantes de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Zamora Huayco, la fase de formación de callos, al igual que el caso anterior, se evidenció a partir de los 10 dias de evaluación para los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0mg/l BAP), T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP).

Las evaluaciones indicaron que la formación de callo se estabilizó a los 55 dias en todos los tratamientos (Figura 16 y 17).

Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se observó que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos.

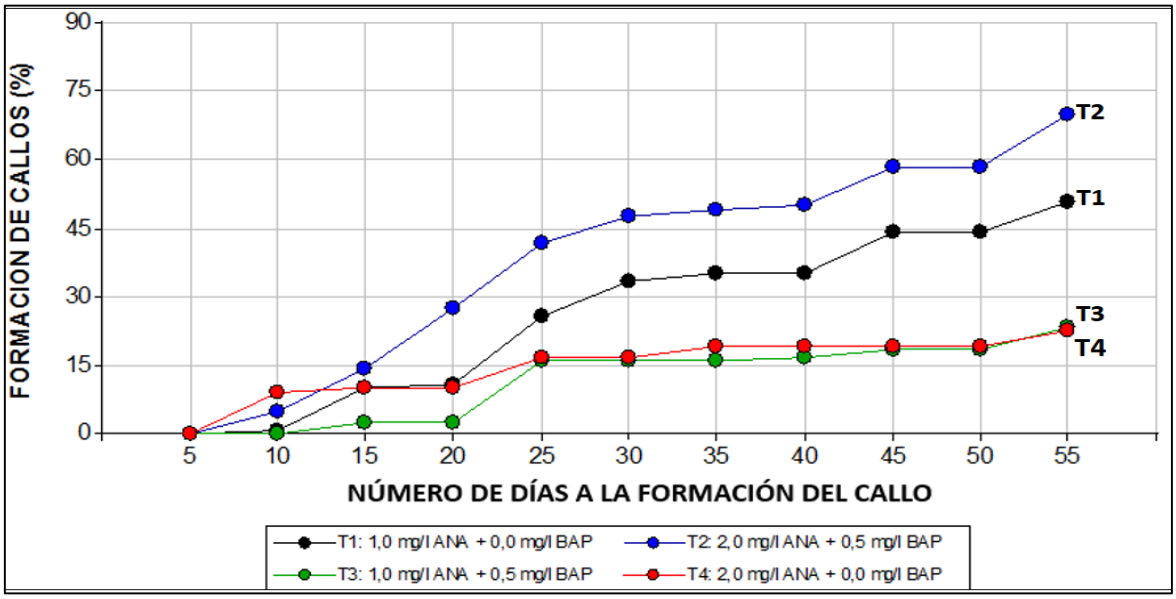

Figura 16. Número de días a la formación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco

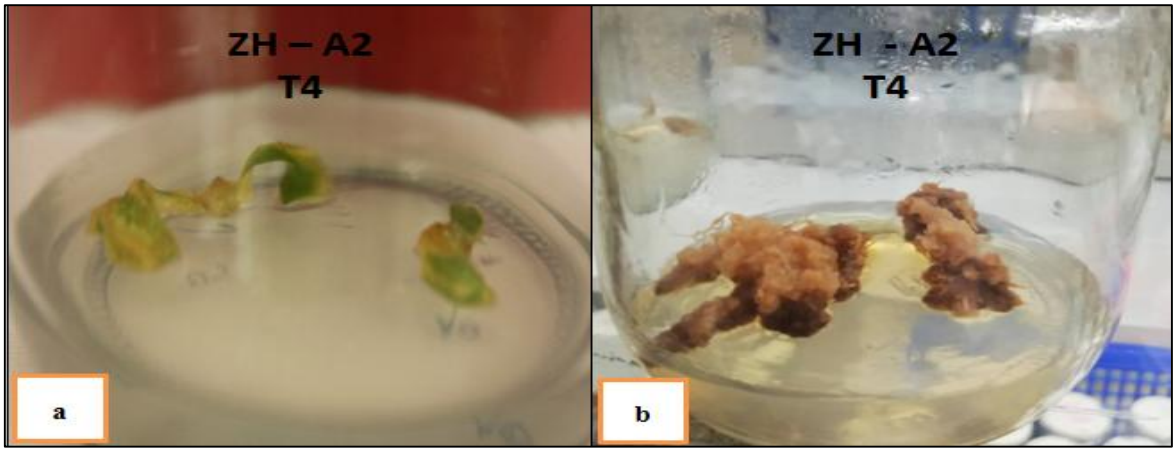

Figura 17. Fase de formación de callos; a) Primeros días 10 de evaluación; b) valoración final (55 días) en la formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

Es importante mencionar que, durante los días de evaluación de la fase de formación de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L, se logró observar la aparición de brotes, más no la formación de callo dando paso a regeneración por organogénesis directa (Figura 18)

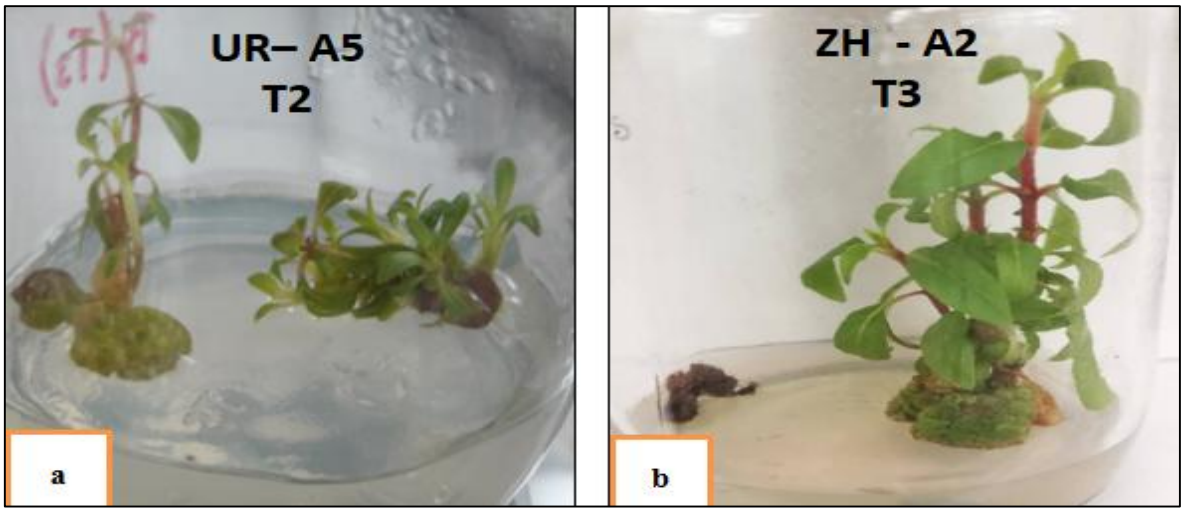

Figura 18. Organogénesis directa durante la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L. a) Sitio Uritusinga; b) Sitio Zamora Huayco.

4.1.4. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Uritusinga.

En la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, para el sitio de Uritusinga, el porcentaje de contaminación que se registró para los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) , y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) fue de 3,33% respectivamente; mientras que, el T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) no presentó contaminación durante la evaluación (Cuadro 12).

Al aplicar el análisis estadístico se determinó que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 19).

Cuadro 12. Número de explantes contaminados por cada tratamiento evaluado de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

Tratamientos	N° Explantes	N° Explantes contaminados	% Contaminación
T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	1	3,33
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	0	0,00
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33

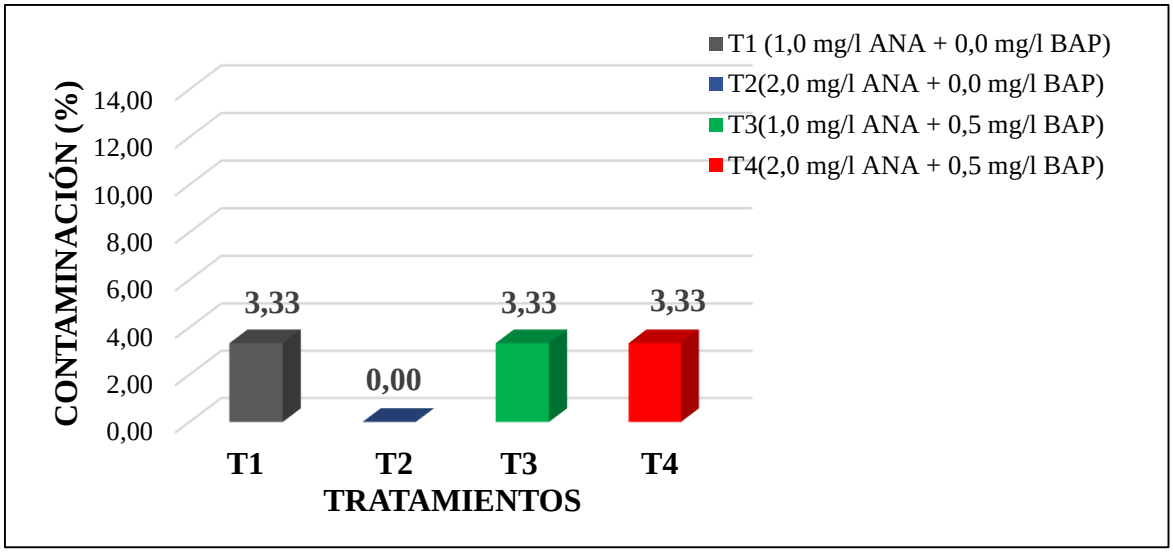

Figura 19. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.1.5. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Zamora Huayco.

Para el caso de Zamora Huayco, el porcentaje de contaminación para los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), y T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) fue de 3.33 %; mientras que, el T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) no presentó contaminación alguna durante los días de evaluación (Cuadro 13). Al someter los datos al análisis estadístico, se logró determinar que si existió diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 20).

Cuadro 13. Número de explantes contaminados por cada tratamiento evaluado de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

Tratamientos	N° Explantes	N° Explantes contaminados	% Contaminación
T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	1	3,33
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	1	3,33
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	0	0

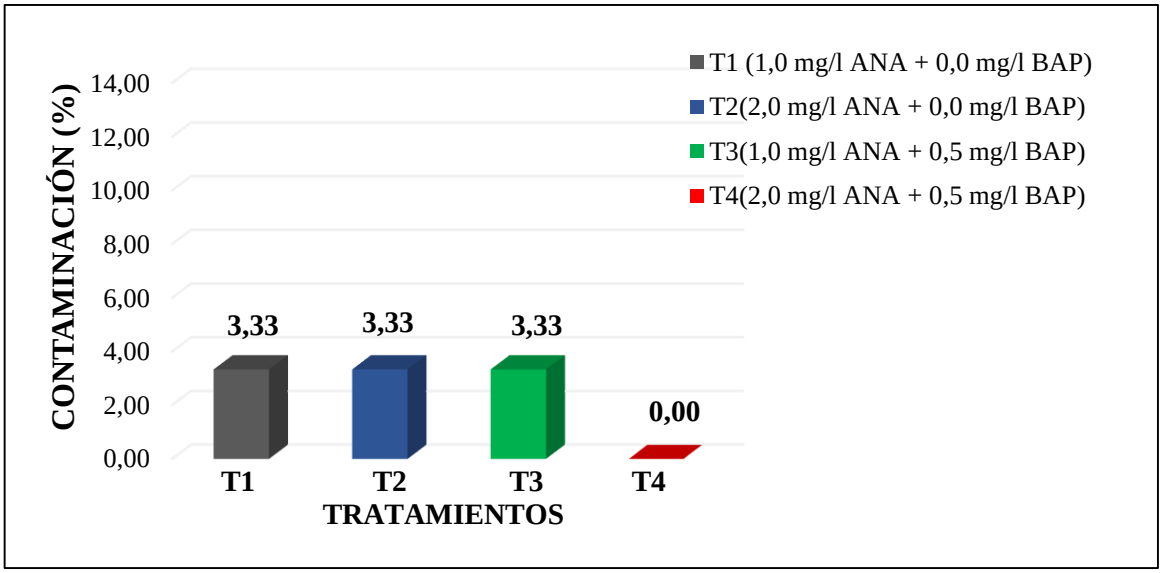

Figura 20. Porcentaje de contaminación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.1.6. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro* provenientes del sitio Uritusinga.

En cuanto a la variable porcentaje de oxidación, de los explantes provenientes del sitio Uritusinga el T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) obtuvo el mayor porcentaje con el 13,33%, seguido del T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) con un porcentaje de oxidación equivalente al 10%; los tratamientos T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) y T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) fueron los que presentaron los menores porcentajes de oxidación con 6.67 % cada uno (Cuadro 14).

Al aplicar el análisis estadístico se determinó que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 21).

Cuadro 14. Número de explantes con oxidación fenólica por cada tratamiento evaluado, del sitio Uritusinga.

Tratamientos	N° Explante	N° Explantes Oxidados	% Oxidación
T1(1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	3	10,00
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	2	6,67
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	2	6,67
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	4	13,33

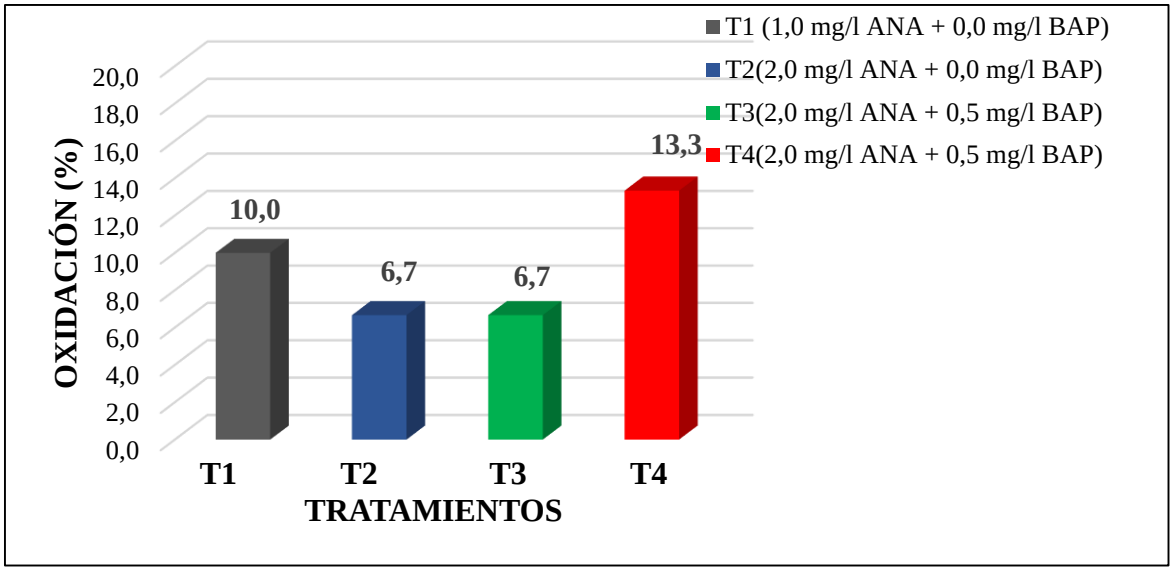

Figura 21. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.1.7. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, provenientes del sitio Zamora Huayco.

Para el sitio de Zamora Huayco el porcentaje de oxidación en el T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) fue 13,33% siendo el tratamiento con mayor número de explantes con oxidación fenólica; finalmente el T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) (6,67%), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) (3,33%), y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) (3,33%), fueron los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de oxidación fenólica (Cuadro 15).

Al someter los datos a un análisis estadístico, se logró determinar que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 22).

Cuadro 15. Número de explantes con oxidación fenólica por tratamiento, del sitio Zamora Huayco.

Tratamientos	N° Total Explantes	N° Explantes Oxidados	% Oxidación
T1(1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	4	13,33
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	2	6,67
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33

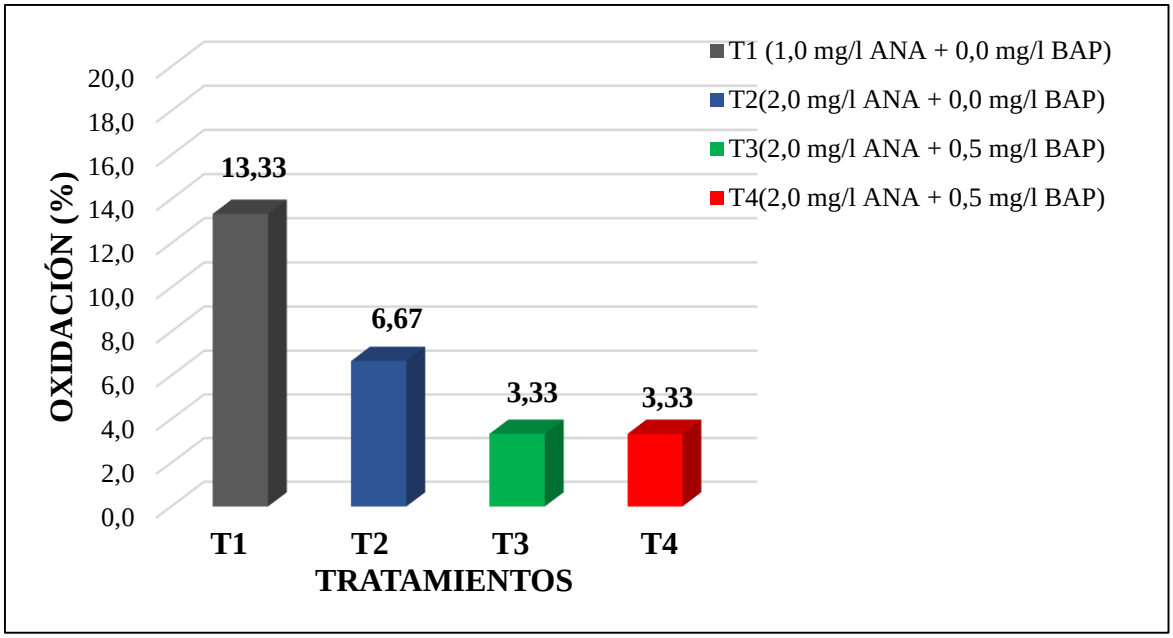

Figura 22. Porcentaje de oxidación de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.1.8. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Uritusinga.

En lo que respecta a la variable porcentaje de mortalidad, el T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de explantes con el 10%; en comparación a los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) , y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) que obtuvieron porcentajes de mortalidad bajos, con 0,00%; 6,67%; y 0,00% respectivamente (Cuadro 16).

Al aplicar el análisis estadístico se determinó que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 23).

Cuadro 16. Registro de mortalidad de explantes durante la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

Tratamientos	N° total de callos	N° Callos muertos	% Mortalidad
T1(1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	0	0,00
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	3	10,00
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	2	6,67
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	0	0,00

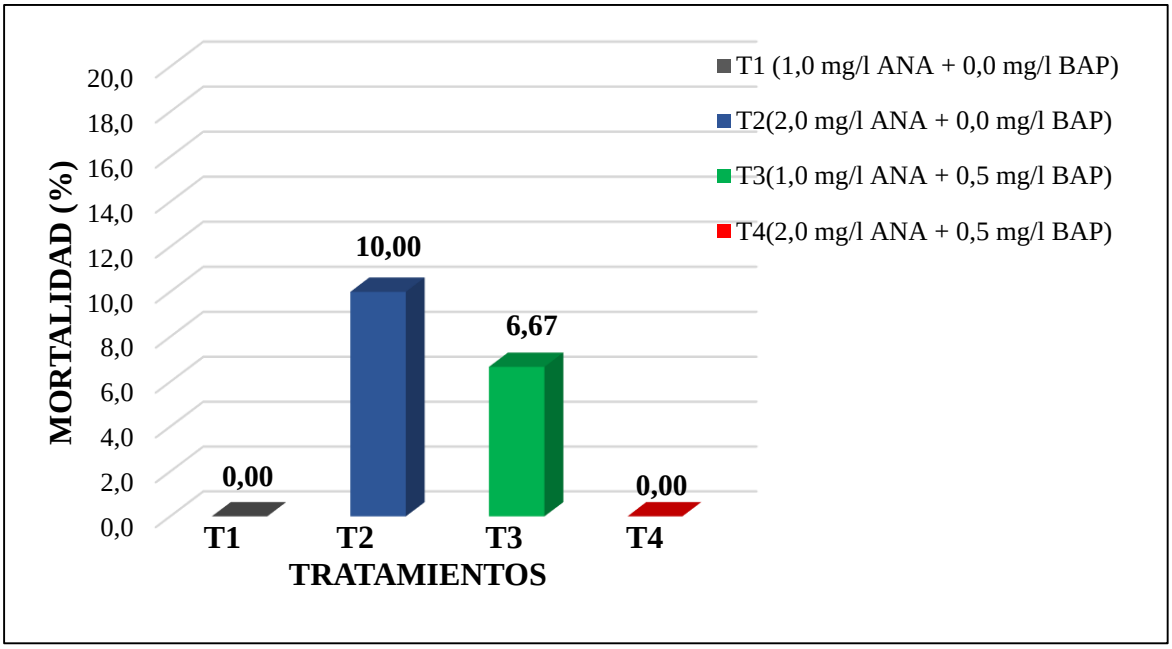

Figura 23. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.1.9. Porcentaje de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L. provenientes del sitio Zamora Huayco.

Para explantes provenientes del sitio Zamora Huayco, los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) y T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) presentaron el mayor porcentaje de mortalidad de callos con el 6,67% cada uno; en contraste con los tratamientos T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP**)** que presentaron los menores porcentajes con el 0,00%; y 3,33% respectivamente (Cuadro 17). Al aplicar el análisis estadístico se determinó que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 24).

Cuadro 17. Registro de mortalidad de explantes de *Cinchona officinalis* L, muertos durante la fase de formación de callos, del sitio Zamora Huayco.

Tratamientos	N° Total de callos	N° Callos muertos	% Mortalidad
T1(1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	2	6,67
T2(2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP)	30	2	6,67
T3(1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	0	0,00
T4(2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP)	30	1	3,33

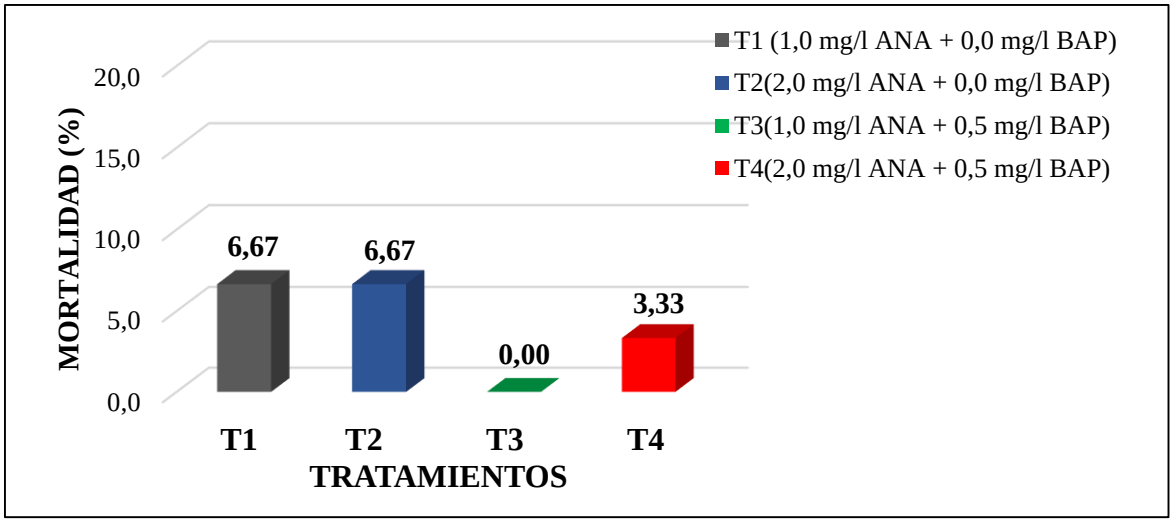

Figura 24. Porcentaje de mortalidad de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.1.10. Color del callo de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Uritusinga

En el cuadro 18, se presentan los registros de la coloración obtenidos en la formación de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L, al término de 60 días de evaluación, para el sitio Uritusinga.

Cuadro 18. Registro de la variable color del callo en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

		Porcentaje de coloración del callo (%)		
Tratamiento	**Explantes que formaron callo**	**Crema**	**Carmelita Marrón**	**TOTAL**
T1	26	46	54	100
T2	25	72	28	100
T3	25	60	40	100
T4	25	52	48	100

En la figura 25 se observa que el T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), fue el tratamiento donde se observó el mayor porcentaje de callos con una coloración crema, durante los 60 días de evaluación, con un porcentaje de 72%; mientras que, los tratamientos T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) , y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) mostraron valores de 46%, 60%, y 52% respectivamente.

Sin embargo, es importante mencionar que existieron callos que a lo largo de la evaluación se tornaron de calor carmelita-marrón, siendo el T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) el tratamiento con mayor porcentaje de callos en pigmentación carmelita-marrón; mientras que,

los tratamientos T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) , T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) mostraron valores de 28, 40%, y 48% respectivamente, con la coloración en mención.

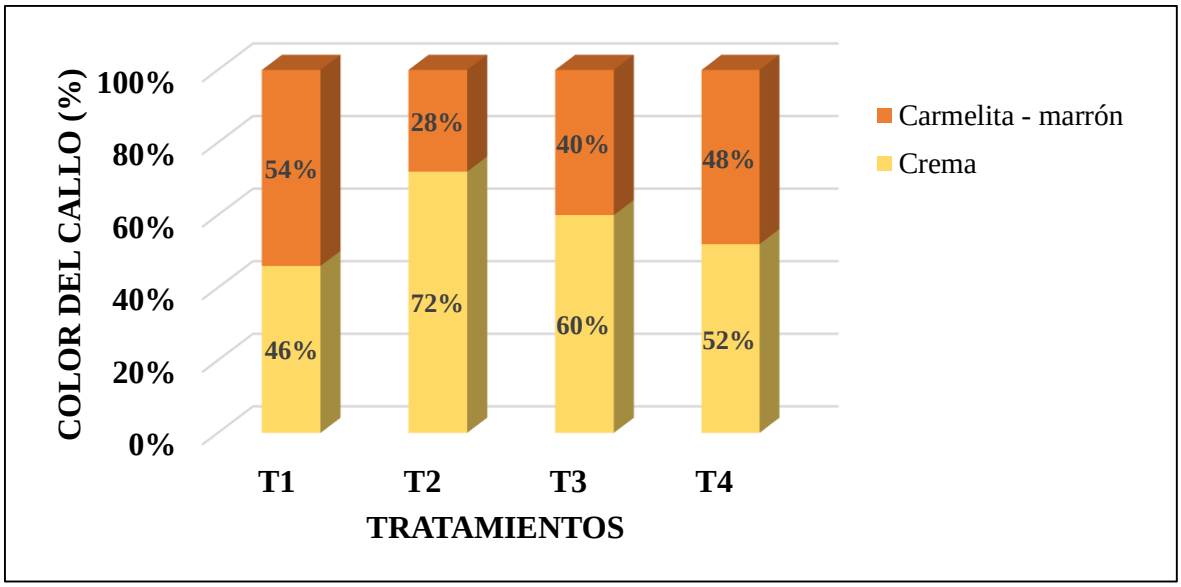

Figura 25. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.1.11. Color del callo de *Cinchona officinalis* L., provenientes del sitio Zamora Huayco.

Para el sitio de Zamora Huayco el T1 (1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de callos de color crema con un 78%; mientras que, los tratamientos T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP), y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) presentaron menor porcentaje de callos con coloración crema con 60%; 64% y 71% respectivamente.

Por otro lado, T2 fue el tratamiento que presentó el mayor número de callos en coloración carmelita-marrón con un 40%, mientras que los tratamientos T1, T3, y T4 lucieron menor porcentaje de callos en coloración carmelita-marrón con 22%; 36%; y 29% respectivamente (Cuadro 19).

Cuadro 19. Registro de la variable color del callo en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

		Porcentaje de coloración del callo (%)		
Tratamientos	**Explantes que formaron callo**	**Crema**	**Café**	**TOTAL**
T1	23	78	22	100
T2	25	60	40	100
T3	28	64	36	100
T4	28	71	29	100

Es importante indicar que, según el análisis estadístico aplicado a los datos de los dos sitios de estudio, se logró determinar que si existió diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 26).

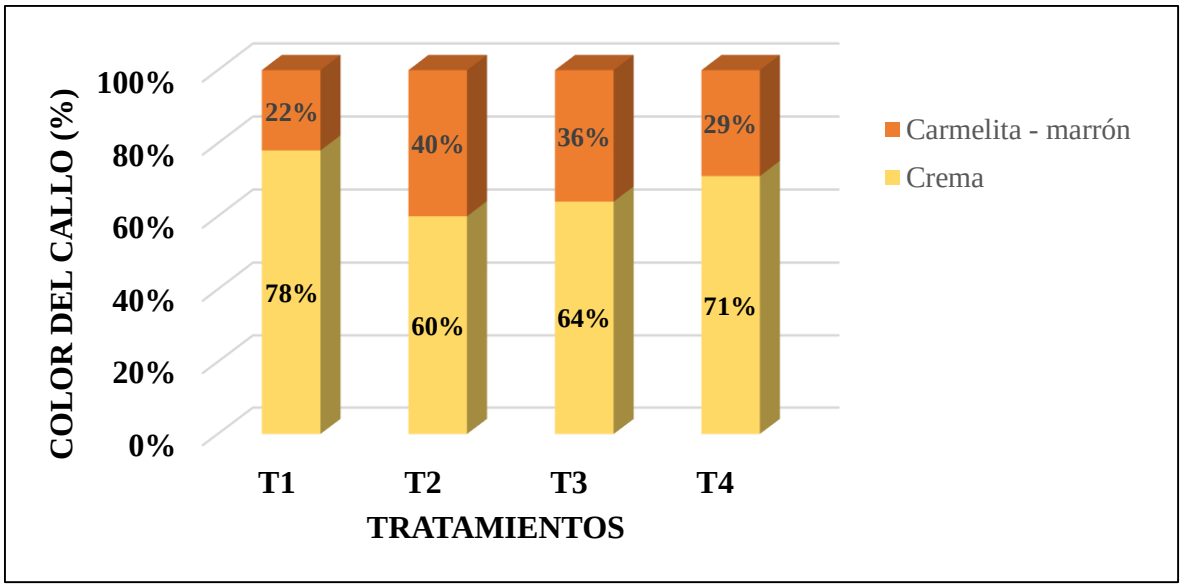

Figura 26. Porcentaje de la variable color del callo en explantes de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

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

Para concluir la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L., dentro de los parámetros se evaluó la friabilidad del callo (capacidad para disgregarse) en donde, para ambos sitios tanto Uritusinga y Zamora Huayco se obtuvo una friabilidad del 100%; es decir, todos los callos formados en cada uno de los tratamientos tuvieron consistencia homogénea

y firme, lo cual no permitió, que los callos formados al ser al manipulados puedan destruirse con facilidad (Figura 27).

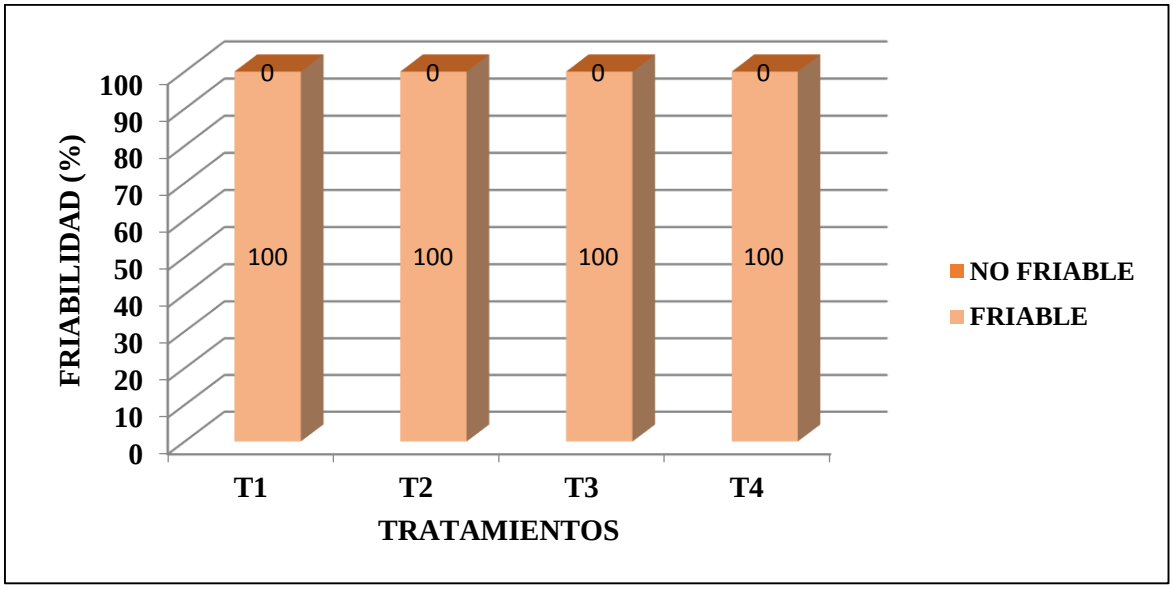

Figura 27. Porcentaje de friabilidad de callos de *Cinchona officinalis* L, de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

4.2. Determinación del mejor balance hormonal para la formación de estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1. Número de brotes de *Novo* por callo de *Cinchona officinalis* L. inoculados *in vitro* provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

Durante la fase de formacion *de* brotes d*e Novo* a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., se logró determinar que el T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) alcanzó el mayor porcentaje en formación de brotes de *Novo* con 14,54% para el caso de Uritusinga; mientras que, para el sitio Zamora Huayco, el tratamiento T1(0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) obtuvo el mayor porcentaje de formación de brotes de *Novo* con 20%; de igual forma, los tratamientos que presentaron los menores porcentajes de formación de estructuras de *Novo* corresponden al T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) para Zamora Huayco (13,05%) y para el caso de Uritusinga el T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) (9,69%).

Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que existió diferencia estadística significativa entre tratamientos para ambos sitios (Figura 28 y 29) (Cuadro 20 y 21).

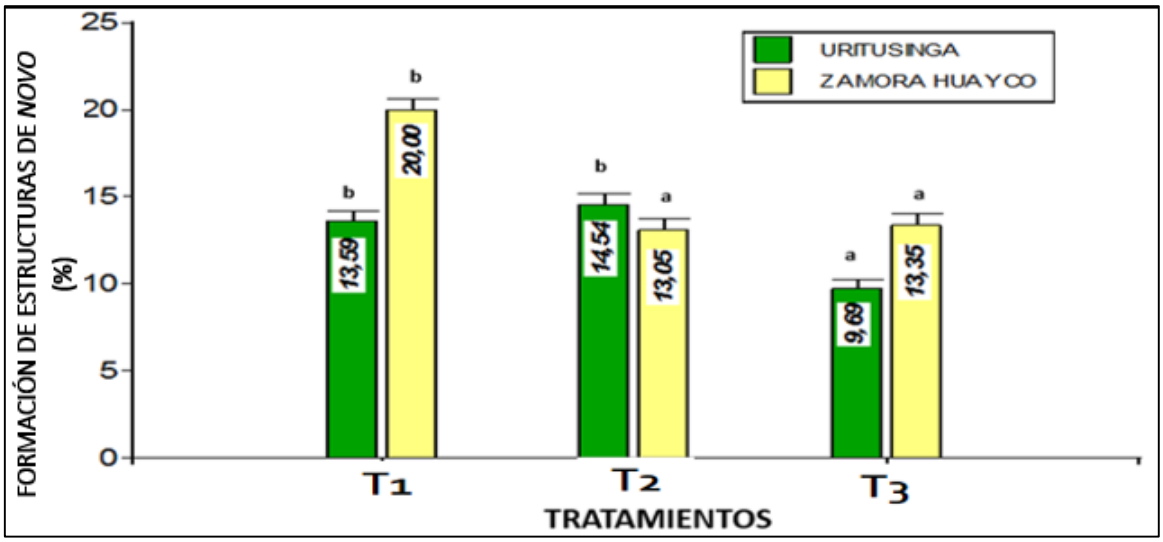

Figura 28. Porcentaje de formación de estructuras de *Novo* obtenidos a partir de callos de *Cinchona officinalis* L, de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

Cuadro 20. Resultados estadísticos-obtenidos en la fase de formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

ANÁLISIS DE VARIANZAS					
Variable		**N**	**CV**		
% Estructuras *de Novo*		90	76,12		
FUENTE DE VARIACIÓN	**SC**	**GL**	**CM**	**F**	**p-valor**
MODELO	4622,47	3	1540,82	23,91	<0,0001
TRAT	646,13	1	323,06	5,01	<0,0002
ERROR	3976,34	1796	3976,34	61,7	
TOTAL	120353,53	1799	64,44		
TEST: LSD FISHER					
Tratamientos	**Medias**	**N**	**E.E.**	**Rangos**	
T1	13,58	30	0,33	B	
T2	14,38	30	0,33	B	
T3	45,83	30	0,33	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,05)					
***LSD FISHER**: Least significant difference (Diferencia menos significativa):					
SC: Suma de cuadrados	**E.E:** Error estándar		**N**: Número		
GL: Grados de libertad	**CM:** Cuadrado medio				
CV: Coeficiente de Variación	**F:** Estadístico F				

Cuadro 21. Resultados estadístico-obtenidos la fase de formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

ANÁLISIS DE VARIANZAS					
Variable		**N**	**CV**		
% Estructura de *Novo*		120	73,56		
FUENTE DE VARIACIÓN	**SC**	**GL**	**CM**	**F**	**p-valor**
MODELO	4622,47	3	15488	22	<0,0001
TRAT	646,13	1	393,68	5,01	<0,0002
ERROR	3976,34	119	38886,34	56	
TOTAL	120353,53	17	78,44		
TEST: LSD FISHER					
Tratamientos	**Medias**	**N**	**E.E.**	**Rangos**	
T1	20	30	10,18	B	
T2	13,05	30	10,18	A	
T3	13,35	30	10,18	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,05)					
***LSD FISHER**: Least significant difference (Diferencia menos significativa):					
SC: Suma de cuadrados	**E.E:** Error estándar		**N**: Número		
GL: Grados de libertad	**CM:** Cuadrado medio				
CV: Coeficiente de Variación	**F:** Estadístico F				

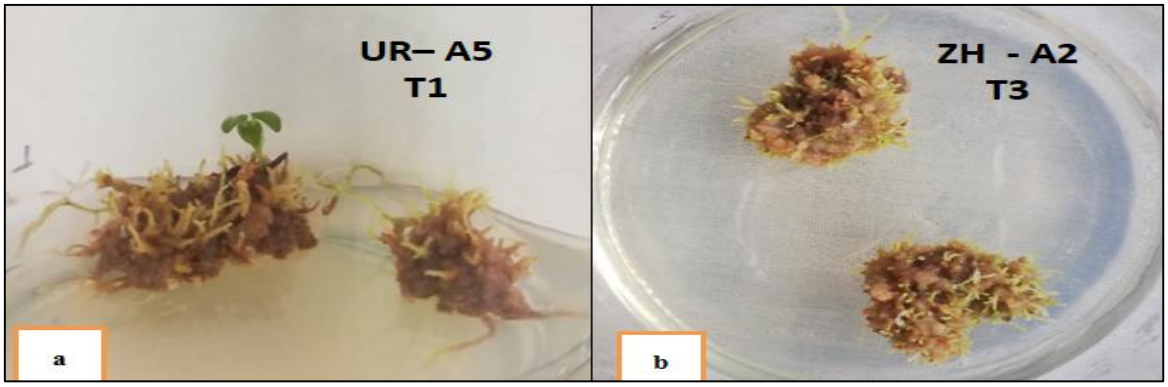

Figura 29. Brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L; a) Uritusinga; b) Zamora Huayco.

4.2.2. Número de días a la formación de brotes de *Novo* de los callos de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

La fase de formación de brotes de *Novo* en *Cinchona officinalis* L, para el sitio Uritusinga comenzó 5 días después de la inoculación de callos (obtenidos en la fase de formación de callos), lográndose evidenciar la formación de brotes a partir de la primera evaluación, los

tratamientos T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) y T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) fueron los que alcanzaron el mayor número de brotes de *Novo* con 4 brotes por callo respectivamente; mientras que, el T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP mostró el menor número de brotes con aparición de 2 brotes por callo.

El número de días a la formación de brotes por callo de *Cinchona officinalis* L.**,** se estabilizó a los 100 días, logrando alcanzar la formacion de brotes de Novo por callo de 22 brotes/callo correspondiente al T2, mientras que T1 obtuvo la formacion de 18 brotes/callo; y finalmente T3 obtuvo el menor número de brotes por callo a razón de 14 brotes/callo (Figura 30 y 31). Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que no existe diferencia estadística significativa entre tratamiento.

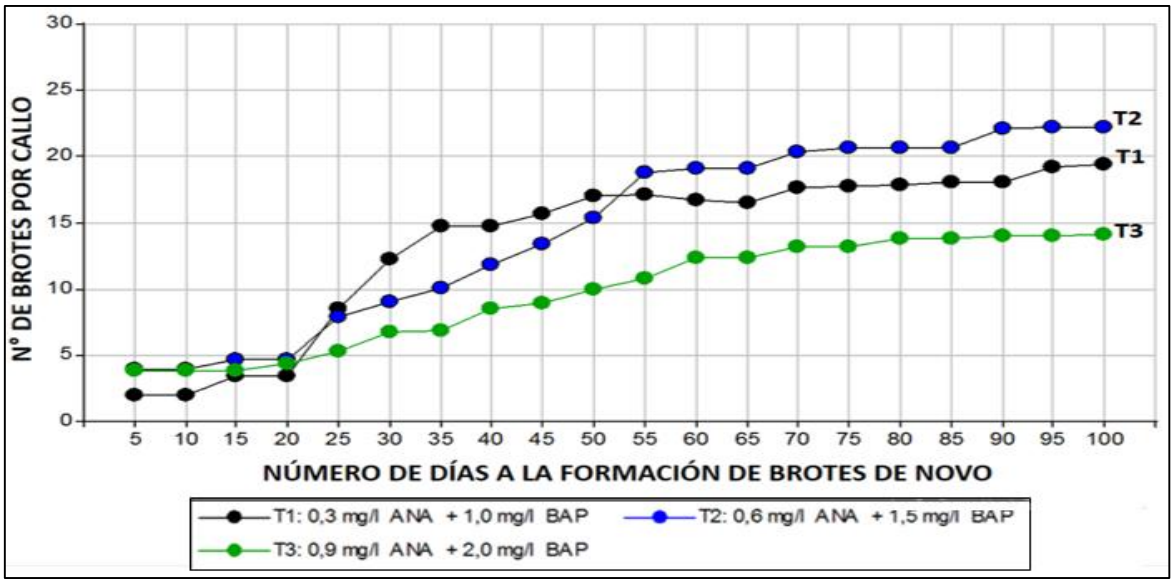

Figura 30. Formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., después de 100 días de exposición en cada uno de los tratamientos evaluados, del sitio Uritusinga.

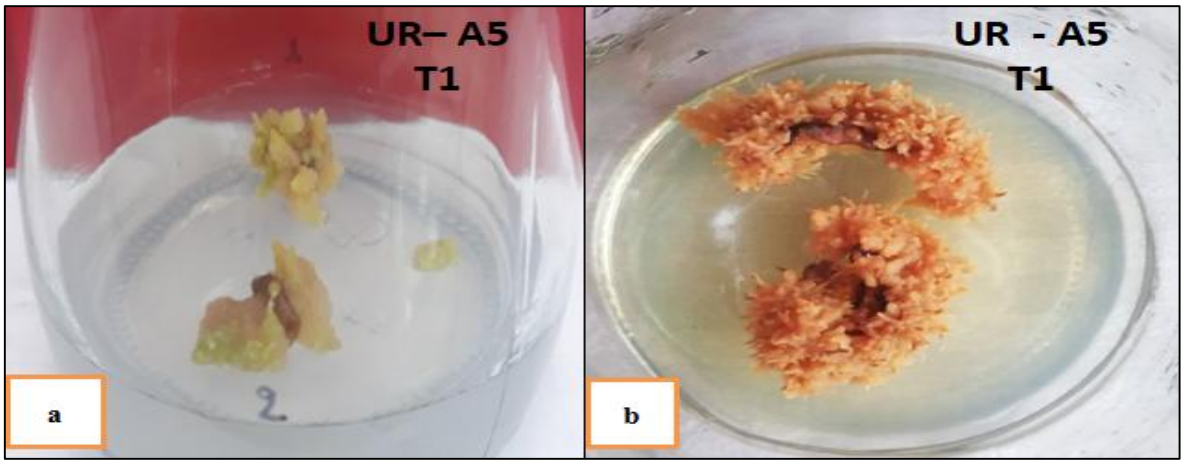

Figura 31. Formación de brotes de *Novo*; a) Primeros 30 días de evaluación; b) Evaluación final (100 días) en la formación de brotes *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.2.3. Número de días a la formación de brotes de *Novo* por callo de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

De igual forma se logró evidenciar la aparicion de brotes *de Novo* en los tratamientos evaluaados para el sitio Zamora Huayo, a partir del quinto dia de la inoculacion, el T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor número de brotes de *Novo* con 5 brotes/callo; mientras que, los tratamientos T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) y T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) presentaron menor formación de brotes por callo a razón de 6 brotes/callo, y 5 brotes/callo respectivamente.

El número de días a la formación de brotes por callo de *Cinchona officinalis* L., se estabilizó a los 80 días para el sitio Zamora Huayco, evidenciandose la aparación de brotes de *Novo* en mayor cantidad para el T1 con un número promedio de 30 brotes/callo, finalmente los tratamientos T2 y T3 obtuvieron el menor número de brotes por callo con un promedio de 18 brotes/callo y 21 brotes/callo respectivamente (Figura 32 y 33).

Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos.

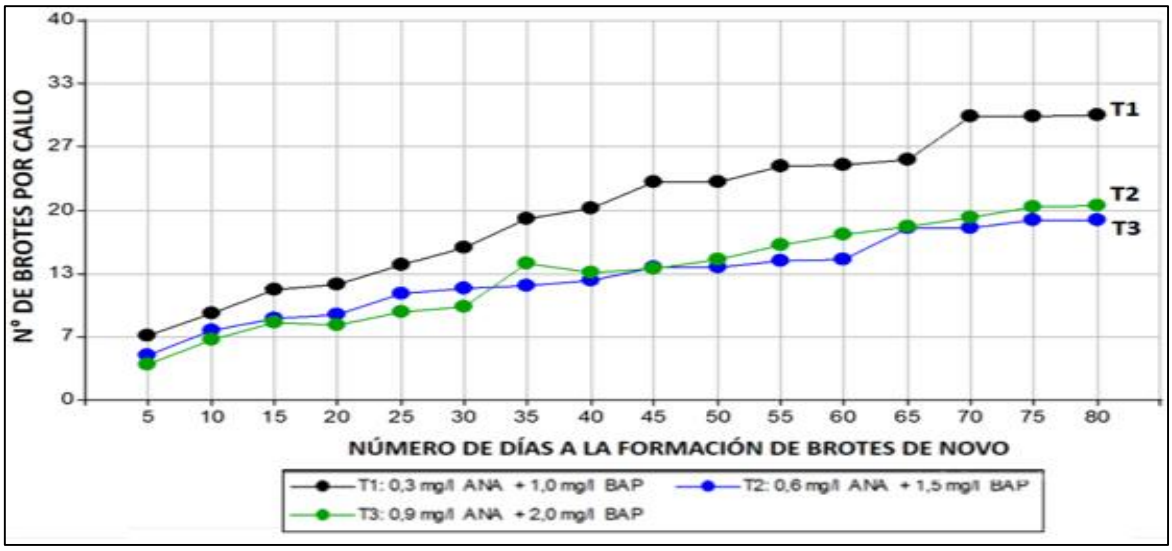

Figura 32. Formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 80 días de evaluación en cada uno de los tratamientos, del sitio Zamora Huayco.

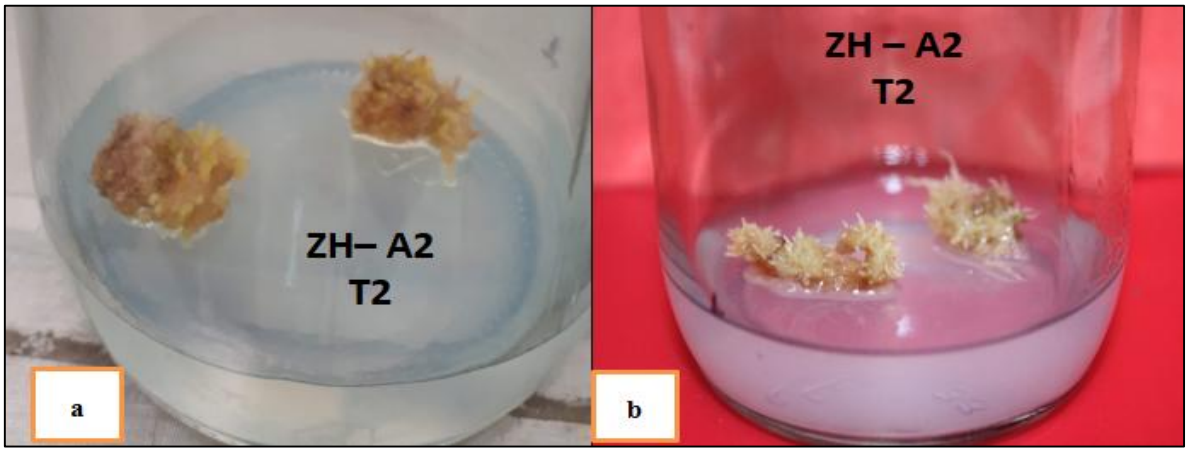

Figura 33. Formación de brotes de *Novo*; a) Primeros 30 días de evaluación; b) valoración final (80 días) en la formación de estructuras de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, sitio Zamora Huayco.

4.2.4. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Uritusinga.

En la evaluación del porcentaje de contaminación se observó para el T2 un 3,33% de contaminación en el medio de cultivo, mientras que los tratamientos T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) y T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) no presentaron contaminación durante su evaluación. (Cuadro 22). Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 34).

Cuadro 22. Registro de callos contaminados de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Uritusinga.

Tratamientos	N° callos	N° Callos contaminados	% Contaminación
T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	1	3,33
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	0	0,00
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	0	0,00

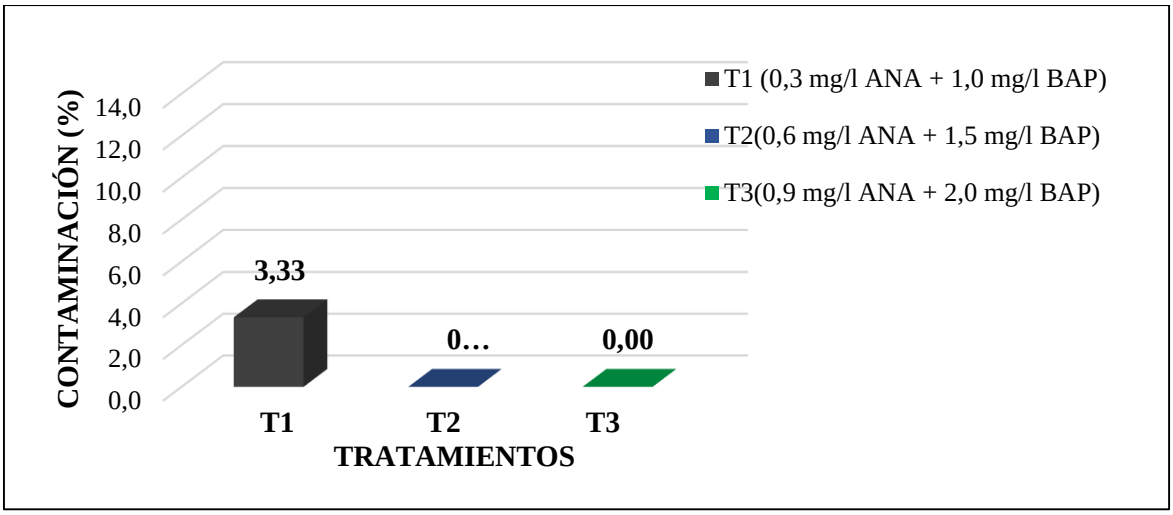

Figura 34. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.2.5. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Zamora Huayco.

El sitio de Zamora Huayco se comportó similar al caso anterior, el porcentaje de contaminación fue de 3,33% para el T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP); y finalmente los tratamientos T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) y T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) no presentaron ningún tipo de contaminación durante la evaluación con 0,00% cada tratamiento (Cuadro 23). Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 35).

Cuadro 23. Registro de callos contaminados de *Cinchona officinalis* L, provenientes del sitio Zamora Huayco.

Tratamientos	N° callos	N° Callos contaminados	% Contaminación
T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	0	0,0
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	0	0,0
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	1	3,33

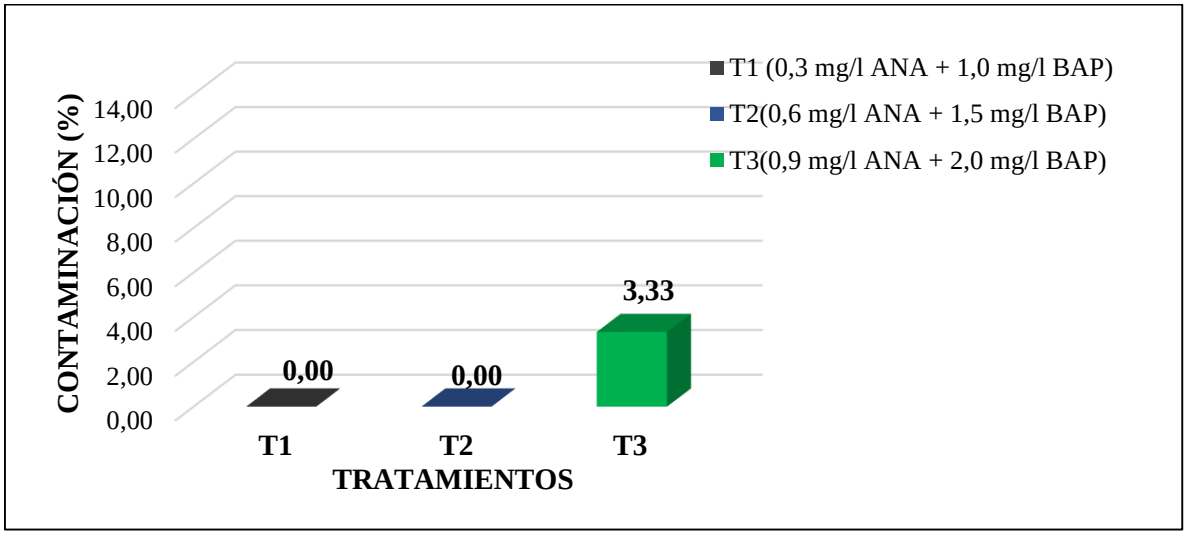

Figura 35. Porcentaje de contaminación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.2.6. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro* del sitio Uritusinga.

En cuanto al porcentaje de oxidación fenólica para el sitio Uritusinga, se obtuvo el mayor porcentaje de oxidación para T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) con 16,67 % seguido del T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) con un porcentaje de oxidación fenólica equivalente al 10%; finalmente el T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) fue el que presentó el menor porcentaje de oxidación con 6.7 % (Cuadro 24)

Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 36).

Cuadro 24. Registro de oxidación fenólica de brotes de *Novo* en *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

Tratamientos	N° callos	N° Callos oxidados	% Oxidación
T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	5	16,7
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	2	6,7
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	3	10,0

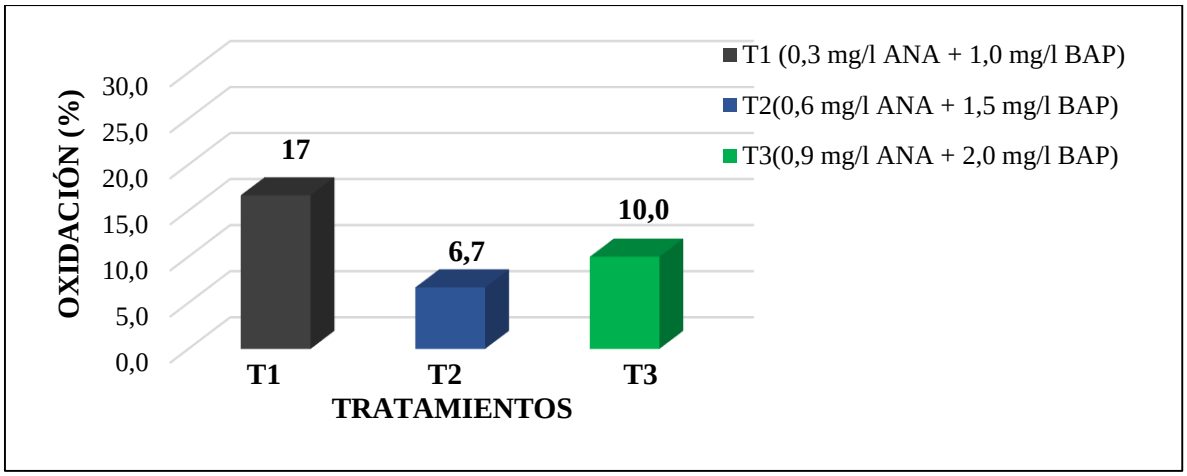

Figura 36. Porcentaje de oxidación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.2.7. Porcentaje de oxidación fenólica de callos de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Zamora Huayco.

En cuanto al sitio Zamora Huayco los callos que se inocularon para la formación de brotes de *Novo* presentaron porcentajes de oxidación fenólica de 13,33% para el T3 (0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP) , siendo el tratamiento con el porcentaje más alto en oxidación; seguido del T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) con el 10%, finalmente el T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) presentó el porcentaje más bajo con de oxidación de callos con 3,33% (Cuadro 25)

Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 37).

Cuadro 25. Registro de brotes de *Novo* con oxidación fenólica, del sitio Zamora Huayco

Tratamientos	N° callos	N° Callos oxidados	% Oxidación
T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	1	3,33
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	3	10,00
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	4	13,33

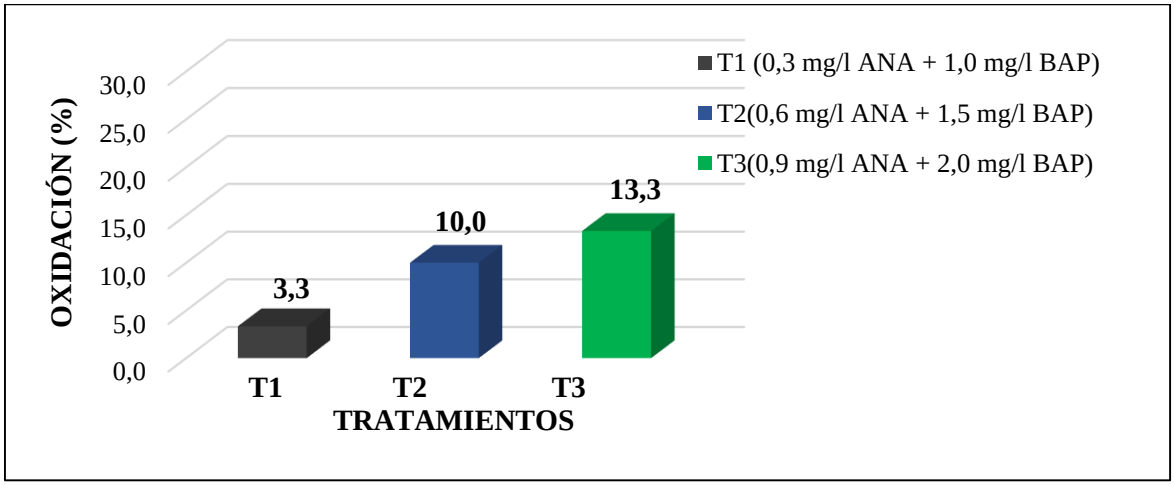

Figura 37. Porcentaje de oxidación fenólica de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.2.8. Porcentaje de mortalidad de estructuras de brotes de Novo de *Cinchona officinalis* L. inoculados *in vitro*, del sitio Uritusinga.

Para el sector Uritusinga el T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de brotes de estructuras de *Novo* con el 10%, en comparación al tratamiento T1(0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) (0,00 %) que no presento porcentaje de mortalidad (Cuadro 26).

Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 38).

Cuadro 26. Porcentaje de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga

Tratamientos	N° callos	N° Callos muertos	% Mortalidad
T1(0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	0	0,0
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	3	10,0
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	2	6,7

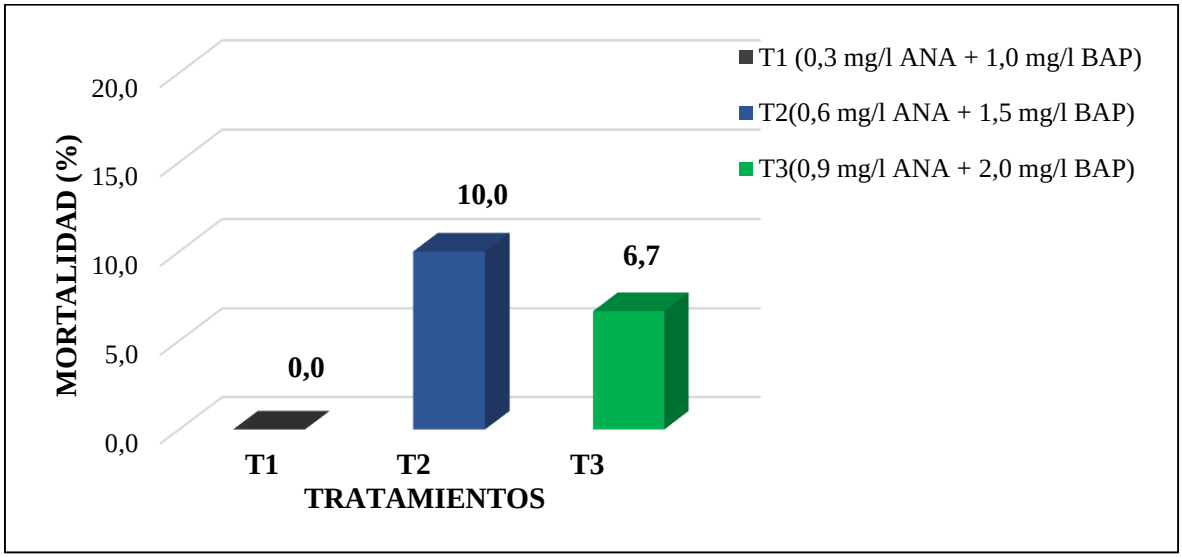

Figura 38. Porcentaje de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Uritusinga.

4.2.9. Porcentaje de mortalidad de estructuras de brotes de Novo de *Cinchona officinalis* L., inoculados *in vitro*, del sitio Zamora Huayco.

Para el sitio de Zamora Huayco en la variable porcentaje de mortalidad, el T1 obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de brotes de estructuras de *Novo* con el 13,33%; en comparación al T3 (0,00 %) que no registro porcentajes de mortalidad (Cuadro 27). Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher al 5% se demuestra que si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 39).

Cuadro 27. Registro de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

Tratamientos	N° callos	N° Callos muertos	% Mortalidad
T1 (0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP)	30	4	13,33
T2(0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP)	30	2	6,67
T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP)	30	0	0,00

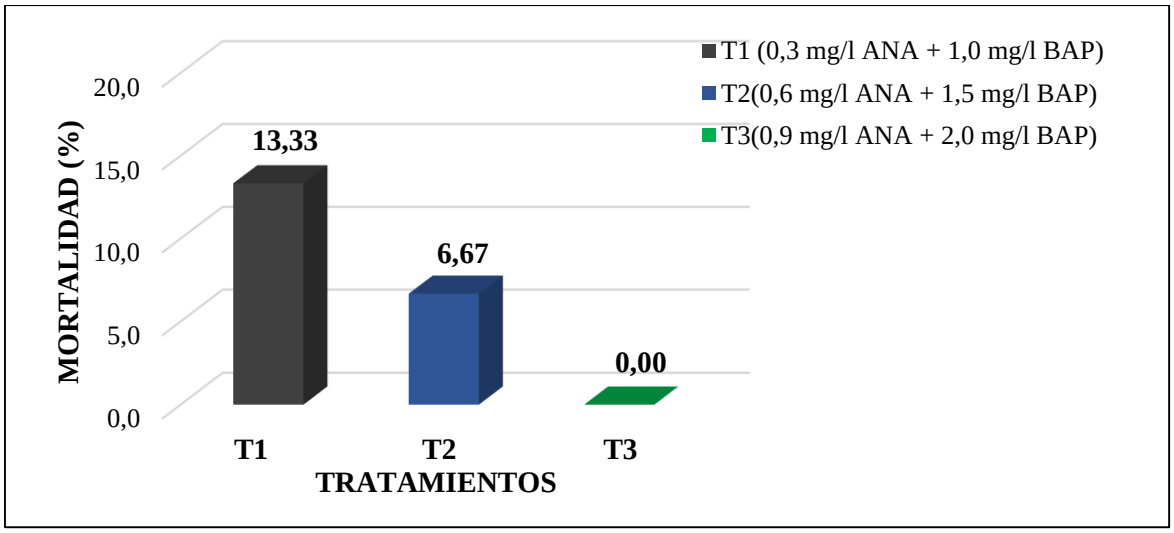

Figura 39. Porcentaje de mortalidad de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, del sitio Zamora Huayco.

4.3. Difusión de la información a actores sociales interesados.

Dada la relevancia de la información generada en la presente investigación, la socialización de los resultados del proyecto de tesis se realizó al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en el cual se logró dar a conocer los resultados obtenidos durante la elaboración del mismo, se aportó con algunas recomendaciones para futuras investigaciones para la micropropagación de la especie (Figura 40).

Además, se elaboró y entregó un tríptico divulgativo para dar a conocer los resultados de la investigación (Anexo 1).

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

Figura 40. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico y docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis* L. provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

En la presente investigación durante la fase de formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., se observó que la combinación de dos sustancias reguladoras de crecimiento es necesaria para la formación de callos. Así, la combinación de auxinas y citoquininas 2,0 mg/l de ANA + 0,0 mg/l de BAP (T2) permitieron la obtención de 70,00% de formación de callos para el sitio de Zamora Huayco; mientras que, para el sitio de Uritusinga una concentración de 2,0 mg/l de ANA y 0,5 mg/l de BAP (T4) se obtuvo formación de callos en un 50,8%. Armijos (2006); menciona que, para obtener un mayor porcentaje de formación de callos en *Cinchona officinalis* L., es necesaria la utilización del medio B5 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), nitrato de potasio y sacarosa como la fuente de hidrato de carbono y la aplicación de auxina-citoquinina en concentraciones mayores, para la obtención de aproximadamente el 68% de formación a callos.

En lo que respecta a la variable contaminación los porcentajes registrados fueron muy bajos T1(1,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) , T3 (1,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) y T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) con (3,33%) y nulos (T2 0,0%) para el sitio de Uritusinga; iguales porcentajes se obtuvieron para el sitio Zamora Huayco en donde, T1, T2 y T3 presentaron el 3,33 % y el T4 con 0,0%; estos bajos niveles suceden debido a que se trabajo con explantes procedentes de vitroplantas que presentarón condiciones inocuas.

Según el estudio realizado por Gonzales (2017) en *Cinchona officinalis* L. a partir de v*itroplantas*, no recibieron desinfección; sin embargo, T2 (2,0 mg/l de 2,4D) presentó el 6,67 % de contaminación en el medio de cultivo, y los tratamientos T1, T3, T4, T5 y T6, no se presentó contaminación alguna durante los 50 días de evaluación. Según indica Otero 2014 las principales fuentes de contaminación en cultivos celulares son el operador, la manipulación, atmosfera, superficies, utensilios y soluciones, que dan origen a varios tipos de contaminación como bacterias, levaduras, hongos y virus.

En lo que respecta a la variable de mortalidad de callos de *Cinchona officinalis* L., para el sector de Uritusinga se determinó que el T2 fue el tratamiento que presentó mayor porcentaje

de mortalidad de callos; mientras que T3 presentó el 6,67% de mortalidad, finalmente T2 y T4 fueron los tratamientos que no presentaron porcentajes de mortalidad durante los días de evaluación.

En lo que respecta a la variable mortalidad para el sitio de Zamora Huayco, a pesar de que T2 fue el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos, el mismo T2 fue el tratamiento que presentó el 6,67% de mortalidad de explantes, esta condición se dio debido a que, el tratamiento T2 presentó formación de callos en la mayoría de sus explantes (70%) y su diferencia fueron aquellos explantes que presentaron necrosis y contaminación, situación que no sucedió con los demás tratamientos; mientras que T4 mostró un 3,33% de mortalidad, y finalmente T3 no mostró porcentajes de mortalidad durante la fase de formación de callos. Sin embargo, según un estudio realizado por Gonzales (2017) determinó que T3 (3,0 mg/l de 2,4D) presentó el mayor porcentaje de mortalidad de explantes con el 60%, en comparación a los tratamientos T5 (2,0 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l BAP) y T6 (3,0 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l BAP) que presentaron una mortalidad de 13,00 % y 3,33 %.

El color que adquirieron los callos durante la fase de formación se fue modificando conforme transcurrieron los días de evaluación; para el sitio de Uritusinga al cabo de los 60 días de evaluación los callos se tornaron de coloración crema y carmelita-marrón. Siendo T2 el tratamiento donde existieron mayor número de callos con coloración crema durante los días de evaluación con un 72%, constituyéndose en los callos con mayor viabilidad y potencial para desarrollar raíces, brotes y embriones que formen plántulas completas. Mientras que, T1 el tratamiento presentó mayor porcentaje de callos en pigmentación carmelita-marrón con 54%, seguido de los tratamientos T4, T3, T2 que mostraron valores de 48, 40%, y 28% respectivamente, siendo éstos los callos que perdieron rápidamente su viabilidad debido a deshidratación o cambio en el medio de cultivo, estando expuestos a contaminación y a procesos de necrosis del explante.

En cambio, para el sitio de Zamora Huayco, T1 fue el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de callos de color crema (células callogénicas con mayor viabilidad y posible formación de brotes, raíces y embriones) con un 78% y T2 fue el tratamiento que presentó el mayor número de callos en coloración carmelita – marrón (explantes con agotamiento de nutrientes, perdida de agua, posible contaminación y necrosis) con un 40%. Sin embargo, un

estudio realizado por Gonzales (2017) indica que color y apariencia de los callos en diferentes tratamientos ensayados, se visualizó que en los primeros días de evaluación obtuvieron una apariencia homogénea-traslucido de coloración crema; mientras que los callos visualizados a los 80 días presentaron una coloración carmelita o marrón y crema; así el T2 (2,0 mg/l de 2,4D), T3 (3,0 mg/l de 2,4D) y T6 (3,0 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l BAP) obtuvieron el mayor porcentaje de callos con apariencia no homogénea-no traslucido y de coloración carmelita (100 %); mientras que los tratamientos T5 (2,0 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l BAP), T4 (1,0 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l BAP) y T1 (1,0 mg/l de 2,4D) obtuvieron callos con apariencia homogénea-traslucido de coloración crema con el 8 %, 19 % y 24 % respectivamente

Para la variable porcentaje de friabilidad del callo, los resultados obtenidos en la presente investigación indican que, para los sitios Uritusinga y Zamora Huayco al final de cada una de las evaluaciones, el 100% de los callos formados en los tratamientos fueron callos friables con coloración crema y café-marrón. Estudios realizados por Pierik (1990) sugieren que los callos no friables son de color marrón y los de tipo friable son de color blanquecino, apareciendo con pigmentos verdes y rojos, este tipo de consistencia del callo es adecuado para realizar suspensiones celulares; así también, Pérez (1988); Paredes, et al. (2017) mencionan que un callo friable es de apariencia seca, coloración amarillo-blanquecino, compacta; y que se puede determinar de manera visual.

5.2. Determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L., provenientes de los sitios Uritusinga y Zamora Huayco.

En la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, se logró determinar que la combinación de 0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP (T2) resultó ser la más efectiva, obteniéndose 14,54% de formación de estructuras de *Novo* para el sitio de Uritusinga; mientras que el mejor tratamiento para el sitio de Zamora Huayco estaba compuesto por 0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP (T1) logrando una formación de estructuras de Novo del 20%. Según un estudio realizado por Gonzales (2017) indica que el mayor porcentaje de formación de embriones somáticos se obtuvo con la combinación de 1 mg/l 2,4-D y 0,5 mg% KIN (T3) con un 28,33%; así mismo, indica al añadir auxinas (2,4-D) en una concentración 0,1 mg/l, la formación de embriones fue del 17,00 %.

Para la variable formación de brotes de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, para el sitio Uritusinga, comenzó a cinco días después de la inoculación de callos lográndose evidenciar la formación de brotes y se estabilizó a los 100 días, logrando alcanzar la formacion de brotes de *Novo* por callo de 22 brotes/callo correspondiente al T2 (0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP); mientras que, T3 (0,9 mg/l ANA y 2,0 mg/l BAP) obtuvo el menor número de brotes por callo a razón de 14 brotes/callo en lo que respecta al sitio de Uritusinga.

En los ensayos de Zamora Huayco se logró evidenciar la aparicion de brotes *de Novo* partir del quinto dia de la inoculacion, el T1(0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor número de brotes de *Novo* con 5 brotes/callo; mientras que, los tratamientos T2 (0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP) y T3(0,9 mg/l ANA y 2,0 mg/l BAP) presentaron menor formación de brotes por callo a razón de 6 brotes/callo, y 5 brotes/callo respectivamente. El número de días a la formación de brotes por callo de *Cinchona officinalis* L., se estabilizó a los 80 días para el sitio Zamora Huayco, evidenciandose la aparación de brotes de estructuras de novo en mayor cantidad para T1(0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP) con un número promedio de 30 brotes/callo; mientras que, T2(0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP) y T3(0,9 mg/l ANA y 2,0 mg/l BAP) obtuvieron el menor número de brotes por callo con un promedio de 18 brotes/callo y 21 brotes/callo respectivamente. Sin embargo, Gonzales (2017) indica que durante los primeros días de evaluación los tratamientos analizados ya presentaban embriones somáticos; el T1 inició con un valor de 1,67 % estabilizándose a los 85 días con un valor de 15,00 %; el T2 inició con el 2,67 %, estabilizándose a los 80 días con 17,00 %; y, finalmente, el T3 inició con el 2,67 % estabilizándose a los 80 días con un valor promedio de 28,33 %.

Los callos de *Cinchona officinalis* L, utilizados en la inoculación para la formación de estructuras de *Novo*, provenientes de Uritusinga fue material que se encontró en condiciones asépticas. Sin embargo, el T2 (0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP) presentó un 3,33% de contaminación en el medio de cultivo, mientras que los tratamientos T2 y T3 no presentaron contaminación durante su evaluación.

Para el sitio de Zamora Huayco el porcentaje de contaminación fue de 3,33% para el T3(0,9 mg/l ANA + 2,0 mg/l BAP); finalmente los tratamientos T1 y T2 no presentaron ningún tipo de contaminación durante la evaluación con 0,00% cada tratamiento. Según Gonzales (2017) indica que no registró ningún porcentaje de contaminación para el T1: Sin Hormonas, T2:

0,1 mg/l de 2, 4-D; y, T3: 1,0 mg/l de 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN, ya que, el material (callo) que se utilizó fue aséptico.

Finalmente, los porcentajes de mortalidad para el sitio de Uritusinga; fueron bajos, en donde el T2 presentó 10% de mortalidad, seguido de T3 con 6,7% y T1 que no presentó registros de mortalidad durante la fase de formación de estructuras de *Novo*; mientras que, para el sector de Zamora Huayco se registró el mayor porcentaje de mortalidad para T1 con 13,33%; seguido del T2 con 6,67% de mortalidad y T3 que no mostró registros de mortalidad durante los días de evaluación en los tratamientos ensayados.

Estos resultados obtenidos en la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L, constituye el primer trabajo que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, siendo uno de los pioneros en este tipo de investigación, y que servirá de guía para orientar futuras investigación de micropropagación de *Cinchona officinalis* L.

6. CONCLUSIONES.

- Para la formación "*in vitro*" de callos a partir de explantes provenientes de vitroplantas de la especie *Cinchona* o*fficinalis* L., el T4 constituido por 2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP para Uritusinga dio los mejores resultados con 50,8%; y, para el caso de Zamora Huayco el medio óptimo fue T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), con 70,0%.

- En cuanto a la variable de oxidación fenólica en la fase de formación de callos el tratamiento T4 (2,0 mg/l ANA y 0,5 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de explantes con oxidación fenólica para el sitio de Uritusinga. Para el sitio de Zamora Huayco el tratamiento T1 (1,0 mg/l ANA y 0,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presento el mayor porcentaje de explantes con oxidación fenólica.

- En lo que respecta a la mortalidad T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de mortalidad en explantes provenientes del sitio de Uritusinga; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco T1 (1,0 mg/l ANA y 0,0 mg/l BAP) y T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) presentaron mayores porcentajes de mortalidad.

- En la fase de formación de estructuras de *Novo* el empleo de una concentración de 0,6 mg/l ANA y 1,5 mg/l BAP (T2) permitió obtener el mayor porcentaje de brotes de *Novo Cinchona* o*fficinalis* L, por callo para el sitio Uritusinga; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco una concentración de 0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP permitió obtener el mayor porcentaje de brotes de *Novo Cinchona* o*fficinalis* L por callo.

- En la fase de formación de estructuras de *Novo* de *Cinchona* o*fficinalis* L, el T1 (0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de callos con oxidación fenólica para el sitio de Uritusinga. En el sitio de Zamora Huayco el tratamiento T3 (0,9 mg/l ANA y 2,0 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de callos con oxidación fenólica.

- En cuanto a la mortalidad T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de mortalidad de callos provenientes del sitio de Uritusinga. Para el sitio de Zamora Huayco T1 (0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP) presentó el mayor porcentaje de mortalidad.

- Los porcentajes de contaminación presentados durante la fase de formación de callos como en la fase de formación de estructuras de Novo fueron muy bajos (3.33 %) y nulos (0,00%) para los dos sitios en estudio, debido a que se utilizó material aséptico.

7. RECOMENDACIONES.

- Evaluar factores físicos y químicos que intervienen en procesos biotecnológicos de la especie en estudio (medio e cultivo, reguladores de crecimiento y su concentración, tipo y tamaño de explantes, etc.)

- Contar con suficiente material vegetal *in vitro* a ser utilizado en la fase de inducción de callos y formación de estructuras de *Novo.*

- En esta investigación no todos los explantes formaron callos, por lo que se recomienda analizar las condiciones físicas y fisiologías responsables para la presencia de proceso de organogénesis directa (aparición de brotes).

- Es necesario tomar en cuenta la selección del inóculo inicial, conformado por explantes pequeños de entrenudos del tallo, hojas y callos, los cuales forman estructuras de menor tamaño; a diferencia de los explantes de mayor tamaño, que dan mejores resultados en la formación de callos de mayor tamaño.

- El presente trabajo permitirá contar con protocolos iniciales para la micropropagación de *Cinchona officinalis* L., a través de la inducción de callos y estructuras de *Novo* como aporte para la multiplicación y mejoramiento genético de la especie.

- Es importante continuar con la investigación de procesos biotecnológicos en especies forestales, como el caso de *Cinchona officinalis* L, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de individuos por unidad de superficie y en un corto tiempo, para de esta manera iniciar el mejoramiento genético de la especie y emprender en programas de recuperación de la misma, que se encuentra en estado vulnerable y por ende en peligro de extinción.

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.

Acosta, C.C. (2012). La micro propagación en especies forestales. Ciencia actual- Vol. 1. Numero 2 Julio/diciembre 2011 ISSN 2248-468x.

Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas* del Ecuador. Quito: Editorial del Ecuador. Recuperado de http://www.biodiversitylibrary.org/item/146652.

Adobkar, I; Saad, M; Ahmed, M. (2012). Plant tissue culture media. Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (ed) In: Recent advances in plant *in vitro* culture. ISBN 978-953-51-0787-3.

Aguilera, G. (2012). Estandarización de una metodología para la inducción de callos embriogénicos en genotipos híbridos de coco, *Cocos nucifera* L. (ARECALES: ARECACEAE) a partir de cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira facultad de Ciencias Agropecuarias departamento de Ciencias Biológicas Palmira. Recuperado de http://bdigital.unal.edu.co/10700/1/7515001.2012.pdf

Álvarez, P. (2014). Área Biológica. Identificación de Hongos Micorrízicos Orbiculares en plantas de *Cinchona* spp., en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja. Tesis previa a la obtención de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. 44.

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

Anderson, L. (1999). A revisión of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchonae). Memories of the New York Botanical Garden, Volumen 6 (80), 1-75.

Andersson, L., & Taylor, C. (1994). Rubiaceae-Cinchonaceae- Apelteae. En Harling G. Andersson L (Eds), Flora of Ecuador N° 50.

Armijos, R. (2016). Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis* Linneo., Tesis doctoral. Universidad politécnica de Madrid-España.

Bravo, E. (2006). Impacto del convenio de Biodiversidad en el Ecuador. Acción ecológica. Quito - Ecuador.

Bu'Lock, J. (1991). Biotecnología básica. Zaragoza (España): Acribia, S.A.

Buitrón, X. (1999). Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales. Situación Actual y Aspectos Importantes para su conservación. Recuperado de www.traffic.org/medicinal-reports/traffic_pub_medicinal27.pdf. 136 p.

Bull. T.; Holt, G.; Lilly, D. (1982). Biotecnología: Perspectivas y tendencias internacionales. España: Editorial Academia, S. L.

Burneo, S. (2009). Mega diversidad. *Letras verdes*, (3), 6-7.

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.

Cardoza, V. (2005). Tissue Culture: The manipulation of plant development. Chapter 5. Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications. ed. Stewart, C.N.

Castillo A; Capdevielle, F. (1992) Respuesta de dos clones de *Pyrus calleryana* a distintos medios de cultivo.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro:* Un*a* biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Recuperado de http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf. 8 p.

Chamba, L. (2017). “Procesos biotecnológicos para brotamiento y enraizamiento de Cinchona officinalis L, a partir de vitroplantas en la Argelia-Loja”. Universidad Nacional de Loja. Loja – Ecuador.

Cruz, M., & Irigoyen, J. (2005). Guía técnica de semilleros y viveros. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=1CYOAQAAIAAJ&pg=PR2&dq=propagacion+sexual&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=propagacion%20sexual&f=false 36 p.

Cuesta F, Sevink J, Llambí LD, De Bièvre B, Posner J, Editores (2013). Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos, CONDESAN.

Cuvi, N (2011), Ciencia e imperialismo en América Latina: La Misión de *Cinchona* y las estaciones agrícolas cooperativas. Saarbrucken: Editorial Académica Española.

Cuvi, N; Acosta M. (2005). El Conservacionismo en el Ecuador (1936-1953), Universidad Autónoma de Barcelona, CEHIC-UAB.

Díaz, G. (2012). Procesos morfogénico *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.

Epiquién, M. (2009). Los últimos árboles de la quina. Biodiversity Perú.

Figueroa, R. (2015). Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación in vitro de semilla de moringa (*Moringa oleífera* Lam).

Galeano, V. (2009). Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades. (AHYAT, Ed.). 223 p.

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* sp) (1ra. ed.). Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. Pág. 33-155.

Gonzales, C; Vilca, J. (1998). Micropropagación Vegetativa *In Vitro* De Aliso (*Alnus* a*cuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca – Perú. Páginas 6-13.

Gonzales, K; (2017). "Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja". UNL, Loja-Ecuador.

Gonzalez, M. (2002). Manual de laboratorio de técnicas de micropropagación, Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid-España. ES.

Haccius, B. (1978). Question of unicelular origen of nonzygotic embrios in callus cultures. Phytomorphology, (28), 74-81.

Harling, G. (1986). Flora of Ecuador. Current Scandinavian botanical research in Ecuador. Department of Systematic Botany, University of Göteborg, Section for Botany, Riksmuseum.

Hartman, H. (1997). Propagación de plantas. México D.F, MX. Continental. p. 592- 607

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.

Hudson, T; Hartman E; (1987). Propagación de plantas, principios y prácticas. Primera edición. Compañía Editorial Continental S.A. México. 760 p.

Hurtado, M; y Granizo, T; (2001). La diversidad de los ecosistemas. En la biodiversidad del Ecuador. Informe 2000. Ed. Carmen Josse. Ministerio del Ambiente – Eco Ciencia-UICN. Quito-Ecuador.

Hu, C; Wang, V. (1989). Meristem, shoot tip and bud cul-ture. In: Handbook of Plant Cell. Ed Evans. p 256-290.

Jácome, A. (2013). Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Higuerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción.

Jäger, H. (2011). *Cinchona pubescens.* Enzyklopädie der Holzgewächse. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Alemania.

Jorgensen, P.& León, M. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. (S. B. Gard, Ed.) Recuperado de https://books.google.com.ec/books/about/Catalogue_of_the_vascular_plants_of_Ecua.html?id=uRklAQAAMAAJ&redir_esc=y 1181 p.

Lallana, V.H; Lallana Ma del C. (2003). Manual de practica de fisiología vegetal. Edición digital.

Litz, E; Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Embryogenesis. T. A. Thorpe ed. *In vitro* Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203.

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

Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A., Barrero, D. (2004). Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas, Bogotá, Colombia 871.

Margara, J. (1998). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Madrid- España. 232 p.

Martin L; (2001). *La Conquista Intelectual del Perú. El Colegio Jesuita de San Pablo,1568-1767*, Barcelona.

Martínez, A., Guallart, R., Fernández, F., Gómez, M., & Martínez, J. (2013). Quino / *Cinchona officinalis* / el árbol de la Quina. Recuperado de http://elarbolmiamigo-encinarosa.blogspot.com/2013/01/quino-cinchona-officinalis-elarbol-de.html.

Mathur, J. & Koncz, C. (2005). Callus and culture regeneration. Methods in molecular biology, Vol. 82: Arabidiopsis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Medero, V; García, J; López, J; Ventura, S; Rodríguez, L; Oliva, C; Pons, I; Sánchez, M; Milián, C; Rodríguez, M; Torres, M; Martínez, D; Guerra, M; Álvarez, J. (1999).

Metodología para la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata*). Libro de Reportes cortos 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba. p. 172-173

Mejía, F. Suni, M. & Albán, J. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L. Lima: Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/congres/basic/icbar_xxi/cap07.pdf 6 p.

Meneses, L. (2017). Saberes ancestrales, memoria del territorio, usos y costumbres estudio etnobotánico de diez especies focales o de importancia de la flora local entre la población afrodescendiente de los corregimientos de Juanchaco y Ladrilleros, Bahía Málaga, Buenaventura, Colombia.

Missouri Botanical Garden. (2017). *Cinchona officinalis*. Quinine. Recuperado de: http://www.mobot.org/mobot/archives/image.asp?filename=GPN1982-0505.tif&returnto=/mobot/archives/results.asp.

Monsanto. (2011). Conceptos básicos de biotecnología vegetal. Recuperado de http://www.monsanto.com/global/es/productos/pages/conceptos-basicos-de-biotecnologia-vegetal.aspx.

Mroginsky, L., y Roca, W. (2000). Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Recuperado de http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/ capitulo2.pdf.

Muñoz, E. (1994). Una visión de la Biotecnología: Principios políticos y problemas. Madrid (España): Ed. Fondo Investigación Sanitaria.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497

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

Ochoa, F. (2014). Efecto de tres dosis de ácido indol butírico (aib) y tres concentraciones de sales, sobre el enraizamiento crecimiento y rendimiento de micro-esquejes de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de invernadero.

Otero, J. (2014). Tipos de contaminación en cultivos celulares y su prevención. INDEGSAL/Dep C.C. Biomédicas. Universidad de León. España

Paredes, G., Peña, C., & Jadán, M. (2017). Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas, 34(1-2), 63-83.

Peña, P., Acosta, E., Galindo, L. y Bango, J. (2003). Alternativas del establecimiento *in vitro* en la micropropagación de la Guana. Biotecnología Vegetal, 3(1), 20, 43-46.

Pérez, J. (1988). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Volumen 1.

Pérez, J., Mesén, F., Aguilar, M. y Hilje, L. (2002). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. Revista Forestal Centroamericana, 38, 67-71.

Pierik, R. (1990). Cultivo "*in vitro"* de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, L. 3era Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España 325 p.

Pollito, P. (1989). Taxonomía, distribución geográfica y status del género C*inchona* en el Perú.

Preece, J; Compton, M. (1991). Problems with explant exudation in micropropagation, p.168–189. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Raisman, J. (1999). Hormonas de las plantas. Recuperado de http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm.

Roben, M; Reyes, J, y Loyola, V. (1993). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. Roca y L. Mroginski (eds.), Cultivos de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura (CIAT) No. 151.

Roca, W. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali-Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Recuperado de https://books.google.com.co/books/p/pub2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&lpg=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false 969 p.

Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. CIAT. p 1039.

Romero, S. M. (2017). Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L.(RUBIACEAE) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, *36*(1-2), 27-35.

Russell, J. (2012). *Cinchona Officinalis*. (B. o. Demand, Ed.) Recuperado de http://www.loot.co.za/product/jesse-russell-cinchona-officinalis/wzvd-2307-g330 1p.

Smith, R. (2012). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA 3rd edition.

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.

Thorpe, T. (2014). History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

UICN. (2014). Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2014. Resumen para. América del Sur.

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

Vázquez, M. A.; Larrea, M.; Suárez, L. (2005). Biodiversidad en el Parque Nacional Llanganates: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas. Eco Ciencia.

Wegier, A.; Barba, F; García, J; Pérez S. (2013}. Método para el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de explantes vegetativos. Manual Técnico Núm. 10. CENID-COMEF, INIFAP. México, D.F. México. 84 p.

Yépez, A. (2006). Revigorización y establecimiento *in-vitro* de *Gemelina arbórea* Roxb. V. Mediante cultivo de tejidos vegetales. Colombia Forestall, 2006-12-00 vol:9 nro:19 pág:70-87.

9. ANEXOS

Anexo 1. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis.

RESULTADOS

1. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis L.*

Durante la fase de formación de callos con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados; para el sitio de Uritusinga a los 60 de evaluación el T4 (2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP) alcanzó el mayor porcentaje de formación de callos con el 50,83 %. (Figura 1).

Mientras que para el Sitio de Zamora Huayco al termino de 55 días de evaluación, T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP) fue el tratamiento con mayor porcentaje de formación de callos con el 70%. (Figura 1).

Según el análisis de varianza y la prueba de significancia de LSD Fisher al 5 %, se logró determinar que si existe diferencia significativa entre tratamientos para el sitio de Uritusinga obteniendo un p-valor de 0,01735 , como para el mientras el sitio de Zamora Huayco con un p-valor de 0, 0001.

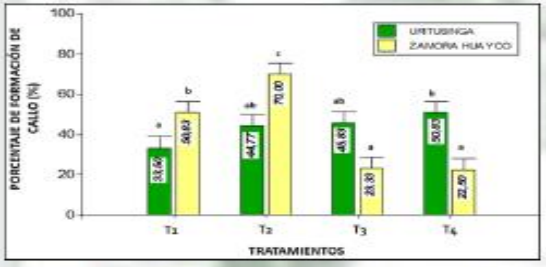

Figura 1. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,05).

2. Determinar el mejor balance hormonal para la formación de estructuras de *Novo* de *C. officinalis* L.

En este ensayo con la aplicación de diferentes tratamientos con la combinación de hormonas en diferentes concentraciones, para el sitio de Uritusinga a los 100 días de evaluación se logró determinar que el T2 (0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP) alcanzó el mayor porcentaje en formación de brotes de *Novo* con 14,54%; , mientras que, para que sitio de Zamora Huayco el tratamiento T1(0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP) obtuvo el mayor porcentaje de formación de brotes de *Novo* con 20% (Figura 2).

Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % si existe diferencia significativa entre tratamientos tanto para Uritusinga (p-valor de 0,0002) , como para Zamora Huayco (p-valor de 0,0002).

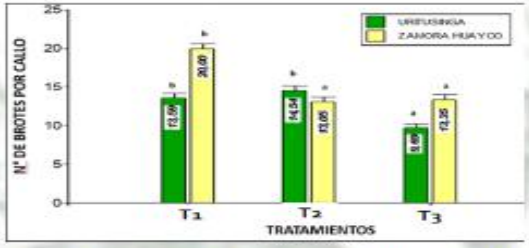

Figura 2. Porcentaje promedio de formación de brotes de *Novo* de *C. officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,05).

CONCLUSIONES

- Para la formación "*in vitro*" de callos de la especie *Cinchona officinalis* L., el T4 constituido por 2,0 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP para Uritusinga dio los mejores resultados con 50,8%; y, para el caso de Zamora Huayco el medio óptimo fue T2 (2,0 mg/l ANA + 0,0 mg/l BAP), con 70,0%.
- El empleo de una concentración de 0,3 mg/l ANA y 1,0 mg/l BAP permitió obtener el mayor porcentaje de brotes de *Novo Cinchona officinalis* L., por callo para el sector, Uritusinga; mientras que, para el sitio de Zamora Huayco una concentración de 0,6 mg/l ANA + 1,5 mg/l BAP permitió obtener el mayor porcentaje de brotes de *Novo Cinchona officinalis* L por callo.

1859

Ingeniería Forestal

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN VEGETAL

"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS Y ESTRUCTURAS DE *NOVO* DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTES DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA"

RESPONSABLE: Egda. Katherine I. Méndez Montaño.
DIRECTOR: Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán Mg.Sc.

Loja – Ecuador
2018

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, una de las provincias con mayor biodiversidad es Loja, la cual está ubicada en la Región Sur del país, dentro de esta biodiversidad, resalta una especie endémica representativa en la provincia como lo es *Cinchona officinalis* L., denominado como el "árbol de la vida" teniendo sus mayores usos en la medicina, gracias a los alcaloides que se encuentran en su corteza, siendo uno de los principales medicamentos terapéuticos contra enfermedades graves como la malaria o paludismo

Actualmente, las poblaciones naturales de *Cinchona* continúan reduciéndose principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria, explotación de madera/ cascara y actividades antrópicas de alto impacto; lo cual, acompañado de la baja tasa de germinación de sus semillas, limita la regeneración natural, y la misma propagación de la especie.

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

OBJETIVOS

General

Contribuir a la generación de información sobre procesos biotecnológicos para la inducción de callos y estructuras de *Novo* de *Cinchona officinalis* L.

Específicos

- Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *Cinchona officinalis L.*
- Determinar el mejor balance hormonal para la formación de estructuras *de Novo* de *Cinchona officinalis* L.
- Difundir y publicar los resultados de la investigación a actores sociales interesados.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio.

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

2. Metodología para probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de *C. officinalis* L.

Como explantes se trabajó con ápices caulinares y segmentos nodales obtenidos en la fase de brotamiento, paso previo a la formación de callos; para lo cual, se tomaron vitroplantas de una altura promedio de 4 cm, en donde se diseccionaron segmentos de hojas que incluyeron parte del peciolo segmentado, a razón de 2 explanes/frasco.

El medio de cultivo solido utilizado estuvo constituido por sales minerales MS (Murashige & Skoog), suplementado con Thiamina 5 mg/l y Mio- Inositol 100mg/l, sacarosa como fuente de carbohidratos al 3.0%, agar 0.6%.

Se probaron cuatro tratamientos con ANA ((ácido naftalenacético) y BAP (Benzilaminopurina) en diferentes concentraciones como se muestra en el cuadro 1.

Se evaluó el % de formación de callos; número de días a la formación de callos; % de contaminación; % de oxidación fenólica; color del callo; % friabilidad y % de mortalidad.

Cuadro 1. Concentraciones hormonales auxinas—citoquininas para la formación de callos de *C. officinalis* L.

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

3. Metodología para determinar el mejor balance hormonal para la formación de estructuras de *Novo de C. officinalis* L.

El material vegetal utilizado en la fase de formación de brotes de *Novo* fueron las mejores formaciones callosas de cada uno de los tratamientos evaluados en el objetivo anterior, tomándose en cuenta su tamaño, color, y estructura

Cada callo obtenido de *Cinchona officinalis* L, fue diseccionado en 4 partes iguales, cada sección constituyó un explante que posteriormente fue inoculado a razón de dos explantes por frasco

Se empleó el medio de cultivo sólido de MS, suplementado con auxinas: ANA ((ácido naftalenacético) y citoquininas: BAP (Benzilaminopurina) en diferentes concentraciones (Cuadro 2).

Se evaluó número de promedio de brotes de *Novo* por callo; % de contaminación; número de días a la formación de brotes de *Novo*, % de oxidación fenólica y % de mortalidad.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados para el efecto de la interacción auxina-citoquinina en la fase de formación de Estructuras de *Novo* de *C. officinalis L.*

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/l)	
	ANA	BAP
T1	0,3	1,0
T2	0,6	1,5
T3	0,9	2,0