



**UNIVERSIDAD
NACIONAL DE LOJA**



**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA
IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN
Cinchona officinalis L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL
INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA
PROVINCIA DE LOJA.**

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

Autora:

Jessica Alejandra Guartanza Loja

Director:

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

Loja – Ecuador

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERIA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg.Sc.,

DIRECTOR DE TESIS

En calidad de director de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA.**”, de autoría de la señorita **JESSICA ALEJANDRA GUARTANZA LOJA** con cédula de identidad N° 1150139341 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, 28 de octubre del 2019

Atentamente,



.....
Ing. Víctor Hugo Eras Guamán. Mg, Sc
DIRECTOR DE LA TESIS

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

Ing. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo Mg.Sc.,
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL CALIFICADOR DE LA TESIS

CERTIFICA:

En calidad de Presidenta del Tribunal de Calificación de la Tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA.**”, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal **Jessica Alejandra Guartanza Loja**, con cédula de identidad N° 1150139341, se informa que ha sido revisada e incorporada todas las observaciones realizadas por el Tribunal Calificador, y luego de su revisión se ha procedido a la respectiva calificación.

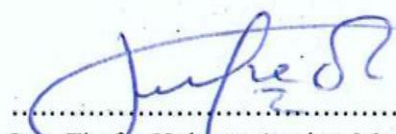
Por lo tanto autorizo la versión final de la tesis y la entrega oficial para su sustentación pública.

Loja, 28 de octubre del 2019

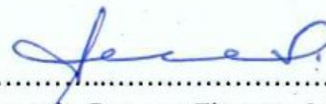
Atentamente,



.....
Ing. Paulina Fernández Guarnizo Mg.Sc.,
PRESIDENTA



.....
Ing. Zhofre Huberto Aguirre Mendoza Ph.D.,
VOCAL



.....
Ing. Aurita Geovania Gonzaga Figueroa Mg.Sc.,
VOCAL

AUTORÍA

Yo, Jessica Alejandra Guartanza Loja declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

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

Autora: Jessica Alejandra Guartanza Loja

Firma: 

Cédula: 1150139341

Fecha: 30 de octubre de 2019

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

Yo, Jessica Alejandra Guartanza Loja, declaro ser autora, de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA.**”, 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 su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital institucional:

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los treinta días del mes de octubre del dos mil diecinueve, firma la autora.

Firma: 

Autora: Jessica Alejandra Guartanza Loja

Número de cédula: 1150139341

Dirección: Loja, El Capulí

Teléfono: (2)546-660

Correo electrónico: jessicaguartanza@gmail.com

Celular: 0967232219

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de grado: Ing. Paulina Fernández Guarnizo Mg. Sc.

Presidenta

Ing. Zhofre Huberto Aguirre Mendoza, Ph. D.

Vocal

Ing. Aurita Geovania Gonzaga Figueroa Mg. Sc.

Vocal

AGRADECIMIENTOS

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

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

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación; especialmente a la Ing. Magaly Yaguana, Ing. Ruth Poma e Ing. José Moreno agradezco por sus orientaciones y apoyo desinteresado en el transcurso de la investigación.

Al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg.Sc., Director de mi Tesis, quien me permitió formar parte del proyecto y por haberme confiado este trabajo, por la paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo.

A los Señores Miembros del Tribunal Calificador, por haber aceptado muy gustosos ser miembros de mi tribunal de grado y por las importantes sugerencias dadas a la presente.

A mi padre, mi madre y mis hermanos quienes en todo momento me apoyaron incondicionalmente, me motivaron a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

Y finalmente, a mis compañeros de la Universidad que durante cinco años de carrera supieron brindarme su apoyo, paciencia y con quienes tuve y tengo la dicha de compartir momentos inolvidables de aprendizaje y diversión.

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

DEDICATORIA

*Esta tesis se la dedico en primer lugar a **Dios** por darme la vida y haberme dado salud para cumplir este sueño tan anhelado, además de su infinito amor, bendición y por haber puesto en mí camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este trayecto.*

*A mí querido padre: **Luis Alberto Guartanza Ch.**, por el ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y por el valor mostrado para salir adelante y no desfallecer en el intento.*

*A mi amada madre: **Sonia Marlene Loja A.**, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.*

*A mis dos hermanos: **Daniela** y **Santiago** quienes fueron la motivación principal de mi esfuerzo y sacrificio para cumplir la meta propuesta; a mi tía Ximena a quien quiero como una segunda madre por su apoyo y amor incondicional; y a mi tío **Juan Ignacio** a pesar de haberlo perdido, sé que desde el lugar en donde este, estará orgulloso de la meta que he llegado a cumplir.*

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

Finalmente, a todos los Ingenieros que marcaron cada etapa de mi carrera universitaria, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de mi tesis.

¡Con Cariño!

Jessica Guartanza L.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| CONTENIDO | pág. |
|--|------|
| CARÁTULA | i |
| CERTIFICACIÓN | ii |
| APROBACIÓN..... | iii |
| AUTORÍA | iv |
| CARTA DE AUTORIZACIÓN | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| DEDICATORIA | vii |
| ÍNDICE GENERAL..... | viii |
| RESÚMEN..... | ix |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Antecedentes históricos de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 4 |
| 2.2. Descripción del género <i>Cinchona</i> | 5 |
| 2.2.1. Descripción botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 5 |
| 2.2.2. Descripción taxonómica de la especie..... | 6 |
| 2.3. Ubicación geográfica y distribución de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 7 |
| 2.4. Usos medicinales de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 7 |
| 2.5. Importancia de la biotecnología vegetal en la propagación de las plantas..... | 8 |
| 2.6. Métodos de propagación | 8 |
| 2.6.1. Propagación sexual..... | 8 |
| 2.6.2. Propagación asexual | 9 |
| 2.6.3. Micropropagación vegetativa " <i>in vitro</i> " | 9 |
| 2.6.4. Ventajas del cultivo " <i>in vitro</i> " | 9 |
| 2.6.5. Desventajas del cultivo " <i>in vitro</i> "..... | 10 |
| 2.6.6. Fases de la micropropagación vegetativa " <i>in vitro</i> " | 10 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.6.6.1. | Preparación de la planta madre | 10 |
| 2.6.6.2. | Desinfección del material vegetal | 11 |
| 2.6.6.3. | Introducción del material <i>in vitro</i> | 11 |
| 2.6.6.4. | Multiplicación de callos | 11 |
| 2.7. | Embriogénesis somática “ <i>in vitro</i> ” | 12 |
| 2.7.1. | Tipos de embriogénesis somática “ <i>in vitro</i> ” | 13 |
| 2.7.1.1. | Embriogénesis directa | 13 |
| 2.7.1.2. | Embriogénesis indirecta | 13 |
| 2.7.2. | Ventajas de la embriogénesis somática “ <i>in vitro</i> ” | 13 |
| 2.7.3. | Desventajas de la embriogénesis somática “ <i>in vitro</i> ” | 13 |
| 2.8. | Estructuras de <i>novo</i> | 14 |
| 2.9. | Cultivo de callos | 14 |
| 2.9.1. | Inducción de callos | 16 |
| 2.10. | Medio de cultivo | 16 |
| 2.11. | Las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962)... | 17 |
| 2.12. | Reguladores de crecimiento | 18 |
| 2.12.1. | Auxinas..... | 18 |
| 2.12.2. | Citoquininas..... | 18 |
| 2.12.3. | Gibberalinas..... | 19 |
| 2.13. | Vitaminas..... | 19 |
| 2.14. | Materiales solidificantes | 19 |
| 2.15. | Explante..... | 20 |
| 2.15.1. | Preparación del explante | 20 |
| 2.15.2. | Escisión del explante | 20 |
| 2.16. | Oxidación fenólica del explante | 21 |
| 2.16.1. | Oxidación fenólica en cultivos de tejidos..... | 21 |
| 2.16.2. | Daños provocados al explante por oxidación fenólica..... | 22 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.17. | Uso de soluciones desinfectantes para el establecimiento <i>in vitro</i> | 22 |
| 2.17.1. | Hipoclorito de sodio | 23 |
| 2.17.2. | Peróxido de hidrógeno..... | 23 |
| 2.18. | Factores que intervienen en el cultivo de tejidos | 24 |
| 2.18.1. | El inóculo o explante | 24 |
| 2.18.2.1. | pH..... | 25 |
| 2.18.2.2. | Humedad | 25 |
| 2.18.2.3. | Luz..... | 25 |
| 2.19. | Estudios similares sobre inducción de callos | 25 |
| 3. | METODOLOGÍA | 27 |
| 3.1. | Ubicación del área de estudio..... | 27 |
| 3.2. | Metodología para la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio | 28 |
| 3.2.1. | Selección del material vegetal | 28 |
| 3.2.2. | Colecta de material vegetal | 29 |
| 3.2.3. | Preparación del medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS, 1962) | 29 |
| 3.2.4. | Desinfección de material vegetal | 30 |
| 3.2.5. | Inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes..... | 31 |
| 3.2.6. | Diseño experimental..... | 33 |
| 3.2.7. | Especificaciones del diseño experimental | 33 |
| 3.2.8. | Hipótesis del modelo | 34 |
| 3.2.9. | Análisis estadístico de datos..... | 34 |
| 3.3. | Metodología para evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., en explantes provenientes de plántulas del invernadero | 35 |
| 3.3.1. | Fase de inducción de callos | 35 |
| 3.3.1.1. | Selección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 35 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.3.1.2. | Preparación del medio de cultivo | 36 |
| 3.3.1.3. | Desinfección de los explantes | 36 |
| 3.3.1.4. | Inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes..... | 37 |
| 3.3.1.5. | Diseño experimental..... | 38 |
| 3.3.1.6. | Especificaciones del diseño experimental..... | 38 |
| 3.3.1.7. | Hipótesis del modelo | 40 |
| 3.3.1.8. | Análisis estadístico | 41 |
| 3.4. | Metodología para la difusión de resultados..... | 41 |
| 4. | RESULTADOS | 42 |
| 4.1. | Desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero | 42 |
| 4.1.1. | Porcentaje de contaminación..... | 42 |
| 4.1.2. | Días a la contaminación | 43 |
| 4.1.3. | Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes | 44 |
| 4.1.4. | Porcentaje de sobrevivencia de explantes | 45 |
| 4.2. | Fase de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero | 46 |
| 4.2.1. | Porcentaje de formación de callo | 46 |
| 4.2.2. | Número de días a la formación de callo | 48 |
| 4.2.3. | Color de callo a los 50 días de evaluación | 49 |
| 4.2.4. | Friabilidad del callo..... | 50 |
| 4.3. | Difusión de información generada | 50 |
| 5. | DISCUSIÓN | 52 |
| 5.1. | Desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., de plántulas provenientes de invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio | 52 |
| 5.2. | Fase de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de plántulas de invernadero | 54 |
| 6. | CONCLUSIONES | 57 |

| | | |
|----|------------------------------|----|
| 7. | RECOMENDACIONES | 58 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 59 |
| 9. | ANEXOS | 72 |

ÍNDICE DE TABLAS

| CONTENIDO | pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog- MS. | 17 |
| Tabla 2. Tratamientos ensayados para la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de invernadero | 31 |
| Tabla 3. Tratamientos ensayados para evaluar la desinfección de explantes de <i>C. officinalis</i> L..... | 32 |
| Tabla 4. Especificaciones del diseño experimental para la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de invernadero. | 33 |
| Tabla 5. Hoja de registro para la toma de datos de las variables de desinfección de explantes inoculados <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.. | 34 |
| Tabla 6. Concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callos en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 35 |
| Tabla 7. Tratamientos aplicados para la inducción de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.. | 38 |
| Tabla 8. Diseño experimental para la inducción de callos en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 39 |
| Tabla 9. Hoja de registro para la toma de datos, en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.. | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| CONTENIDO | pág. |
|--|------|
| Figura 1. A) Árbol de <i>C. officinalis</i> L. B) Hojas de <i>C. officinalis</i> L. C) Flores de <i>C. officinalis</i> L. D) Frutos de <i>C. officinalis</i> L. y E) Semilla de <i>C. officinalis</i> L. | 7 |
| Figura 2. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja..... | 27 |
| Figura 3. Plántulas codificadas del invernadero de <i>C. officinalis</i> L. | 28 |
| Figura 4. Colecta de explantes de <i>C. officinalis</i> L., en el invernadero. | 29 |
| Figura 5. Preparación del medio de cultivo basal sólido | 30 |
| Figura 6. A) Solución fungicida- bactericida B) Sumersión de explantes | 30 |
| Figura 7. Solución PVP | 32 |
| Figura 8. A) Disección de explantes de <i>C. officinalis</i> L. dentro de la cámara, B) Siembra <i>in vitro</i> | 32 |
| Figura 9. Ubicación de los frascos de vidrio en el cuarto de luces para su incubación | 32 |
| Figura 10. Preparación del medio de cultivo MS sólido para inducir callos. | 36 |
| Figura 11. A) Cámara de flujo laminar, B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %. | 37 |
| Figura 12. A) Obtención de ápices y segmentos nodales, B) Siembra <i>in vitro</i> de explantes..... | 37 |
| Figura 13. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 42 |
| Figura 14. Contaminación de explantes por hongo y bacteria. | 13 |
| Figura 15. Curva de contaminación acumulativa de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.. | 13 |
| Figura 16. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de <i>C. officinalis</i> L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación | 45 |
| Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de <i>C. officinalis</i> L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero a los 50 días de evaluación. | 46 |
| Figura 19. Formación de callos a partir de explantes de invernadero de <i>C. officinalis</i> L.. . | 47 |
| Figura 20. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación. | 48 |
| Figura 21. Porcentaje de color de callo de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., evaluados a los 50 días | 49 |
| Figura 22. Formación de callos a los 50 días de evaluación | 49 |
| Figura 23. Porcentaje de friabilidad de callo de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., hasta los 50 días de evaluación. | 50 |
| Figura 24. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL. | 51 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Contenido | pág. |
|--|------|
| Anexo 1. Resultados obtenidos del ensayo de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 30 días de evaluación.... | 71 |
| Anexo 2. Resultados obtenidos del ensayo de oxidación fenólica de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 30 días de evaluación... | 71 |
| Anexo 3. Resultados obtenidos del ensayo de sobrevivencia de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 30 días de evaluación. | 72 |
| Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo inducción de callos de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 30 días de evaluación. . | 72 |
| Anexo 5. Resumen de los resultados obtenidos en los ensayo de desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 30 días de evaluación. | 73 |
| Anexo 6. Siembra <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de invernadero para la fase de desinfección | 73 |
| Anexo 7. Siembra <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de invernadero para la fase de inducción de callos. | 74 |
| Anexo 8. Resultados del ensayo de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de invernadero | 74 |
| Anexo 9. Tríptico | 76 |
| Anexo 10. Folleto técnico | 78 |

**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA
IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN *Cinchona
officinalis* L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL
INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA
PROVINCIA DE LOJA.**

RESÚMEN

Cinchona officinalis L., es una especie nativa de la provincia de Loja, considerada como uno de los géneros de mayor importancia por su valor medicinal, cultural e histórico, conocida como el Árbol Nacional del Ecuador (Anda, 2002); entre los siglos XVII y XIX, debido a la sobreexplotación y alteración de su ecosistema, las poblaciones de *C. officinalis* L., fueron amenazadas, provocando la desaparición de la especie en muchos sitios de la provincia. Actualmente *C. officinalis* L., se encuentra en la categoría amenazada por su alta dificultad de propagación “*in vivo*”, y la muy baja tasa germinación de sus semillas, aunque todavía se pueden encontrar individuos aislados en potreros, formando pequeños relictos boscosos (Menesses, 2017).

La micropropagación vegetal es una herramienta para la conservación de especies amenazadas, mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede incrementar el número de individuos por unidad de superficie de cualquier especie; así como también, permite conservar recursos fitogenéticos que presentan dificultades para propagarse y mantenerse en su medio natural.

Bajo esta perspectiva, la investigación se realizó con el propósito de aportar con protocolos para la micropropagación de *Cinchona officinalis* L., en las fases de implantación e inducción de callos de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, con fines de conservación y mejoramiento genético. El presente trabajo de investigación fue parte del proyecto macro “Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja”, el mismo que se viene ejecutando en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

Para la obtención del material vegetal para la fase de implantación e inducción de explantes de *C. Officinalis* L., se colectaron de plántulas codificadas de 5 a 15 cm de altura del invernadero del sitio de estudio: Uritusinga. En la fase de desinfección de explantes se aplicó hipoclorito de sodio (NaClO) al 25,00 %; 50,00 % y 75,00 % y peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 5,00 %: 10,00 % y 15,00 %, durante 10 minutos respectivamente, los explantes desinfectados se inocularon en medio cultivo sólido de Murashige y Skoog (MS, 1962)

suplementado con vitaminas. La desinfección con NaClO al 50,00 % y 75,00 % durante 10 minutos, resultó más efectivo, en el control de la contaminación de explantes, en un 40,00 %.

Para la fase de inducción de callos, los explantes se cultivaron en medio de cultivo MS sólido, suplementado con la auxina y citoquinina en diferentes concentraciones: 2-4 D en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹ más kinetina al 0,50 mg L⁻¹ respectivamente. Se observó que la combinación de los dos reguladores de crecimiento resultaron efectivos para la obtención de estructuras callogénicas. Así, la combinación de auxina y citoquinina resultó ser la más efectiva, obteniéndose 73,30 % de formación de callos en el tratamiento 7 (3,00 2-4 D mg L⁻¹ + 0,50 mg L⁻¹ KIN).

Palabras Claves: *Cinchona officinalis* L, desinfección, inducción, callos, cascarilla.

ABSTRAC

The Cascarilla, *Cinchona officinalis* L., it is a native species of the province of Loja, considered one of the most important genera for its medicinal, cultural and historical value, known as the National Tree of Ecuador (Anda, 2002); Between the 17th and 19th centuries, due to the over-exploitation and alteration of its ecosystem, the populations of *C. officinalis* L., were threatened, causing the species to disappear in many places in the province. Currently *C. officinalis* L., is in the category threatened by its high propagation difficulty “*in vivo*”, and the very low germination rate of its seeds, although isolated individuals can still be found in pastures, forming small wooded relics (Menesses, 2017).

The Plant Micropropagation is a tool for the conservation of threatened species, by means of *in vitro* culture techniques the number of individuals can be increased per unit area of any species; as well as, it allows to conserve phylogenetic resources that present difficulties to propagate and stay in their natural environment.

Under this perspective, the research was carried out with the purpose of contributing with protocols for the micropropagation of *Cinchona officinalis* L., in the stages of implantation and induction of explant calli from coded seedlings of the greenhouse, for the purpose of conservation and genetic improvement. The present research work was part of the macro project "Biotechnological processes to initiate the genetic improvement of *Cinchona officinalis* L., coming from forested relics of the province of Loja", the same one that is being executed in the Plant Micropropagation Laboratory of the Universidad Nacional of Loja.

To obtain the plant material for the implantation and induction phase of explants of *C. officinalis* L., coded seedlings from 5 to 15 cm high were collected from the greenhouse of the study site: Uritusinga. In the explant disinfection phase, 25,00 % sodium hypochlorite (NaClO) was applied; 50,00 % and 75,00 % and 5,00 % hydrogen peroxide (H₂O₂) for 10,00 % and 15,00 %, for 10 minutes respectively, the disinfected explants were inoculated in solid medium of Murashige y Skoog (MS, 1962) supplemented with vitamins. The disinfection with 50,00 % and 75,00 % NaClO for 10 minutes, was more effective, in the control of explant contamination, by 40,00 %.

For the callus induction phase, the explants were grown in solid MS culture medium, supplemented with auxin and cytokinin in different concentrations: 2-4 D in concentrations of 1,00; 2,00 and 3,00 mg L⁻¹ plus kinetine 0,50 mg L⁻¹ respectively. It was observed that the combination of the two growth regulators were effective in obtaining calligraphic structures. Thus, the combination of auxin and cytokinin was the most effective, obtaining 73,30 % callus formation in treatment 7 (3,00 2-4D mg L⁻¹ + 0,50 mg L⁻¹) KIN).

Key words: *Cinchona officinalis* L, disinfection, induction, calluses, cascarilla.

1. INTRODUCCIÓN

Sudamérica es el centro de origen de muchas especies vegetales utilizadas históricamente para la cura de enfermedades (Vallejo, 1998). Según Buitrón (1999) manifiesta que: Ecuador siendo un país sudamericano, es megadiverso en términos biológicos y culturales, está entre las diecisiete naciones que albergan más del 70,00 % de las especies terrestres y dulceacuícolas conocidas del mundo, pues al ubicarse en la región tropical del mundo y contar con costas bañadas por corrientes marinas cálidas y frías, propician su condición de país megadiverso. Además, es determinante la presencia de la cordillera de los Andes, cuyas cadenas montañosas originan diversos ecosistemas y microclimas (Ecociencia, 2000).

Ecuador ha dado origen a uno de los medicamentos más importantes para la humanidad a través de la cascarilla, cuyo compuesto quinina, fue descubierto en el siglo XVII, para la cura del paludismo y considerada como uno de los principales productos forestales del Ecuador, siendo económicamente importante desde el punto de vista medicinal, simbolizando el origen histórico del “árbol de la vida” o “planta salvadora de la humanidad” (Buitrón, 1999).

Una de las provincias que alberga mayor biodiversidad es Loja, localizada en la Región Sur del país, su diversidad biológica está influenciada por diversos factores tales como: 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 biodiversidad se encuentra *C. officinalis* L., especie nativa de Loja, considerada como uno de los géneros de mayor importancia por su valor medicinal (Nieto, 2000; Taylor, 2005). Actualmente, quedan poblaciones pequeñas que han sobrevivido a la sobreexplotación en los cerros del Nudo de Cajanuma (Loaiza y Sánchez, 2006) y a la presión antrópica sobre los bosques en los hábitats que se ha visto influida por la agricultura migratoria y maderera, haciéndose cada vez más escasa su presencia en las zonas de distribución (Epiquién, 2009). Así mismo, las actividades antrópicas han tenido un impacto más significativo en la destrucción de su hábitat (Madsen, 2002); causando la reducción del

hábitat de *C. officinalis* L., afectando a la germinación de individuos en las poblaciones remanentes (Reaka-Kudla, Wilson y Wilson, 1996; Rentería, 2002). El futuro de *C. officinalis* L., en el Ecuador es incierto, ya que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración; por lo que, está catalogada como una especie amenazada (Valencia *et al.*, 2000).

Por lo tanto, existe una necesidad de investigar metodologías alternativas que permitan su multiplicación y conservación de *Cinchona officinalis* L., aplicando para ello la técnica biotecnológica denominada propagación *in vitro*, la misma que aplicada a especies vegetales permite obtener plantas libre de patógenos, 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.

Cabe señalar que esta investigación a nivel de pregrado se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, desde noviembre 2018 hasta agosto 2019, la misma que formó parte del proyecto macro de investigación titulado: “Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja”.

En este contexto se presenta información de protocolos sobre procesos biotecnológicos para la desinfección e inducción de callos en *C. officinalis* L., a partir de plántulas *ex vitro* que crecen en el invernadero, con la finalidad de brindar pautas y obtener alternativas de multiplicación *in vitro*, mejoramiento genético y conservación de la Cascarilla, para lo cual se han planteado los siguientes objetivos que se detallan a continuación.

Objetivo General

- Contribuir a la generación de información sobre procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

Objetivos Específicos:

- Ensayar la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio.
- Evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas del invernadero.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes históricos de *Cinchona officinalis* L.

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

Los únicos indicios encontrados en los archivos que nombran las expediciones prehispánicas indican que los habitantes de la Cultura Palta fueron los descubridores de la cascarilla y la utilizaron con eficacia en el campo de la medicina natural, y que, de Loja, en la época de la Colonia, fue llevada a Lima desde donde se propagó su fama terapéutica que después trascendió a España. Un indígena de Malacatos, bautizado como Pedro de Leyva, cacique de Rumishitana, también afectado por las fiebres, dio a conocer a los españoles las propiedades de la quina. Mientras estaba en Lima, tuvo la oportunidad de presentar la corteza a los jesuitas que, al percatarse de la importancia curativa de la planta, la difundieron a la humanidad. El remedio se extendió en Europa y empezó a ser conocido como "los polvos de los jesuitas", "polvos de la condesa" o "polvos del cardenal" y, disuelto en algún licor o como infusión, era suministrado a los enfermos pudientes (Larreátegui y Lafuente, 2013).

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

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

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 un género de plantas fanerógamas, pertenece a la familia RUBIACEAE y es nativo de los valles andinos de Sudamérica (Buitrón, 1999; Jager *et al.*, 2007). 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 metro hasta los 2000 metros sobre el nivel del mar (Garmendia, 2005).

Estos árboles de quina o cascarilla en estado natural constituyen pocas veces bosques por sí mismos, generalmente forman grupos esparcidos en medio del bosque, llamados manchas (Campos, *et al.* 2014).

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

2.2.1. Descripción botánica de *Cinchona officinalis* L.

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

Nombre común: cascarilla, quinina.

Nombre científico: *Cinchona officinalis* L.

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Gentianales.

Familia: Rubiácea.

Género: *Cinchona*.

2.2.2. Descripción taxonómica de la especie

Según 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., es:

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.

Las formas 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 (Ver figura 1).

Jorgensen (1999) señala que: El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los árboles de 6 a 8 años pueden alcanzar 12 m de altura. Las ramas principales parten del tronco a una altura de más o menos 6 m, puesto que las ramas bajas son desechadas continuamente.

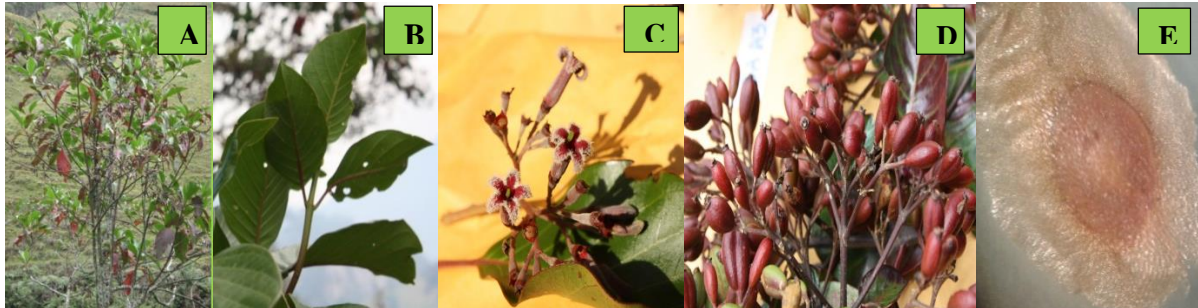


Figura 1. A) Árbol de *C. officinalis* L. B) Hojas de *C. officinalis* L. C) Flores de *C. officinalis* L. D) Frutos de *C. officinalis* L. y E) Semilla de *C. officinalis* L.

2.3. Ubicación geográfica y distribución de *Cinchona officinalis* L.

Cinchona es un árbol o arbusto nativo de los andes encontrados entre los 1000 y 3500 m.s.n.m en el Ecuador está ampliamente distribuido en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja.

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

2.4. Usos medicinales de *Cinchona officinalis* L.

Cinchona officinalis L., es una planta que se utiliza para la producción de quinina, un agente antifebri especialmente útil en la prevención y tratamiento del paludismo. 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 (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).

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 ADN (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).

2.6. Métodos de propagación

Existen tres tipos de propagación de plantas que se observan en la naturaleza: sexual (por semilla) y asexual (vegetativamente), en las cuales se puede lograr una diversidad de técnicas de siembra dependiendo del tipo de especie que se vaya a propagar y micropropagación *in vitro* (Mulliken, 1998).

2.6.1. Propagación sexual

Para la reproducción sexual se necesita de la existencia de sexos (masculino y femenino), que a través del proceso de polinización- fecundación, se da la formación de la semilla, la cual dará origen a una nueva planta, es decir, que la propagación se hace por medio de semillas (Cruz y Irigoyen, 2005).

2.6.2. Propagación asexual

También llamada reproducción vegetativa, se da por simple fragmentación de la planta madre, en donde las plantas hijas son idénticas a la madre, al no existir intercambio de material genético. La forma más sencilla consiste en la simple partición de secciones del tallo, que a su vez enterradas consiguen enraizar. Se trata de un fenómeno muy extendido entre las plantas vasculares. Las formas más comunes de propagación vegetativa son: por medio de estacas, esquejes, injertos, uso de acodos; por medio de raíces y por cultivo de tejidos (Cruz y Irigoyen, 2005).

2.6.3. Micropropagación vegetativa "*in vitro*"

El término “cultivo *in vitro* de tejidos” significa cultivar algunas partes de las plantas también llamados “explantes”, como segmentos de hoja, tallo y raíces, además de otros tejidos u órganos vegetales, dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, en los que deben de controlarse la asepsia, el crecimiento y el desarrollo de estos diferentes tejidos. No deben de crecer microorganismos como bacterias y hongos, y los tejidos o plantas deben de mostrar un óptimo desarrollo (Salgado, 2009).

Es el sistema de propagación vegetativa más recientemente implementado, pero que por razones de costo no ha desplazado el uso de los sistemas tradicionales, especialmente en árboles forestales; cuya reproducción masiva en viveros es más ventajosa desde un punto de vista económico. Estas técnicas modernas son 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, por semilla (Gonzales y Vilca, 1998).

La micropropagación requiere 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 *et al.*, 1987).

2.6.4. Ventajas del cultivo "*in vitro*"

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.

- 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.
- 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 o altas (Mejía, 1988).

2.6.5. Desventajas del cultivo "*in vitro*"

Según un estudio realizado por Wegier (2013) las principales desventajas del cultivo *in vitro* son:

- 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
- Necesidad de hacer una evaluación del costo beneficio de las técnicas que se van a utilizar.

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

2.6.6.1. Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener 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).

2.6.6.2. Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre 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 trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad (Castillo, 2004).

2.6.6.3. Introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. 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).

2.6.6.4. Multiplicación 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 10 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 (Pérez *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 1988).

2.7. Embriogénesis somática “*in vitro*”

La embriogénesis somática asexual o adventicia, consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones a partir del cultivo de células que no son el producto de una fusión gamética. Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta, así podemos utilizar como explantes: ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas reproductivas (Sánchez, 2000).

2.7.1. Tipos de embriogénesis somática “*in vitro*”

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta.

2.7.1.1. Embriogénesis directa

La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (Smith y Wood, 1998).

2.7.1.2. Embriogénesis indirecta

La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (Agúndez *et al.*, 1999).

2.7.2. Ventajas de la embriogénesis somática “*in vitro*”

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas; una enorme capacidad de multiplicación aplicable a la industria, es la que se produce a nivel de bioreactores, que permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, y que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente por un largo periodo (Rajora, 1999).

2.7.3. Desventajas de la embriogénesis somática “*in vitro*”

Presentan una serie de problemas, produciéndose anormalidades morfológicas, fisiológicas y genéticas en los cultivos, fenómenos de poliembrionía indeseables, falta de maduración y dormancia o germinación prematura de los embriones en cultivo (Agúndez *et al.*, 1999).

2.8. Estructuras de *novo*

Se denomina estructuras de *novo* al brote adventicio que se obtiene de una célula callogénica en base al potencial para regenerar una nueva planta completa (totipotencia celular) (Aguilera, 2012).

2.9. Cultivo de callos

Un callo es la masa celular amorfa que se forma a partir de explantes colocados en un medio de cultivo suplementado con reguladores de crecimiento (Razdan, 2003).

Cuando el explante se coloca en el medio de cultivo que contiene los reguladores de crecimiento, se desencadenan una serie de procesos y el metabolismo de las células que se encontraba en reposo cambia y comienza una división celular activa. Durante este proceso las células diferenciadas y especializadas cambian su estado y se convierten en células no especializadas (George, 2008).

Durante el desarrollo del callo se pueden observar las siguientes fases: inducción: donde las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento tanto en número como en tamaño; desdiferenciación y proliferación celular: que es cuando el callo aumenta su masa celular al máximo; inducción de la diferenciación: en la cual se obtienen meristemos, embriones y tejido vascular a partir de la masa celular del callo; y la fase de envejecimiento donde se pierde la capacidad de crecimiento acelerado (Ziv y Chen, 2008).

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis 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 se diferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizadas, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

En todas las fases del cultivo de callo, el genotipo juega un papel importante para llegar a obtener éxito, por la cual se debe siempre trabajar durante la investigación con 2 a 3 genotipos a la vez. Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones

nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos, dependiendo fundamentalmente del balance hormonal auxina-citocinina en el medio de cultivo (Litz y Jarret, 1991).

Se ha formado callos utilizando tipos de explantes, prácticamente de todas las partes de una planta. Independientemente del explante usado, la edad de este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado, contribuyen a la formación del callo. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente está situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada. La tendencia es a emplear tejidos más indiferenciados y los más jóvenes posibles, lo cual ha permitido obtener éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes especies anteriormente consideradas “recalcitrantes (Heinz y Mee, 1969).

El callo puede tener diferentes apariencias y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, así como las condiciones de cultivo *in vitro*. El color varía de blanco, blanco amarillento a pardo. Su apariencia puede ser acuosa (callos que no regeneran) o compactos, secos y nodulares. La fase de formación de los callos es de forma general la menos importante, pues consiste en solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina “potente” (2,4 diclorofenóxiacético, Dicamba, picloram); sin embargo, lograr multiplicarlo con buen crecimiento y al final obtener plantas, son las fases o etapas más difíciles (Litz y Jarret, 1991).

Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 30-40 días en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2-5 mm. Generalmente según Heinz y Mee (1969) recomienda emplear el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación de los callos.

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 (Gómez, 1996). Así mismo, en el medio propuesto por Payán *et al.*, (1977) pudo comprobarse que la capacidad de los callos para regenerar plántulas es mayor cuando la inducción se realiza a los 3 meses (85,56 %) potencialidad que se reduce a menos de la mitad a los 10 meses (28,76 %). Además, de una disminución gradual en la potencialidad de los cultivos de callo para regenerar plántulas en el lapso estudiado, también

hubo cambios en el patrón de diferenciación. Desde el tercero al quinto mes no se encontraron cultivos que regeneraran raíces; fenómeno que apareció en cultivo de seis meses y que fue incrementándose gradualmente.

2.9.1. Inducción de callos

El cultivo de callos puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal. La producción de callo requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, como un trozo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Correia y Canhoto, 2010). Además, aunque con menor frecuencia, se han utilizado tejidos florales como estambres, pétalos y ovarios (Stefanello *et al.*, 2005). En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de desdiferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación (Larson *et al.*, 2006; Feeney *et al.*, 2007; Rashmi y Trivedi, 2014).

2.10. Medio de cultivo

Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Son esenciales en el laboratorio de microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Ecuare, 2005).

Un medio de cultivo puede estar formado principalmente por sales minerales, compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y material inerte (Roca, 1991). 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).

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 no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (Figuroa, 2015).

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

2.11. Las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962)

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), compuestos de las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), conocido como medio MS (Tabla 1).

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

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

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

2.12. Reguladores de crecimiento

2.12.1. 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). El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El ácido α -naftalenacético (ANA), una auxina sintética, se utiliza ampliamente en horticultura para estimular la formación de raíces adventicias (Pierik *et al.*, 1984; Sagee *et al.*, 1992; Bandurski *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996; Acosta *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Barket *et al.*, 2007).

El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (Jácome, 2011).

2.12.2. 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). Además, son utilizadas 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 meristemas 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).

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).

2.12.3. Gibberelinas

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 Gibberelinas especialmente el AG3, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Roca, 1993).

2.13. 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 utilizadas con frecuencia para estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, riboflavina (Abdelnour, 1994).

En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100,00 ppm, entre otros compuestos benéficos se encuentra el ácido pantoténico (0,10 ppm) y la biotina (0,10 ppm). Todos estos materiales son solubles en agua y se deben preparar como soluciones concentradas (Hartman, 1997).

2.14. Materiales solidificantes

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

2.15. Explante

Explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, como un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (Narváez, 2009; Ramos, 2012).

Según Suarez (2011), el manejo de los explantes se realiza de dos formas: preparación del explante y escisión del explante.

2.15.1. Preparación del explante

Una vez seleccionada la parte de la planta, se limpia y lava cuidadosamente, se elimina parte del tejido externo y se procede a la desinfección superficial.

2.15.2. Escisión del explante

Luego de haber realizado el enjuague, el tejido se puede colocar sobre un papel filtro y luego proceder al aislamiento del explante que se desea cultivar e introducir en el medio de cultivo destinado para su desarrollo; este proceso se debe realizar dentro de la cámara de flujo y con todo el material esterilizado. El éxito en el cultivo *in vitro*, en parte está influenciado por factores inherentes al explante, incluido el tamaño, el estado de desarrollo de la planta, la edad fisiológica del explante, la fuente del órgano o tejido y el genotipo (Conger, 1981; George y Sherrington, 1984).

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

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

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

2.16. Oxidación fenólica del explante

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.

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000).

2.16.1. Oxidación fenólica en cultivos 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*.

2.16.2. 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.

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

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

Para establecer cultivos asépticos es conveniente; trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivos más comúnmente en la autoclave a una presión de 15 kg/cm². Durante 15 a 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida; desinfectar los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y realizar los cultivos con ciertas normas de asepsia (Roca, 1991).

Existen una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes; los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO) del 1,00 % al 3,00 %, hipoclorito de calcio (CaClO) de 6,00 % a 12,00 %, peróxido de hidrogeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH), y bicloruro de mercurio (HgCl₂) de 0,10 % a 1,50 %, entre otros. Los tres primeros se emplean en tiempos de 10 a 20 minutos; el alcohol se usa generalmente al 70,00 % y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es altamente tóxico y no es fácilmente removible del explante, se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0,10 % a 1,50 % durante 1 a 3 minutos). De estos desinfectantes el hipoclorito de sodio ha sido el más usado por los investigadores en el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales a concentraciones y tiempos diferentes (Roca, 1991; Roca y Mroginski, 1993).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween - 20 (0,01 % al 0,10 %) con el objetivo de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante; pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol al 70,00 %; asimismo, es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante. Terminado el tiempo de inmersión del explante en las soluciones desinfectantes se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar restos del mismo, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos (Roca, 1991).

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

2.17.1. Hipoclorito de sodio

El Hipoclorito de sodio (NaClO) en cultivo de tejidos es muy utilizado, porque proporciona la muerte de microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, permitiendo que exista un mayor índice de establecimiento en el material vegetal. El NaClO es un producto efectivo, de bajo precio y de fácil adquisición en el mercado, son probablemente los compuestos liberadores de halógenos mejor conocidos y figuran entre los desinfectantes más antiguos. Sin embargo, dependiendo del tipo de tejido, su procedencia y otros factores, se tendrá un mayor o menor grado de éxito cuando los explantes se sometan al proceso de desinfección. Son extremadamente efectivos frente a todo tipo de microorganismos, pero pierden gran parte de su actividad en presencia de materia orgánica (Borges *et al.*, 2009).

2.17.2. Peróxido de hidrógeno

En cuanto a la utilización del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se ha comprobado que es bactericida y fungicida, previniendo la proliferación de algunos hongos (HRM, 1993; Muñoz *et al.*, 2009; Gisbert *et al.*, 2011). Barnett (1976), Barnett (1998) recomienda el uso de peróxido de hidrógeno como un buen desinfectante de semillas forestales, incluso como estimulante de la germinación en algunas semillas de pino, porque ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno, facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su

conversión a carbohidratos, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para movilización de componentes celulares involucrados en el crecimiento de la raíz (Flores, 2008); el peróxido de hidrógeno parece tener un efecto favorecedor en la germinación de las semillas de todas las especies.

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

En concentraciones del 10,00-20,00 % de H_2O_2 produce quemaduras a los tejidos expuestos (ASTRE, 2004). Un factor importante cuando se aplica H_2O_2 es la agitación de la semilla puesto que se minimiza la demanda química del oxígeno (Rodríguez *et al.*, 2004), la velocidad de agitación es importante pues asegura un suministro adecuado del oxígeno (Sánchez, 2004). Cuando se hace la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por bacterias (Riofrío, 2004).

2.18. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos

2.18.1. El inóculo o explante

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células 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.

2.18.2. Factores físicos

2.18.2.1. pH

Es el grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y específica 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 (Aguilera, 2012).

2.18.2.2. Humedad

En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es de casi el 100,00 %, por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.18.2.3. Luz

Las 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).

2.19. Estudios similares sobre inducción de callos

Jácome (2012) realizó estudios para el establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de *Podocarpus oleifolius* como estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito, en donde determinó que el mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* meristemas apicales de la especie mencionada es la aplicación de hipoclorito de sodio a una concentración de 1,00 % durante 10 minutos con un lavado previo de las yemas apicales en una solución detergente durante 40 minutos. Además, menciona que la mejor formulación nutritiva para el establecimiento e inducción de callogénesis *in vitro* de meristemas apicales es el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) a una concentración completa.

En la investigación de González (2017) denominada: Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja” menciona que la combinación de auxinas y citoquininas resultó ser la más efectiva para inducir callos a partir de segmentos nodales, obteniéndose el 65,00 % de formación de callos con la combinación de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ BAP.

Así mismo, en el estudio realizado por Méndez (2018) denominada: Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de *novo* de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja menciona que el medio de cultivo de Murashige y Skoog suplementado con reguladores de crecimiento en concentraciones de ANA $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ + $0,00 \text{ BAP}$ logró ser la más efectiva para la formación de callos obteniéndose un 70,00 %.

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del área de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, ubicado a 3 km, al sur de la ciudad de Loja, en las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S - 79° 12' 00" O (Figura 2) (Díaz, 2012).

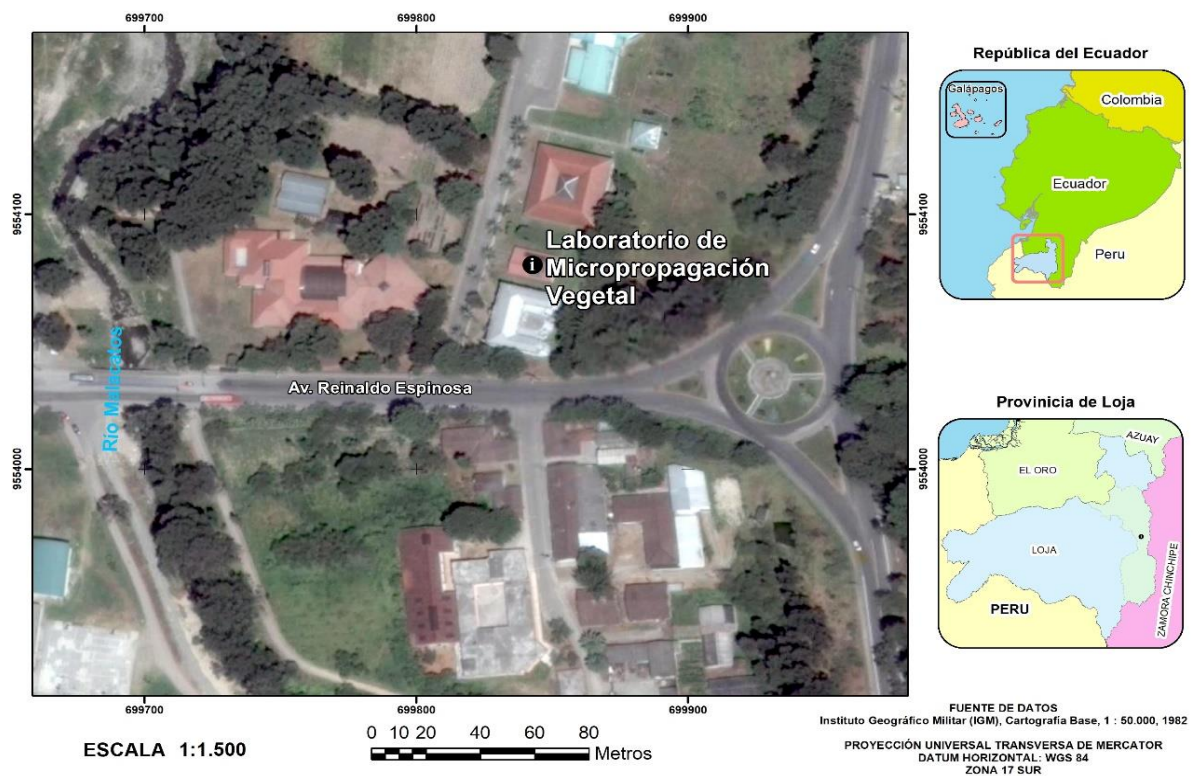


Figura 2. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

3.2. Metodología para la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio

3.2.1. Selección del material vegetal

Se seleccionó plántulas del invernadero, provenientes de árboles codificados de *Cinchona officinalis* L., del relicto boscoso ubicado en el sitio Uritusinga, cuyas coordenadas geográficas son: 55°33'79" S; 70°24'92" O, los mismos que fueron seleccionados previamente por el proyecto de investigación macro de *Cinchona*, en base a las mejores características fenotípicas y de fisiología reproductiva. Los explantes fueron recolectados de las plántulas codificadas del invernadero, que se encuentra adjunto al laboratorio de micropropagación vegetal, de una altura de 5 a 15 cm, las mismas que se obtuvieron de la germinación de semillas y que presentaron características morfológicas adecuadas, de acuerdo a como se muestran en la figura 3.



Figura 3. Plántulas codificadas del invernadero de *C. officinalis* L.

3.2.2. Colecta de material vegetal

Las plántulas seleccionadas fueron tratadas con fungicida ($2,00 \text{ g L}^{-1}$ Benomil) y bactericida (Kasumin $1,00 \text{ \% L}^{-1}$) un mes antes de la colecta. Se colectaron hojas, brotes axilares y brotes terminales, los mismos que fueron llevados al laboratorio para la desinfección (Figura 4).



Figura 4. Colecta de explantes de *C. officinalis* L., en el invernadero.

3.2.3. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962)

Se utilizó el medio de cultivo basal sólido con las sales minerales de MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con tiamina $1,00 \text{ mg L}^{-1}$; mio-inositol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$; sacarosa $2,00 \text{ \%}$ (como fuente exógena de carbono); $100,00 \text{ mg L}^{-1}$ ácido cítrico; $150,00 \text{ mg L}^{-1}$ ácido ascórbico (agentes antioxidantes); agar $5,80 \text{ g L}^{-1}$ (agente solidificante), cloranfenicol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$ (para evitar contaminación); y, el pH se ajustó a $5,80 \pm 0,20$ con hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Se distribuyó 30 ml del medio de cultivo por frasco de vidrio, posteriormente se esterilizó en la autoclave a 120°C de temperatura y 1,50 kg/cm² de presión, durante 20 minutos (Figura 5).

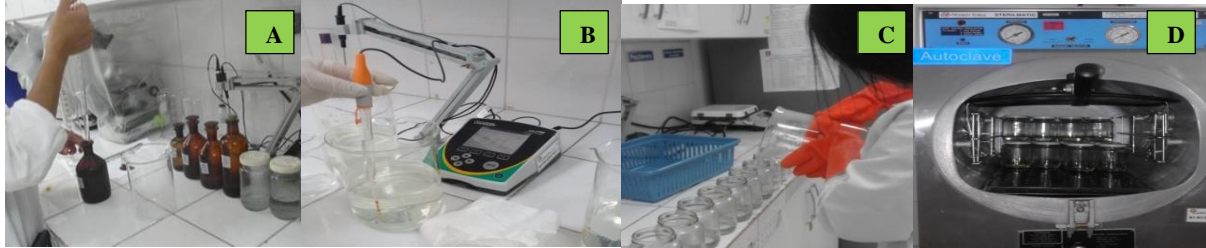


Figura 5. Preparación del medio de cultivo basal sólido MS. A) Colocación de sales del MS, B) Ajuste de pH, C) Distribución en los frascos de vidrio, D) Esterilización.

3.2.4. Desinfección de material vegetal

Previo a la desinfección del material vegetal, en la cámara de flujo laminar se realizó un enjuague con agua corriente para retirar los residuos de tierra. Además, los explantes se sumergieron en una solución fungicida – bactericida (Benomil 2,00 g L⁻¹ Kasumin 1,00 %) por cinco minutos (Figura 6), se realizó un enjuague con agua destilada a fin de retirar residuos de la solución, finalmente se sumergió los explantes en una solución de polyvinylpyrrolidone (PVP) por 5 minutos (Figura 7).

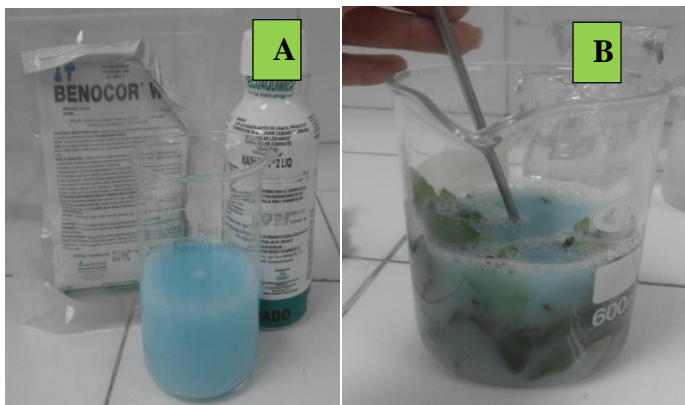


Figura 6. A) Solución fungicida- bactericida B) Sumersión de explantes.



Figura 7. Solución PVP

En esta fase se probó el efecto de dos desinfectantes: hipoclorito de sodio al 25,00 %; 50,00 % y 75,00 % y peróxido de hidrógeno al 5,00 %; 10,00 % y 15,00 %, con el propósito de

controlar la contaminación de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, en un tiempo de inmersión de 10 minutos en todos los tratamientos.

La desinfección de los explantes se realizó en la cámara de flujo laminar, para lo cual los explantes fueron sumergidos en alcohol al 70,00 % por un minuto, seguido de un enjuague con agua destilada estéril, seguidamente los explantes se sumergieron en la solución desinfectante de acuerdo a cada tratamiento y finalmente se eliminó la solución desinfectante con tres enjuagues con agua destilada estéril (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos ensayados para la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de invernadero.

| TRATAMIENTOS | CONCENTRACIÓN DEL DESINFECTANTE | | TIEMPO (Minutos) |
|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| | NaClO (%) | H ₂ O ₂ (%) | |
| T1 | 25,00 | - | 10 |
| T2 | 50,00 | - | 10 |
| T3 | 75,00 | - | 10 |
| T4 | - | 5,00 | 10 |
| T5 | - | 10,00 | 10 |
| T6 | - | 15,00 | 10 |

3.2.5. Inoculación e incubación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar, para ello, sobre una caja petri se diseccionó con un bisturí, eliminando los segmentos necrosados, obteniendo explantes de 2 a 3 cm de longitud, y se sembraron 2 explantes por frasco, dando un total de 180 explantes en el ensayo (Figura 8).

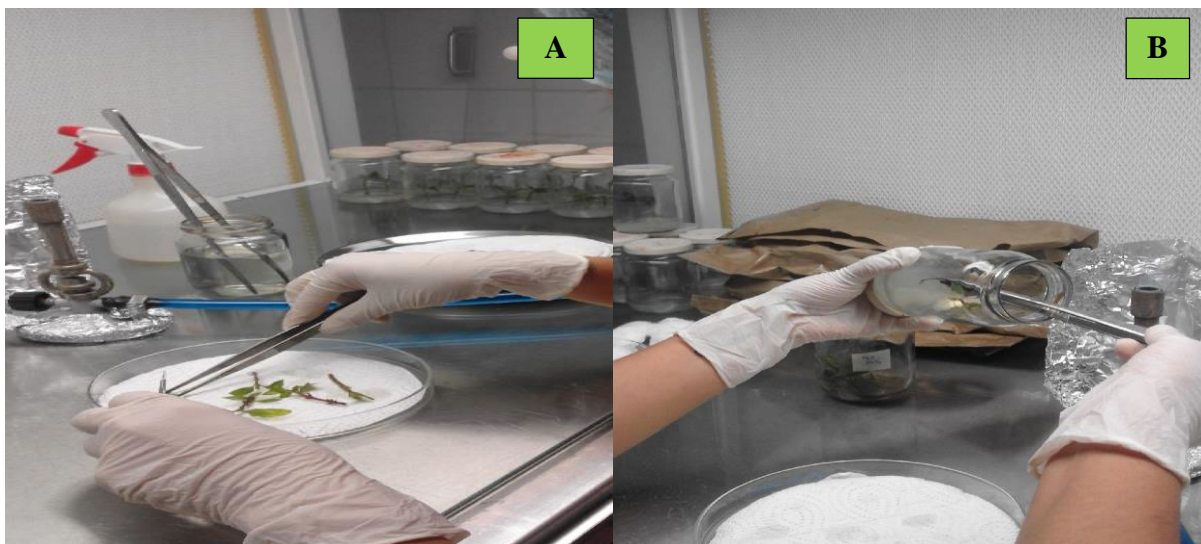


Figura 8. **A)** Disección de explantes de *C. officinalis* L. dentro de la cámara, **B)** Inoculación *in vitro*.

Se identificó cada frasco según su tratamiento y se procedió a ubicarlos en el cuarto de luces o cuarto de incubación (Figura 9), donde se mantuvo a una temperatura de ± 23 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 30 días.



Figura 9. Ubicación de los frascos de vidrio en el cuarto de luces para su incubación.

3.2.6. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 6 tratamientos y 3 repeticiones. En la Tabla 3, se muestran los tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., usando hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno en 10 minutos de inmersión.

Tabla 3. Tratamientos ensayados para evaluar la desinfección de explantes de *C. officinalis* L.

| TRATAMIENTO (T) | DESCRIPCIÓN | CÓDIGO* |
|-----------------|--|---------|
| T1 | 25,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T1D1C1 |
| T2 | 50,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T2D1C2 |
| T3 | 75,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T3D1C3 |
| T4 | 5,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T4D2C1 |
| T5 | 10,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T5D2C2 |
| T6 | 15,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T6D2C3 |

* T=Tratamiento, D=Desinfectante; C= Concentración.

3.2.7. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue un frasco de vidrio formado con dos explantes, cada tratamiento estuvo conformado por 30 explantes, dando un total de 180 explantes del ensayo (Tabla 4).

Tabla 4. Especificaciones del diseño experimental para la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del invernadero.

| | |
|---|-----|
| Unidad experimental (un frasco de Vidrio) | 1 |
| Número de tratamientos | 6 |
| Numero de repeticiones | 3 |
| Número de unidades experimentales por tratamiento | 15 |
| Numero de explantes por unidad experimental | 2 |
| Número total de explante/tratamiento | 30 |
| Número total de explantes ensayo | 180 |
| Número total de frascos de vidrio | 90 |

(Di Rienzo et al., 2016); se realizó un análisis de varianza no paramétrico y la prueba estadística con el test de bonferroni al 5,00 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar la existencia de diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.3. Metodología para evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., en explantes provenientes de plántulas del invernadero

El objetivo de este ensayo fue determinar el balance hormonal adecuado auxina y citoquinina: 2,4-D ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina (KIN), en diferentes concentraciones, con el propósito de inducir la formación de callos (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L.

| TRATAMIENTO | REGULADORES DE CRECIMIENTO | |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | 2,4-D (mg L ⁻¹) | KINETINA (mg L ⁻¹) |
| T1 | 1,00 | 0,00 |
| T2 | 2,00 | 0,00 |
| T3 | 3,00 | 0,00 |
| T4 | 1,00 | 0,50 |
| T5 | 2,00 | 0,50 |
| T6 | 3,00 | 0,50 |
| T7 | 0,00 | 0,00 |

3.3.1. Fase de inducción de callos

3.3.1.1. Selección de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Para esta fase se utilizó explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, aplicando el mejor método de desinfección de la fase de implantación. Se colectaron hojas, brotes axilares, brotes terminales y fueron llevados al laboratorio para la desinfección.

3.3.1.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo sólido con las sales minerales de MS, suplementado con tiamina $1,00 \text{ mg L}^{-1}$; mio-inositol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$; piridoxina $1,00 \text{ mg L}^{-1}$; ácido nicotínico $2,00 \text{ mg L}^{-1}$; glicina $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ y ergostín $1,50 \text{ mg L}^{-1}$, sacarosa $2,00 \%$ (como fuente exógena de carbono), agar $6,00 \text{ g L}^{-1}$ (agente solidificante), cloranfenicol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$ (para evitar contaminación); auxinas y citoquininas: 2,4-D y KIN en diferentes concentraciones (Figura 10). Se ensayó cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno. El pH se ajustó a $6,50 \pm 0,20$ con NaOH 1N.

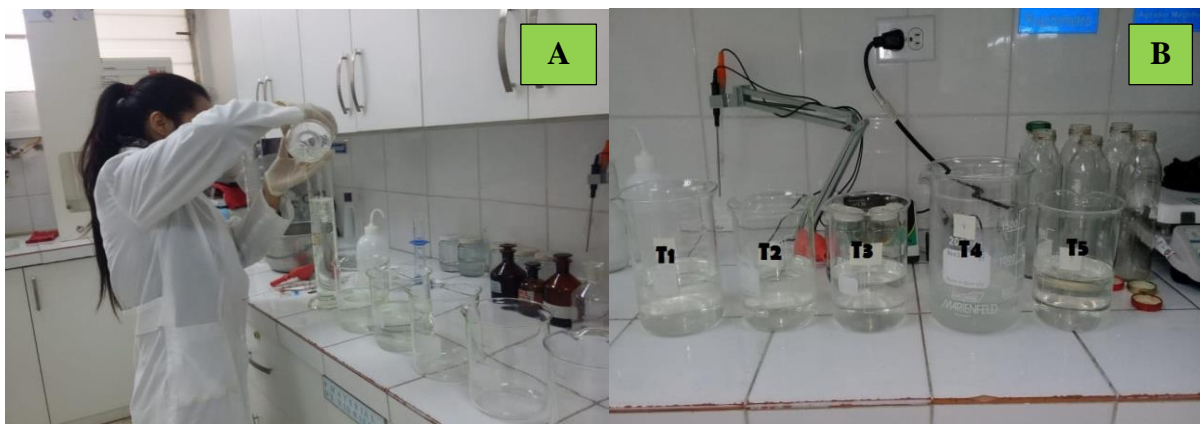


Figura 10. **A)** Preparación del medio de cultivo MS sólido para inducir callos. **B)** Tratamientos con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas.

El medio de cultivo se distribuyó 25 ml en 105 frascos, luego fue esterilizado en la autoclave a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $1,50 \text{ kg/cm}^2$ de presión, durante 20 minutos, conjuntamente con el material de vidriería, disección y fungible necesarios para la inoculación *in vitro*.

3.3.1.3. Desinfección de los explantes

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

Posteriormente en la cámara de flujo laminar se aplicó el protocolo de desinfección de explantes, sumergiendo en alcohol al 70,00 % por un minuto, luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril, seguidamente se aplicó la solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaClO) al 50,00 % (Figura 11) por 10 minutos, finalmente se realizó 2 enjuagues con agua destilada estéril y un enjuague con PVP, para posteriormente realizar la siembra *in vitro*.



Figura 11. A) Cámara de flujo laminar B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %.

3.3.1.4. Inoculación e incubación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar; para ello, con la ayuda de un bisturí se eliminó las partes necrosadas del material vegetal; y, luego, sobre una caja petri con papel absorbente se diseccionó, con el fin de obtener ápices y segmentos nodales de un cm con hojas (explantes); inoculándose 2 explantes por frasco (Figura 12).

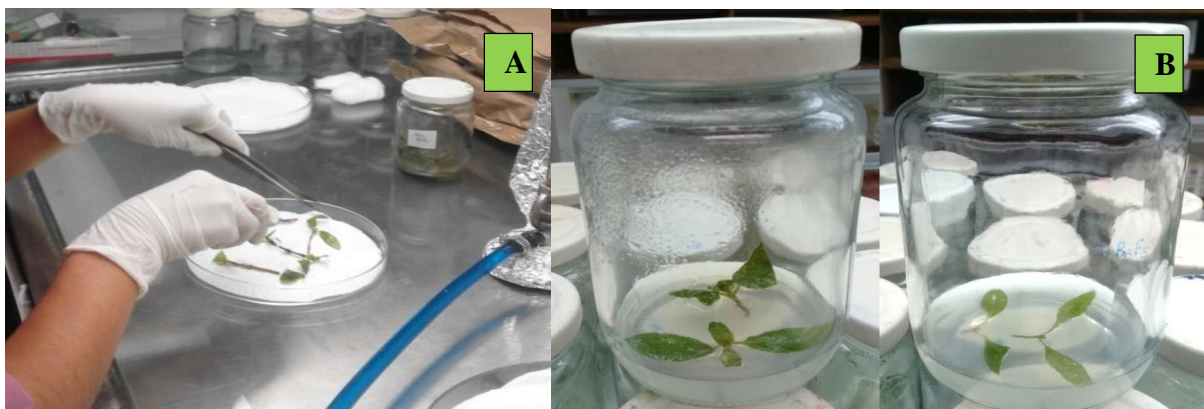


Figura 12. A) Obtención de ápices y segmentos nodales B) Siembra *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

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

3.3.1.5. Diseño experimental

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

Tabla 7. Tratamientos aplicados para la inducción de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

| TRATAMIENTO (T) | CONCENTRACIÓN | CÓDIGO* |
|-----------------|---|---------|
| T1 | 0,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L ⁻¹ KINETINA | TT |
| T2 | 1,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L ⁻¹ KINETINA | A1C1 |
| T3 | 2,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L ⁻¹ KINETINA | A2C1 |
| T4 | 3,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L ⁻¹ KINETINA | A3C1 |
| T5 | 1,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L ⁻¹ KINETINA | A1C2 |
| T6 | 2,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L ⁻¹ KINETINA | A2C2 |
| T7 | 3,00 mg L ⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L ⁻¹ KINETINA | A3C2 |

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

3.3.1.6. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue un frasco de vidrio con dos explantes, cada tratamiento estuvo formado por 30 explantes, dando un total de 210 explantes del ensayo (Tabla 8).

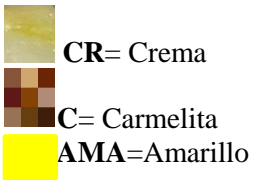
Tabla 8. Diseño experimental para la inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L.

| | |
|---|-----|
| Unidad experimental (un frasco de vidrio) | 1 |
| Número de tratamientos | 7 |
| Número de repeticiones | 3 |
| Número de unidades experimentales por tratamiento | 15 |
| Número de explantes por unidad experimental | 2 |
| Número total de explantes /tratamiento | 30 |
| Número total de explantes del ensayo | 210 |
| Número total de frascos | 105 |

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

Sin embargo, para la evaluación de la contaminación, oxidación fenólica y sobrevivencia de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se tomó registros durante 30 días, a partir del tercer día de la inoculación (Tabla 5). En la Tabla 9 se presenta la hoja de registro de datos que se utilizó en la fase de inducción de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Tabla 9. Hoja de registro para la toma de datos, en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L.

| INDUCCION DE CALLOS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|-----------|-------------|-----------------------|----|----|----|----|----|--|----|----|---|-----------------|----|----|----|----|----|--|----|---|----|----------------------|----|----|----|----|----|----|--|--|--|
| FECHA DE SIEMBRA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SITIO DE EXPLANTES: | | | | | | | | | | | | | | # EXPLANTES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TRATAMIENTO | REPETICIÓN | N° FRASCO | N° EXPLANTE | % FORMACION DEL CALLO | | | | | | | | | | COLOR DEL CALLO | | | | | | | | | | APARIENCIA DEL CALLO | | | | | | | | | |
| | | | | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 50 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 50 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 50 | | | |
| T n | R 1 | F1 | E.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | E.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | F2 | E.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | E.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | F3 | E.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | E.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | F4 | E.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | E.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | F5 | E.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | E.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FORMACIÓN DE CALLO: 0= 0,00 % Sin formación 1= 50,00 %: regular (formado callo 1 explante) 2 = 100,00 %: muy bueno (formado callo 2 explantes). | | | | | | | | | | COLOR:  | | | | | | | | | | APARIENCIA: F= Friable NF= No Friable | | | | | | | | | | | | | |

3.3.1.7. Hipótesis del modelo

Ho: El balance hormonal auxina-citoquinina no influye en la inducción de callos de explantes inoculados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de plántulas del invernadero.

Hi: El balance hormonal auxina-citoquinina influye en la inducción de callos de explantes inoculados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de plántulas del invernadero.

3.3.1.8. Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto hormonal de la auxina y citoquinina: 2,4-D y kinetina en la fase de inducción de callos, se manipularon los datos de las diferentes variables evaluadas en el software SPSS, para probar supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2016); se realizó un análisis de varianza no paramétrica de kruskall wallis; y, la prueba estadística con el test de bonferroni al 5,00 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.4. Metodología para la difusión de resultados

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

- Socialización de tesis al equipo técnico del proyecto *Cinchona* del laboratorio de micropropagación vegetal de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un folleto técnico informativo y tróptico, con el fin de dar a conocer los resultados obtenidos de la presente investigación.
- Elaboración de un artículo científico.
- Elaboración y publicación de tesis.

4. RESULTADOS

4.1. Desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero

4.1.1. Porcentaje de contaminación

La evaluación del porcentaje de contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se realizó al término de 30 días, en donde los menores porcentaje de contaminación se presentaron en los tratamientos T2 (50,00 % NaClO) y T3 (75,00 % de NaClO) con el 40,00 %; mientras que el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂) obtuvo el mayor porcentaje de contaminación, con 86,70 %. Según el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significancia de bonferroni al 5,00 % (Anexo 1) se observó que existe diferencia estadística entre tratamientos (Figura 13), en donde la contaminación en los explantes y medio de cultivo fue causada por bacterias y hongos (Figura 14).

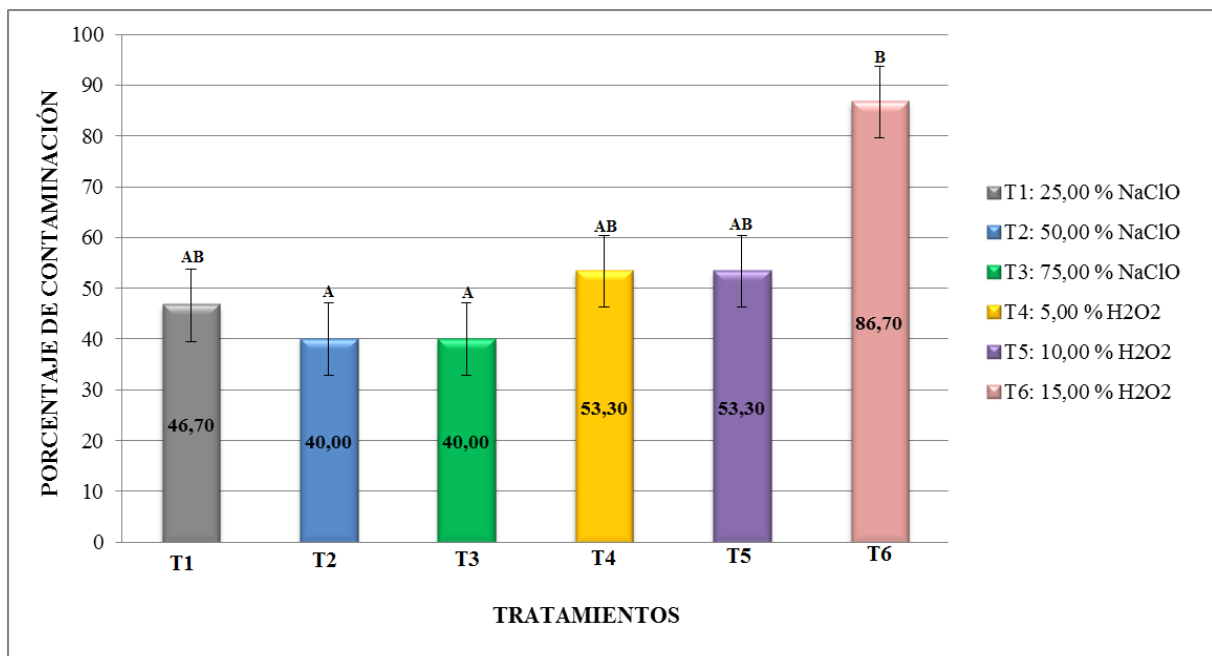


Figura 13. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

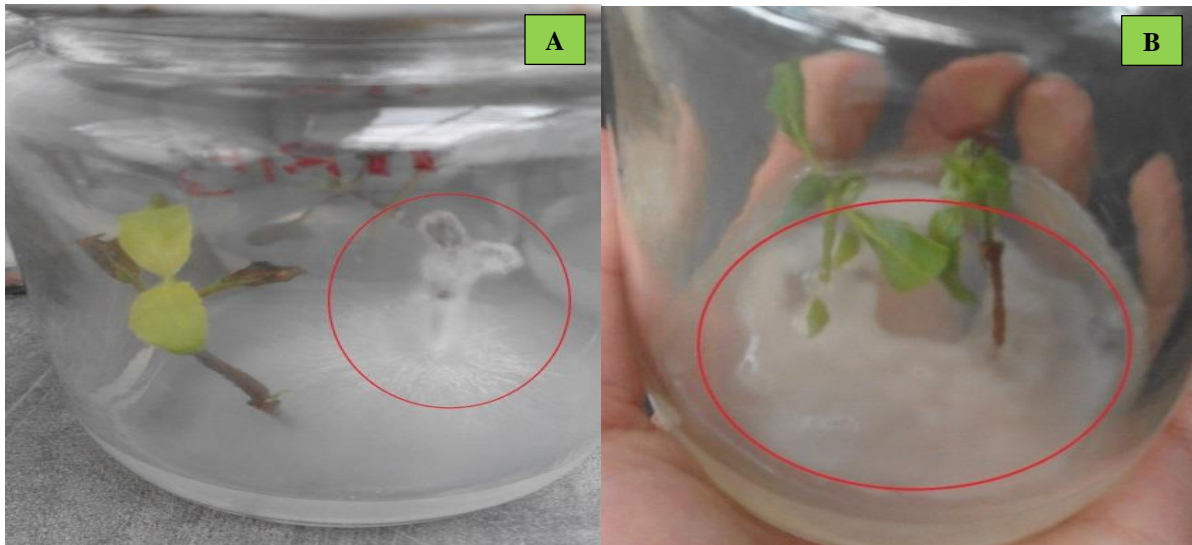


Figura 14. **A)** Contaminación de explantes por hongo, **B)** Contaminación de explantes y del medio de cultivo por bacterias.

4.1.2. Días a la contaminación

La contaminación de los explantes inoculados *in vitro*, provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se observó al tercer día en los tratamientos T3, T4 y T6 iniciando con porcentajes de 20,00 %; 3,30 % y 10,30 % respectivamente. La contaminación se estabilizó a los 17 días en los tratamientos T3 y T6, con porcentajes de 40,00 % y 86,70 % respectivamente; mientras que para el T4 la contaminación se estabilizó a los 20 días, con un porcentaje de 53,30 %. En el T1, T2 y T5 la contaminación inició al quinto día de instalado el ensayo, con 6,70 %; 13,30 % y 13,30 % respectivamente. La contaminación se estabilizó a los 20 días para el tratamiento T1, con 46,70 %; mientras que el T2 y T5, se estabilizó a los 14 días, con 40,00 % y 53,30 %, respectivamente (Figura 15).

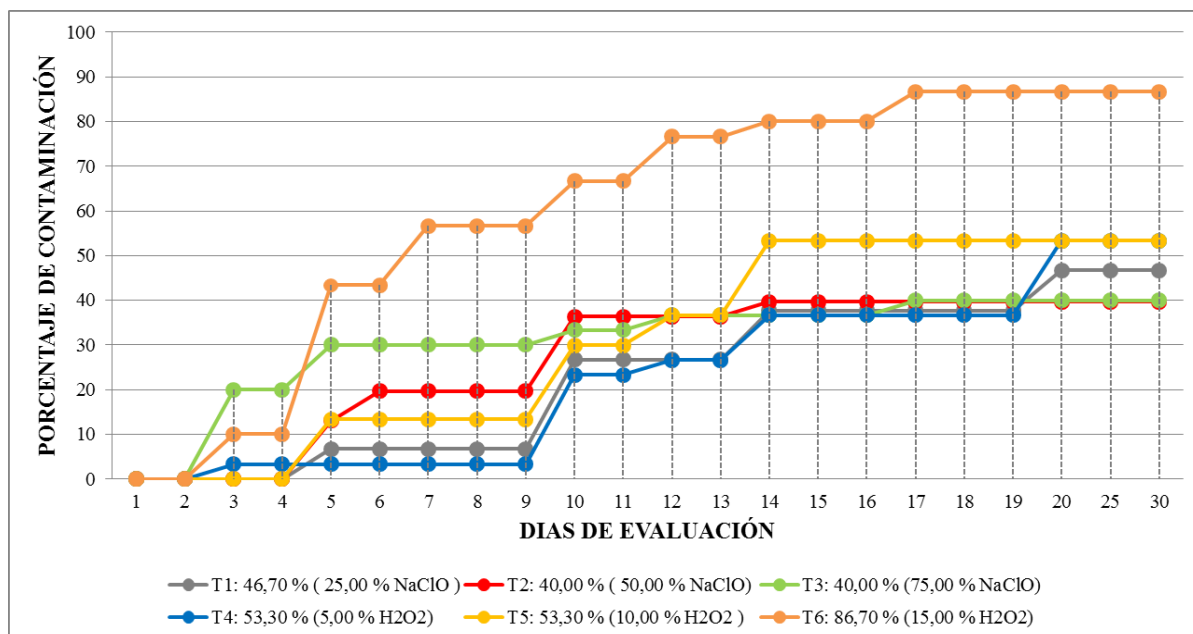


Figura 15. Curva de contaminación acumulativa de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.3. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes

En cuanto a la variable de oxidación fenólica de los explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂), presentó el menor porcentaje de oxidación fenólica con el 66,70 %; mientras que el tratamiento T3 (75,00 % NaClO) obtuvo el mayor porcentaje de fenolización con el 100,00 % de explantes fenolizados. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 % (Anexo 2), se observó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, con un p-valor de 0,0355 (Ver figura 16).

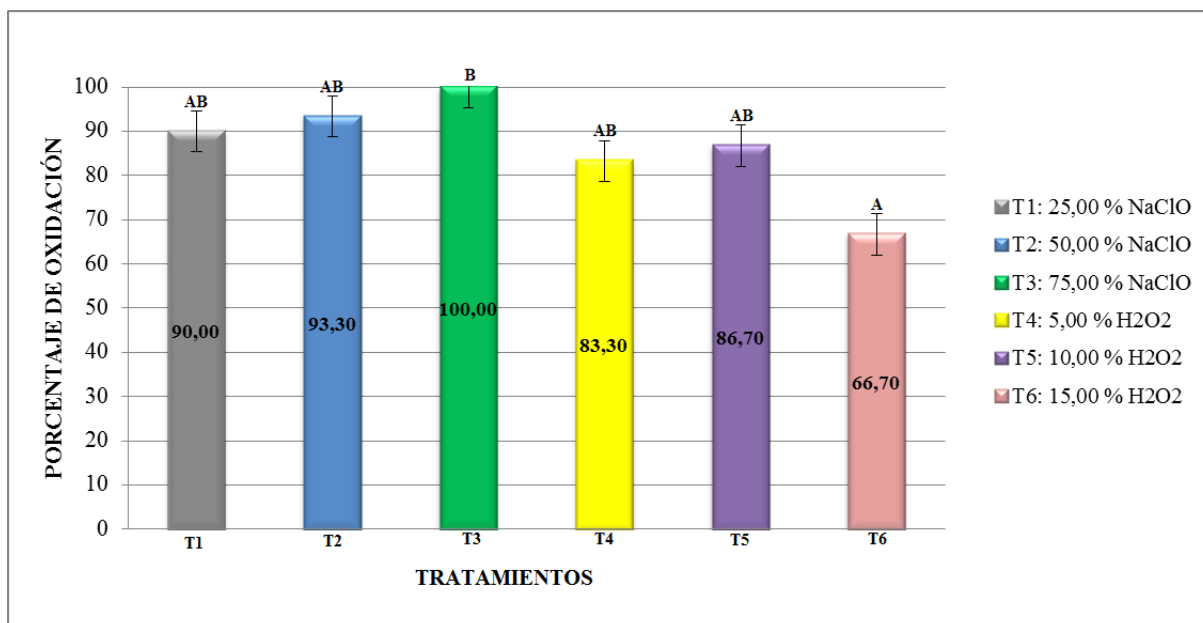


Figura 16. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de *C. officinalis* L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4.1.4. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes

En lo que respecta a la variable porcentaje de sobrevivencia de los explantes, el tratamiento T6 (15,00 % H_2O_2) presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia con el 6,70 %, en contraste con los tratamientos T1 (25,00 % NaClO), T2 (50,00 % NaClO), T3 (75,00 % NaClO), T4 (5,00 % H_2O_2) y T5 (10,00 % H_2O_2), que no presentaron porcentaje de sobrevivencia con el 0,00 %. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 % (Anexo 3) se encontró que no existe diferencia significativa entre tratamientos, con un p-valor de 0,4229 (Figura 17).

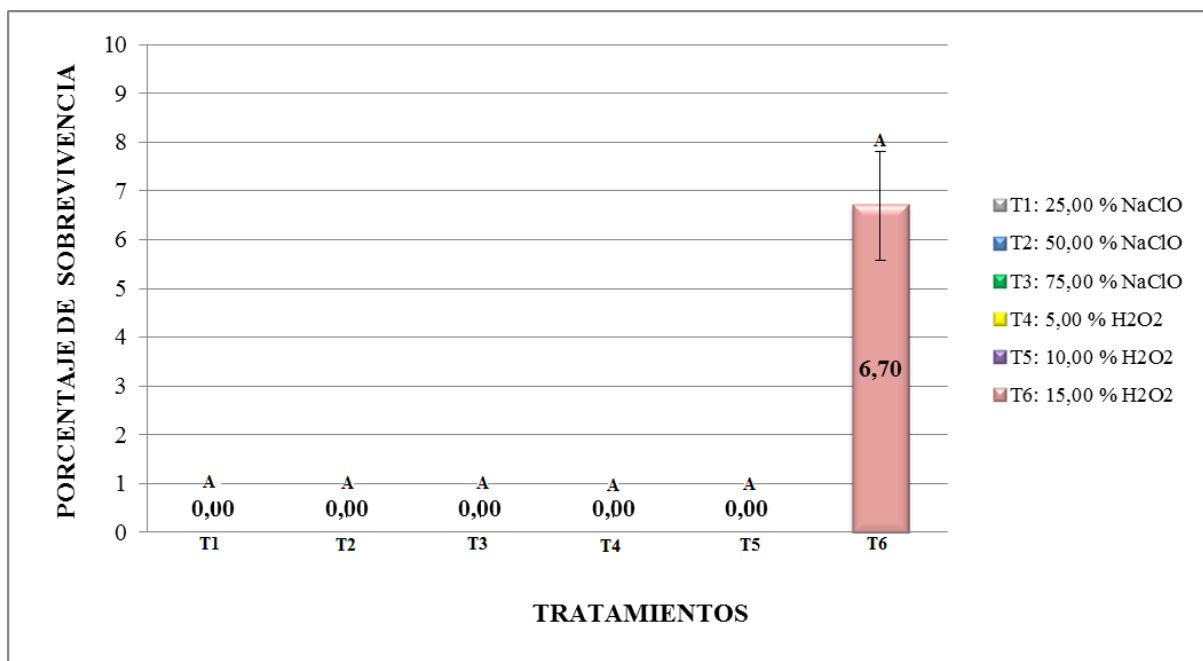


Figura 17. Porcentaje de supervivencia de explantes de *C. officinalis* L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación.

Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4.2. Fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero

4.2.1. Porcentaje de formación de callo

Durante la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* a partir de explantes de plántulas codificadas del invernadero, al término de 50 días de evaluación en la oscuridad, el tratamiento T7 ($3,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con el 73,30 %; mientras que el tratamiento T1 ($0,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ KIN), no presentó formación de callo (Figura 18 y 19). Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 %, se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos; por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula al ser $p < \alpha$ (0,05) en todos los casos (Anexo 4).

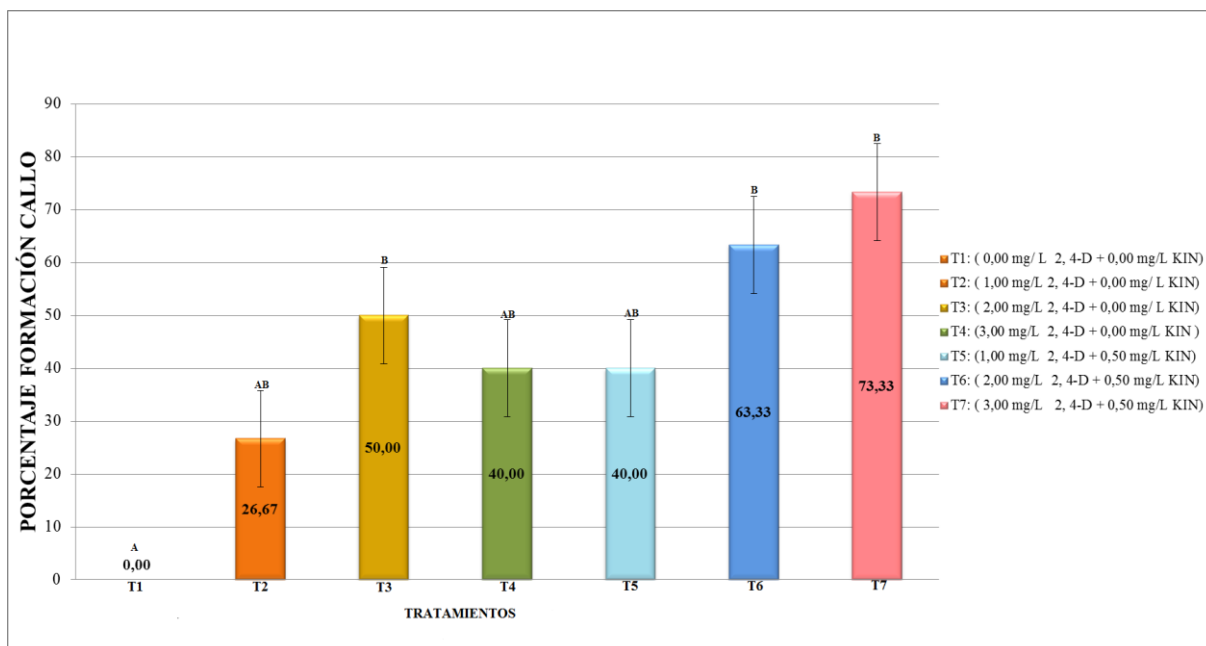


Figura 18. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero a los 50 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

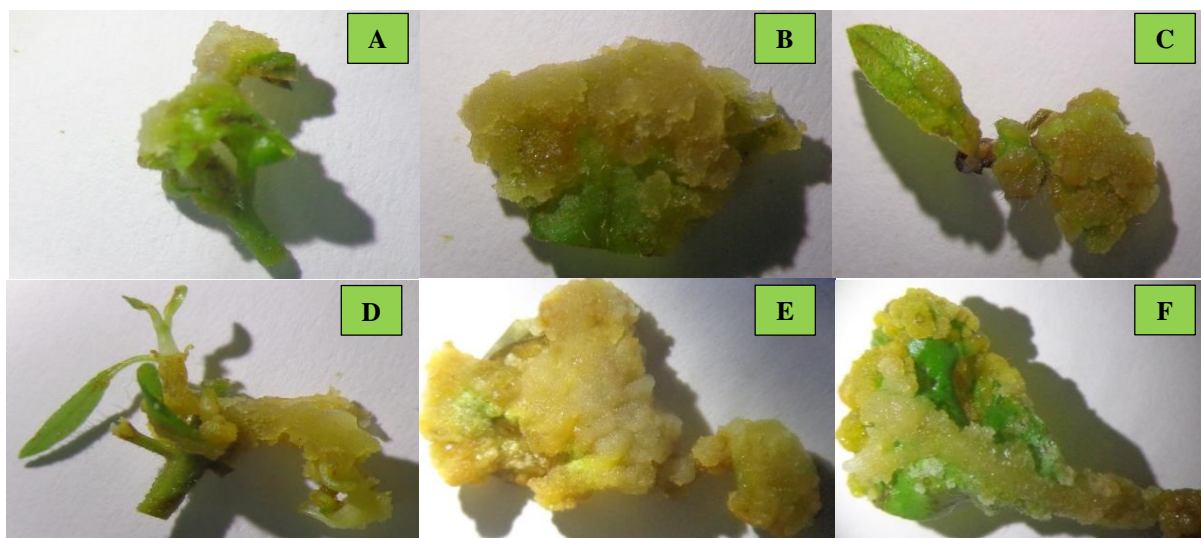


Figura 19. Formación de callos a partir de explantes de invernadero de *C. officinalis* L. **A)** Callos obtenidos del T2 ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ L KIN). **B)** Callos obtenidos del T3 ($2,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ KIN). **C)** Callos obtenidos del T4 ($3,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ KIN). **D)** Callos obtenidos del T5 ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ KIN). **E)** Callos obtenidos del T6 ($2,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ KIN). **F)** Callos obtenidos del T7 ($3,00 \text{ mg L}^{-1}$ 2, 4-D + $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ KIN), a los 50 días de evaluación.

4.2.2. Número de días a la formación de callo

La formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se evidenció a los 5 días, para los tratamientos T3, T4, T5 y T6 con porcentajes de 3,00 %; 13,00 %; 7,00 % y 17,00 % respectivamente. Para los tratamientos T2 y T7 la formación de callos inició a los 10 días de evaluación, con porcentajes de 3,30 % y 23,30 % respectivamente. El tratamiento T2 y T3 se estabilizaron a los 30 días de evaluación con porcentajes de 26,70 % y 50,00 % respectivamente; el tratamiento T4 se estabilizó a los 40 días con el 40,00 %; el tratamiento T5 se estabilizó a los 15 días de evaluación, con un porcentaje de 40,00 %; los tratamientos T6 y T7 se estabilizaron a los 20 días de instalado el ensayo, con un porcentaje de 60,00 % y 73,30 %, respectivamente. Finalmente, el tratamiento T1 se mantuvo estable, durante todo el periodo de evaluación con el 0,00 % (Figura 20), es decir no hubo la formación de callo.

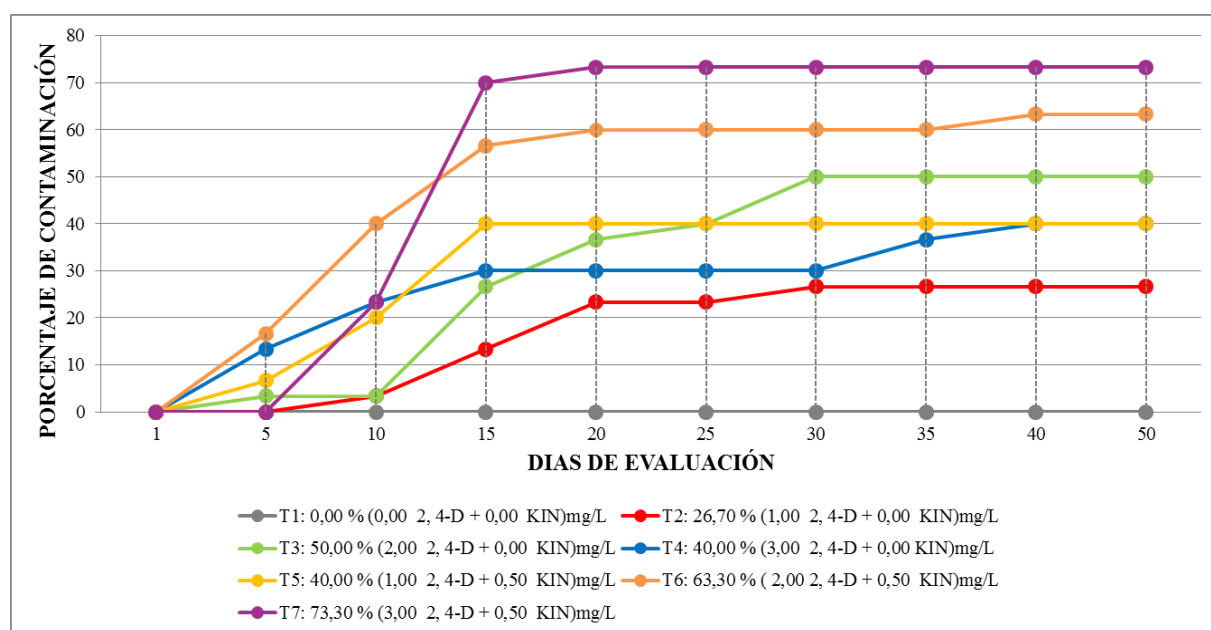


Figura 20. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.

4.2.3. Color de callo a los 50 días de evaluación

En la Figura 21, se observa que el tratamiento T3 (2,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) al término de los 50 días de evaluación, obtuvo el más alto porcentaje de callos de color Crema con el 73,00 %; así mismo, el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de callos de color Carmelita, con el 73,00 %. Finalmente, el tratamiento T5 (1,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) a más de presentar callos de color crema y Carmelita, presentó callos de color amarillo, con el 16,70 % (Figura 22).

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

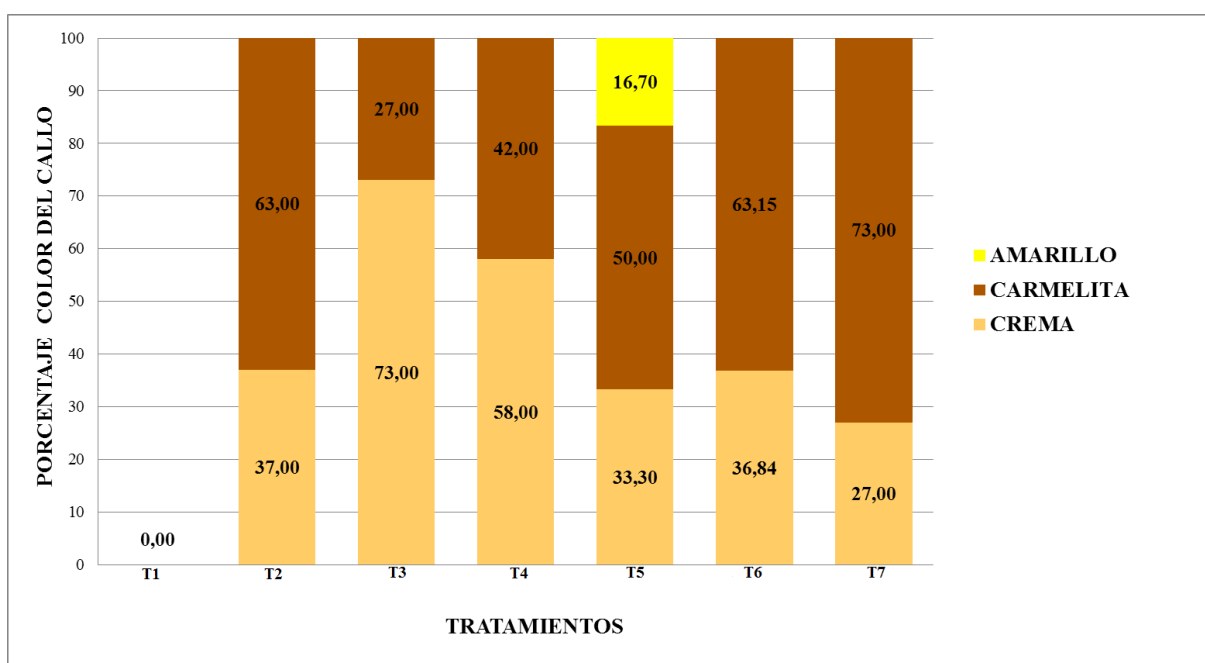


Figura 21. Porcentaje de color de callo de explantes de *Cinchona officinalis* L., hasta los 50 días de evaluación.



Figura 22. Formación de callos hasta los 50 días de evaluación. A) Callos de color crema (T7), B) Callos de color amarillo (T5), C) Callos de color Carmelita (T6).

4.2.4. Friabilidad del callo

Para concluir la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., dentro de las variables se evaluó también la friabilidad del callo, que se define como la capacidad para disgregarse, en donde, en casi todos los tratamientos, a excepción del tratamiento T1 (0,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN), se obtuvo una friabilidad de callo del 100,00 %, como se muestra en la Figura 23; es decir, todos los callos formados en cada uno de los tratamientos tuvieron consistencia homogénea y firme.

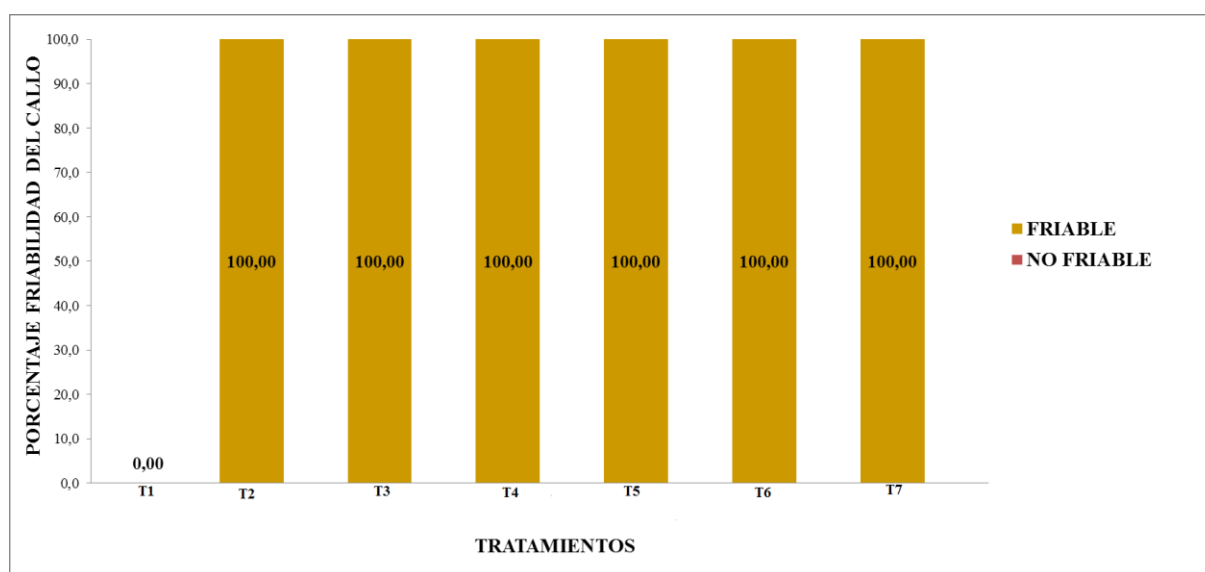


Figura 23. Porcentaje de friabilidad de callo de explantes de *Cinchona officinalis* L., hasta los 50 días de evaluación.

4.3. Difusión de información generada

Dada la importancia de la información generada en la presente investigación, la socialización de los resultados de esta investigación se realizó al equipo técnico del proyecto *Cinchona* 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 en la presente investigación (Figura 24).

Además, se elaboró y entregó un tríptico divulgativo, para dar a conocer los resultados de la investigación (Anexo 9).

Finalmente, se elaboró un folleto técnico informativo y un artículo científico de la tesis, con el propósito de difundir la información a actores sociales interesados en la temática para su conocimiento y aplicación (Anexo 10).



Figura 24. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL.

5. DISCUSIÓN

5.1. Desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., de plántulas provenientes de invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se trata de implantar los cultivos *in vitro* con explantes del invernadero o campo, es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por el explante, el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación; es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos, que pueden provocar la contaminación de los explantes inoculados *in vitro* (Mroginski *et al.*, 2010), pues en el mejor de los casos los microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo, pudiendo cambiarlo o modificarlo (Roca y Mroginski, 1991)

En la presente investigación, durante la fase de desinfección de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, la contaminación por hongos y bacterias fue evidente en el cultivo *in vitro*, pues los resultados del porcentaje de contaminación que se alcanzaron en los seis tratamientos de desinfección aplicados, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (25,00 %, 50,00 % y 75,00 %) y tres concentraciones de peróxido de hidrógeno (5,00 %, 10,00 % y 15,00 %) en tiempos iguales de inmersión durante 10 minutos, respectivamente, fueron superiores al 40,00 % de contaminación de los explantes. Sin embargo, la desinfección realizada en los tratamientos T2 (50,00 % NaClO) y T3 (75,00 % NaClO), permitieron controlar la contaminación en porcentajes menores al 40 %, siendo estos tratamientos los que mejores resultados presentaron en el control de la contaminación de los explantes. Estos resultados son similares a los reportados por Conde (2015), cuyos valores obtenidos en la desinfección de explantes obtenidos del campo en *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., con tres concentraciones de hipoclorito de sodio (15,00 %, 20,00 % y 25,00 % de NaClO) en dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) respectivamente, obtuvo porcentajes de contaminación superiores al 75,00 %; pero superiores a los obtenidos por Patiño (2011), quien en su estudio realizado en la especie *Caesalpinia espinosa*, obtuvo 0,00 % de contaminación, en explantes provenientes del campo, empleando hipoclorito de sodio al 75,00 %, durante 7 minutos de inmersión.

Es importante señalar, que los resultados obtenidos en la presente investigación sobre la contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de plántulas codificadas del invernadero, alcanzó niveles elevados (> 40,00 %), que se corrobora con lo señalado por Pierick (1990), quien manifiesta que la implantación de explantes, obtenidos de plantas que crecen *in vivo*, ya sea en campo abierto o en invernadero, siempre presentan mayores riesgos de contaminación de los explantes, por cuanto al crecer las plantas en condiciones sépticas (naturales), están más expuestos a la contaminación, cuando son inoculados *in vitro*.

En lo que respecta, a los días de la contaminación de explantes de *C. Officinalis* L., esta inició al tercer día de la inoculación *in vitro*, en todos los tratamientos ensayados, los cuales son similares a los obtenidos por Indacochea *et al.*, (2018), quienes en su estudio realizado para evaluar diferentes medios de cultivo para la inoculación *in vitro* de especies forestales nativas en peligro de extinción del Ecuador, la contaminación se evidenció en la mayoría de sus tratamientos, a partir de la primera semana de realizada la inoculación *in vitro* de los explantes.

Por otro lado, la oxidación fenólica durante la fase de desinfección de los explantes de *C. officinalis* L., evidenció niveles de fenolización superiores al 60,00 %; sin embargo, el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂) presentó el menor porcentaje de fenolización con el 66,70 %; resultados que son superiores a los reportados por Bogado *et al.*, (2016), quienes señalan que al realizar el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta* con explantes provenientes del invernadero, usando peróxido de hidrógeno, como agente desinfectante en una concentración de 9,00 % H₂O₂, durante 30 minutos, obtuvieron un 16,67 % de fenolización en sus explantes.

En la fase de oxidación fenólica, el empleo de soluciones antioxidantes para el enjuague de los explantes de *C. officinalis* L., provenientes del invernadero, durante la etapa de desinfección con PVP y la adición de ácido cítrico (100,00 mg L⁻¹) y ácido ascórbico (150,00 mg L⁻¹) como agentes antioxidantes al medio de cultivo, no fueron eficaces, ya que no lograron controlar de forma total la oxidación fenólica, lo cual se corrobora con lo señalado por Méndez y Abdelnour (2014) quienes indican que los tratamientos con PVP antes de la

desinfección o la combinación de ácido cítrico y ácido ascórbico, no pueden considerarse como tratamientos eficaces para evitar la oxidación fenólica de los explantes; así también, George y Sherrington (1984), recomiendan mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a la fase de incubación, en donde se debe garantizar a una intensidad lumínica baja, como un mecanismo para disminuir la oxidación fenólica, pues las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles, se incrementan y activan en presencia de la luz.

Finalmente, en lo relacionado al porcentaje de sobrevivencia de los explantes de *C. officinalis* L., el tratamiento T6, en el cual se probó la desinfección con peróxido de hidrógeno al 15,00 % H_2O_2 , durante 10 minutos de inmersión, presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes con apenas el 6,70 %; resultados que son inferiores a los obtenidos por Bogado *et al.*, (2016), quienes al utilizar H_2O_2 en una concentración de 9,00 %, durante 30 minutos de exposición de los explantes de *Grevillea robusta*, obtuvieron 46,70 % de sobrevivencia de los mismos.

5.2. Fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas de invernadero

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

En este sentido, los resultados obtenidos en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de *C. officinalis* L., demostraron que al combinar una auxina y una citoquinina (2,4-D y kinetina, respectivamente) se incrementó la formación de tejido callogénico en los explantes de *C. officinalis* L.; así, el tratamiento T7, que estuvo conformado por 3,00 mg L^{-1} 2,4-D + 0,50 mg L^{-1} KIN, resultó ser el más efectivo en la formación de callo, con un 73,30 %, resultado que es similar a los obtenidos por Armijos (2006), quien utilizando el medio de

cultivo B5, suplementado con nitrato de potasio, sacarosa y la aplicación combinada de auxina-citoquinina (2,4-D 1,00 mg L⁻¹ + BAP 0,50 mg L⁻¹), obtuvo un 68,00 % de formación de callos en *C. officinalis* L.

Con respecto al color que adquirieron los callos durante los 50 días de evaluación, en los primeros días tomaron una coloración crema, la misma que fue cambiando paulinamente a color carmelita y amarilla. Sin embargo, en el tratamiento T2 (2,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) los callos se tornaron de coloración crema y carmelita, siendo los callos de color crema los que más resaltaron con un 73,00 % de callos, resultados que se corroboran con los obtenidos por Espinosa *et al.*, (2012), quienes utilizando bajas concentraciones de 2,4-D en explantes de *Morus alba* L. obtuvieron la formación de tejido callogénico de color crema, con un alto grado de friabilidad y baja compactación.

En lo relacionada al porcentaje de friabilidad de los callos, se presentó que, en todos los tratamientos evaluados, al término de los 50 días, a excepción del testigo que no contenía ni auxina, ni citoquinina, formaron callos friables en un 100,00 %, con una coloración crema, carmelita y amarilla. Es necesario indicar que la adición al medio de cultivo de 2,4-D en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹ contribuyó de manera significativa a la formación de callos friables. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Martínez y Gutiérrez (2005), quienes mencionan que en Noni (*Morinda citrifolia*), la adición al medio de cultivo de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, indujo la formación de callos friables, de hojas jóvenes provenientes de árboles de campo.

Así mismo, los resultados obtenidos en la presente investigación y los alcanzados por Martínez y Gutiérrez (2005), concuerdan con los de Félix y Armijos (2006), quienes mencionan que los callos obtenidos en *C. officinalis* L. presentaron una estructura friable y color carmelita verdosa, utilizando 2,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ BAP; y, con los de Armijos y Pérez (2016), que también lograron callos friables, utilizando la combinación hormonal auxina-citoquina de 2,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,00 mg L⁻¹ BAP, respectivamente, lo que evidencia la importancia del 2,4-D, como una auxina que induce a la formación de callos friables, que son indispensables para garantizar la formación posterior de brotes de *novo* o brotes adventicios, que son necesarios para contribuir a la multiplicación vegetativa y la

conservación de especies en peligro de extinción, como es el caso de *C. officinalis* L., y posterior al mejoramiento genético de la especie.

Finalmente, se puede señalar que en la presente investigación, la inoculación de los explantes en la oscuridad, contribuyó a la formación de callo, especialmente en el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN), el cual presentó el mayor porcentaje de formación de callo, con el 73,30 %, resultado que es similar al logrado por Cuellar (1997), quien concluyó que la oscuridad es un factor estimulante en la formación de callo, ya que en su estudio en explantes de *Saccharum officinarum*, con la adición de 3,00 mg L⁻¹ 2,4-D, expuestos a oscuridad, obtuvo un 85,00 % de formación de callo.

6. CONCLUSIONES

- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, los tratamientos T2 (50,00 % NaClO) y T3 (75,00 % NaClO) presentaron la menor contaminación de explantes, con 40,00 %, en 10 minutos de inmersión de los explantes respectivamente.
- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., la oxidación fenólica de los explantes fue elevada, con niveles que superaron el 66,70 % en todos los tratamientos ensayados.
- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, la sobrevivencia al término de los 30 días de evaluación, alcanzo niveles bajos en todos los tratamientos ensayados para la desinfección de los explantes.
- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, el uso de la combinación hormonal auxina-citoquinina resultó adecuada, siendo el tratamiento T7 conformado por 3,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN, el que obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos, con el 73,30%.
- En la fase de inducción de callos de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, la utilización de la auxina 2,4-D, en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹, fue la que mejor resultados presentó en la inducción de callos friables.
- La inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero es factible realizarse, utilizando la concentración adecuada de auxinas; seleccionando y aplicando un tratamiento adecuado a los explantes *ex vitro* durante la permanencia en el invernadero, para evitar en la inoculación *in vitro* posibles focos de contaminación y oxidación fenólica de explantes.

7. RECOMENDACIONES

- Antes de iniciar la fase del establecimiento *in vitro*, se debería tratar las plántulas de *Cinchona officinalis* L., en el invernadero al menos una vez por semana con productos fungicidas y bactericidas, con la finalidad de disminuir la contaminación *in vitro*.
- Se recomienda ajustar la concentración y los tiempos de inmersión de los tratamientos de desinfección utilizados en esta investigación, para lograr establecer protocolos que permitan la implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *in vivo* del invernadero.
- Para disminuir la oxidación fenólica en los explantes, durante la fase de implantación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., se recomienda incubar previamente los explantes en la oscuridad, durante 24 horas, para luego cultivarlos a una intensidad lumínica baja.
- Para la inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero, se recomienda utilizar el 2,4-D en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹, como fuente de auxina.
- Se recomienda ensayar la inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero, en un fotoperíodo de incubación de los explantes de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, J. V. (1994). *Conceptos básicos de cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.*
- Acosta-Solís, M. (2000). La Cinchona o quina planta nacional del Ecuador. *Revista de la Academia colombiana de Ciencias*, 17(65): 306-311.
- Agúndez, D., Alba, N., Grau, J. M., Cervera, M. T., & Martínez-Zapater, J. M. (1999). *Genetic identification of commercial clones of Populus based on isozymes and AFLPs [Amplified Fragment Length Polymorphisms]. In International Congress Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz (España), 22-25 Sep 1999. DFA, DAMA.*
- Álvarez, P. (2014). *Área Biológica. Identificación de Hongos Micorrízicos Orbitales 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.
- Amiot, M. J., Forget-Richard, F., & Goupy, P. (1996). *Polyphenols, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products.* *Herba Polonica*, 4(42): 237-247.
- Anda, A. 2002. *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de semillas.* *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2): 169-178.
- Andersson, L., & Taylor, C. (1994). Rubiaceae-Cinchona. En Harling G. Andersson L (Eds), *Flora of Ecuador* .
- Araméndiz, Valencia, et al., (2000). *Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la Provincia de Loja.* (Tesis de grado. Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador.
- Armijos, R. (2016). *Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de Cinchona officinalis, Linneo.* Doctoral dissertation, Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

- Armijos, R., & Pérez, C., (2016). *In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species Cinchona officinalis L. (Rubiaceae)*. Capítulo 1. 36-59. En Armijos, R. (2016). Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo. Doctoral dissertation, Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- ASTRE. (2004). *Germinación in vitro de semillas de Nolina parviflora (HBK) Hemsl. Foresta Veracruzana, 10(2): 27-33.*
- Bandurski, E. L., Kearns, J. W., & Mount, H. B. (1993). *U.S. Patent No. 5,201,219*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Barket, A., Rani, I., Hayat, S. y Ahmad, A. (2007). Efecto del ácido 4-Cl-indol-3-acético sobre la germinación de semillas de *Cicer arietinum* expuesto al cadmio. *Acta Botanica Croatica* , 66 (1), 57-65.
- Barnett, J. P. (1976). *Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide*. Tree Planters Notes 27(3):17-19.
- Barnett, J. P. (1998). *Desinfecting seeds with hydrogen peroxide*. Disponible en: <http://www.sfws.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>.
- Bogado, F. A., Bravo, V., David, C., Ayala, P. G., Sansberro, P. A., & Luna, C. V. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). *Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L, clon caraqueño*. Revista Colombiana de Biotecnología, 11 (2): 127.
- Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E. (2000). *Responses to abiotic stresses.. Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales. Situación Actual y Aspectos Importantes. Para su Conservación*. Recuperado el 09 de Octubre de 2015, de Traffic Interntational. Disponible en: www.traffic.org/medicinal-reports/traffic_pub_medicinal27.pdf.

- Bull, AT, Holt, G. y Lilly, MD (1982). *Biotecnología; Tendencias y perspectivas internacionales*. OCDE, París (Francia).
- 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.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo In vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.
- Conde Solano, V. M. (2015). *Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de Hualtaco Laxopterygium huasango Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja*. Bosques Latitud Cero, 7(1).
- Conger, B. (1981). *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Florida. 273. <http://trove.nla.gov.au/work/9939002?selectedversion=NBD1771775>.
- Correia, S. M., & Canhoto, J. M. (2010). *Characterization of somatic embryo attached structures in Feijoa sellowiana Berg.(Myrtaceae)*. Protoplasma, 242(1-4), 95-107.
- Cuéllar, J. M. (1997). *Propagación vegetativa in vitro a partir de hojas jóvenes de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)*. Agronomía Mesoamericana, 74-80.
- Chen, JK, Taipale, J., Cooper, MK y Beachy, PA (2002). *Inhibición de la señalización de Hedgehog por unión directa de ciclopamina a Smoothened. Genes y desarrollo*, 16 (21): 2743-2748.
- Cruz, M., & Irigoyen, J. (2005). *Guía técnica de semilleros y viveros*. (No. IICA-F01 58). Ministerio de Agricultura y Ganadería, Santa Techa (El Salvador) Programa Nacional de Frutas de El Salvador, Santa Techa (El Salvador) IICA, San Salvador (El Salvador).
- Cuesta, F., Sevink, J., Llambí, L. D., De Bièvre, B., & Posner, J. (2014). *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos*. CONDESAN. Quito, Ecuador.

- 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, Ecuador.
- Ecociencia (2000). *Biodiversidad marina en el Ecuador continental*. Informe Final de Consultoría preparado para EcoCiencia. Convenio: Ministerio del Ambiente/UICN-sur/EcoCiencia.141.
- Ecuared. (2005). *Medios de Cultivo*. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_\(Microbiolog%C3%ADa\)](https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_(Microbiolog%C3%ADa)) (Consultado el 29 de Julio de 2018).
- Epiquién Mirbel. (2009). *Los últimos árboles de la quina*. Biodiversity Perú
- Espinosa, A., Silva, J., Sariago, S., Cholo Masapanta, L., & Delgado, H. (2012). *Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en Morus alba L*. Pastos y Forrajes, 35(4): 407-416.
- Feeney, L., M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2007). *Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en Ugni molinae*. Bosque (Valdivia):35(1), 111-118.
- Félix, C., & Armijos, R. (2006). *In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species Cinchona officinalis L (Rubiaceae)*. Journal of forestry research, 27(6): 1229-1236.
- Figueroa Vera, R. F. (2015). *Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación in vitro de semilla de moringa moringa oleifera lam* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Flores, A., Álvarez, J. G., Rodríguez, J. L., & Corona, A. (2008). *Germinación in vitro de semillas de Nolina parviflora (HBK) Hemsl*. Foresta Veracruzana, 10(2): 27.
- Galeano, V. D., & Galeano, H. D. (2009). *Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades*. AHYAT.
- 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.
- George, E. (2008). *Plant tissue culture procedure-background. In Plant propagation by tissue culture* (pp. 1-28). Springer, Dordrecht.
- George, E., & Sherrington, P. (1984). *Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Ltd; Basingstoke; England; 475.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture—Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. 709 p. Exegetics Eversley Ltd, UK
- Gómez, R. (1996). *Selección in vitro a la enfermedad carbón (Ustilago scitaminea Syd) de la caña de azúcar* (Doctoral dissertation, Tesis de grado], IBP).
- González, C., & Vilca, J. (1998). *Micropropagación vegetativa in vitro de aliso (Alnus acuminata)*. Red Andina de Semillas Forestales Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (RASEFOR). Asociación Civil para la Investigación y Desarrollo Forestal (ADEFOR), Cajamarca.
- Gonzalez, M. (2002). *Manual de laboratorio de técnicas de micropropagación*. Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid-España. ES.
- González Valdivieso, K. C. (2018). *Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de Cinchona officinalis L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja* (Bachelor's thesis, Loja).
- Haccius, B. (1978). *Question of unicelular origen of nonzygotic embryos in callus cultures*. Phytomorphology, (28): 74-81.
- Hartman, H; (1997). *Propagación de plantas*. México D.F., MX. Continental. p. 592- 607.
- Heinz, D., & Mee G. (1969). *Plant differentiation from callus tissue of Saccharum species*. Crop. Sci. (9): 346-348.
- Hernández, P. (2015). (En línea). *Tratado metódico y práctico de materia médica y de terapéutica. Fundado en la ley de los semejantes; China – Cinchona officinalis – Quina – Materia médica*. Consultado 05 abr. 2015. Disponible en: <http://honatur.com/chinacinchona-officinalis-quina-materia-medica/>.

- HRM- Hospital Ramos Mejía, Argentina. (1993). *Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes*.
- Hu, C; Wang, V. (1989). *Meristem, shoot tip and bud culture*. In: Handbook of Plant Cell. Ed Evans. 256-290 p.
- Hudson, T; Hartman E; (1987). *Propagación de plantas, principios y prácticas*. Primera edición. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- Iáñez, P. (1998). *Metabolismo energético*. Curso de microbiología general. Universidad de Ciencias Agrarias del Nordeste. Argentina.
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). *Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador*. Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas, 42(1): 63-89.
- Jácome, J. (2012). *Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis in vitro de meristemas apicales de árboles jóvenes de romerillo (Podocarpus oleifolius) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito*.
- Jácome, A. (2013). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: jiguerón (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*.
- Jäger, H., Tye, A., & Kowarik, I. (2007). *Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (Cinchona pubescens) trees on native vegetation in Galápagos*. Biological Conservation, 140(3-4): 297-307.
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (Vol. 75, pp. 1-1182). St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Larreátegui, D. & Lafuente, L. (2013). *El árbol de quina, 400 años de su descubrimiento en el Ecuador*. Revista Metro Ciencia 21 (1): 01-08.
- Lenntech. (2003). *Peróxido de hidrógeno*. Lenntech Agua residual y purificación del aire. México.
- Liu, H., & Setiono, R. (1996, July). *A probabilistic approach to feature selection-a filter*

solution. In ICML (Vol. 96, pp. 319-327).

Litz, R., & Jarret, R. (1991). *Regeneración de plantas somáticas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Tropical Research and Education Center. Florida, Estados Unidos.*

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

López, M. (1996). *Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en Saccharum officinarum y su relación con el ácido abscísico y la sequía.* Universidad complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España.

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

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

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

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

Martínez, A. D.; Gutiérrez, A. L. (2005). *Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (Borojoa patinoi Cuatr.) fase I.* Revista Colombiana de Biotecnología, 9(2), 45-55.

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

Mas I Gisbert, H., Pérez-Laorga, E., Pitxer, M., Veintimila, P., & Campos, E. (2011). c. *Acta*

de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales.

- 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 de (Dioscorea alata)*. Libro de Reportes cortos 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba.
- Mejía, F. Suní, 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.
- Méndez-Álvarez, D., & Abdelnour-Esquivel, A. (2014). *Establecimiento in vitro de Terminalia amazonia (Gmel.) Excell.* Revista Forestal Mesoamericana Kurú, 11(27): 7-21.
- Méndez, K. (2018). *Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de Cinchona officinalis L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- 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. Quinina.* 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-debiotecnologia-vegetal.aspx>.
- Montoya, L. (1991). *Cultivos de Tejidos Vegetales.* Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77.

- Mroginski, E., Rey, H., & Mroginski, L. (2002). *Establecimiento in vitro de Explantes y Regeneración de plantas de Toona ciliata*. Disponible en: www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-003.pdf.
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotechnología. Buenos Aires, Argentina*, 17-25.
- Muñoz de Malajovich, M. (2012). *Biotechnología*. - 2a ed. - Bernal: Universidad.
- Muñoz, C., Cuervo, E., Ampudia, M., Gastón, A., Peñuelas, J., Iglesias, S., & Herrero, N. (2009). *Control químico de Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell en semillas del género Pinus*. In Actas del 5 Congreso Forestal Español-Carga final.
- Murashige T., Skoog F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497.
- Narváez Garzón, S. P. (2009). *Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas in vitro de rosa, variedad akito (Rosa SP. Var Akito)* (Bachelor's thesis, SANGOLQUÍ/ESPE-IASA I/2009).
- Nieto, M. (2000). *Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo*. ICAH. 184-232p.
- Ochoa, F. (2014). *Efecto de tres dosis de ácido indolbutírico (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*. Recuperado de: <http://investigacion.cusam.edu.gt/wp-content/uploads/2018/10/efecto-de-tres-dosis-de-acido-indolbutirico-aib-y-tres-concentraciones-de-sales.pdf>
- Patiño Pomavilla, M. R. (2011). *Evaluación de Métodos de Desinfección y Medios de Cultivo para la Multiplicación in vitro de Guarango (Caesalpinia spinosa Mol. o. Kuntz)* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Pariani, S. (2015). *La incubadora: Condiciones ambientales de cultivo y asepsia*. Capítulo 4. En: Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

- Payán, A., Carmen, H., & Tascón, G. (1977). *Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)* mediante el cultivo de tejidos y yemas.
- Peña, P., Acosta, E., Galindo, L. y Bango, J. (2003). *Alternativas del establecimiento in vitro en la micropropagación de la Guana*. *Biotechnología Vegetal*, 3(1): 43-46.
- Pérez Ponce, J. N., & Alvarado Capó, Y. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (No. 581 P7731p Ej. 1 019530). Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Phillips, R., Arnott, S. M., & Kaplan, S. E. (1981). *Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters*, 21(3): 235-240.
- Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro Culture of Higher Plants Martinus Higoff Publ.* Netherlands. 344p.
- Pierik, R.L.M.; H.H.M. Steegmans y J. Hendriks, (1984). . “*The influence of naphthalene acetic acid on the growth of in vitro cultivated seedlings of Bromeliaceae*”. *Sci. Hort.*, 24: 193-199.
- Pierick, L. et. al. (1990). *Development of the Public Health Service criteria for serological confirmation of HTLV-I/III infections*. *Human Retrovirology*, 391- 396p.
- Pollito, P. A. Z. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Perú*.
- Ponce, J. P., Jiménez, E. G., & Gómez, R. K. (1998). *Field performance of selected sugarcane (Saccharum spp. hybrids) mutants*. In *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* (pp. 447-462). Springer, Dordrecht.
- 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.
- Quichimbo, D., & Del Cisne, G. (2012). *Procesos morfogénicos in vitro de cedro (Cedrela montana Moritz ex Turcz.) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma* (Bachelor's thesis).

- Raisman, J. (1999). *Hormonas de las plantas*. Recuperado de: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.
- Rajora, O. P. (1999). *Molecular biology in sustainable forest management*. In: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel, S., Ritter, E. (Ed.). 22- 25 September, Vitoria-Gasteiz, España. 29-39p.
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. *Informe de especialización en biotecnología agraria*. Universidad Nacional Abierta ya Distancia. Bogotá. Colombia.
- Rashmi, R., & Trivedi, M. P. (2014). *Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of Nerium odorum*. Applied biochemistry and biotechnology, 172(5): 2562-2570.
- Razdan, M. (2003). *Introduction to plant tissue culture*. 2nd edition. Science publishers. Inc. USA. 375p.
- Reaka-Kudla, M. L., Wilson, D. E., & Wilson, E. O. (1996). *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources*.
- Rentería, A. (2002). *Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos*. Foresta veracruzana, 8(2): 27-32.
- Roca, W. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*.
- Roca, W. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali-Colombia: Centro Internacional de Agricultura Trópica. 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., Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Rodríguez, M.S; García, R.O., & Muñoz, M.R. (2004). *Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de Moringa Lam, tropicalizada en Cuba*.
- 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. (2012). *Cinchona Officinalis*. (B. o. Demand, Ed.) Recuperado de: <http://www.loot.co.za/product/jesse-russell-cinchona-officinalis/wzvd-2307-g330> 1p.
- Sagee, O., Eyal, Y.& Fluhr, R. (1992). *Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene*. Plant molecular biology, 19(4): 589-599.
- Salgado, R. (2009). *La propagación de plantas in vitro, un éxito biotecnológico*. Recuperado de: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html> (Consultado el 29 de Julio 2018).
- Sánchez, O. (2000). *Micropropagación de algunas leñosas nativas*. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.
- Sánchez, Y. J. M. (2004). *Producción de bioinsecticida a base de Bacillus thuringiensis*.
- Smith, C; Wood, J. E. (1998). *Biología molecular y biotecnología*. Addison Welsley Longman. España. 247 p.
- Stefanello S, L Dal Vesco, J Ducroquet, R Nodari, M Guerra. (2005). *Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (Feijoa sellowiana Berg)*. Scientia Horticultura. 105: 117-126.
- Suarez, F. (2011). “*Micropropagación in vitro de Ananas comosus L. Merrill (Piña). Híbrido Md-2, A Partir de Cortes de Yemas Laterales y Apicales*”. Previa a la Obtención de Grado Académico o Título. Escuela Politécnica del Ejército.
- Taylor, M. F., Suckling, K. F., & Rachlinski, J. J. (2005). *The effectiveness of the Endangered Species Act: a quantitative analysis*. BioScience, 55(4): 360-367.
- 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.

- Urrea, A., Veitía, N., & Bermúdez, I. (2001). *Selección in vitro de callos de papa (Solanum tuberosum) empleando el filtrado crudo de Phytophthora infestans (mont) de bary*. Actualidades Biológicas, 23(74): 5-13.
- Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez S., & Jorgensen, P. (2000). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Vallejo, V. (1992). *Nutrición de plantas de Dendranthema grandiflora obtenidas in vitro durante su aclimatación en invernadero*. Revista Fitotecnia Mexicana, 28(4): 377-383.
- 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.
- Villalobos & García. (1982). *Obtención de plantas de clavel (Dianthus caryophyllus L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos*, Agrociencia. 48: 107-118.
- Wegier Briuolo, A. L., Barba Escoto, L., García Campusano, F. T. A., Pérez Santacruz, J., & Flores García, A. (2013). *Método para el establecimiento in vitro de caoba (Swietenia macrophylla king) a partir de explantes vegetativos*.
- Ziv, M.; Chen, J. 2008. *The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants*. Part of Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Springer. 501p.

9. ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos del ensayo de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 30 días de evaluación.

| ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKALL WALLIS | | | | | |
|--|-----------|--------------------------|---------|--------|---------|
| Variable | N | Coeficiente de variación | | | |
| % Contaminación | 90 | 75,54 | | | |
| Fuente de variación | SC | GL | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 22666,67 | 5 | 4533,33 | 2,79 | 0,0255 |
| Tratamiento | 22666,67 | 5 | 4533,33 | 2,79 | 0,0255 |
| Error | 136333,33 | 84 | 1623,02 | | |
| Total | 159000,00 | 89 | | | |
| TEST: BONFERRONI | | | | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E. | Rangos | |
| T2 | 40,00 | 15 | 10,40 | A | |
| T3 | 40,00 | 15 | 10,40 | A | |
| T1 | 46,67 | 15 | 10,40 | A B | |
| T5 | 53,33 | 15 | 10,40 | AB | |
| T4 | 53,33 | 15 | 10,40 | AB | |
| T6 | 86,67 | 15 | 10,40 | B | |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) | | | | | |

Anexo 2. Resultados obtenidos del ensayo de oxidación fenólica de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 30 días de evaluación.

| ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKALL WALLIS | | | | | |
|--|----------|--------------------------|---------|--------|---------|
| Variable | N | Coeficiente de variación | | | |
| % Oxidación fenólica | 90 | 27,96 | | | |
| Fuente de variación | SC | GL | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 9666,67 | 5 | 1933,33 | 3,29 | 0,0355 |
| Tratamiento | 9666,67 | 5 | 1933,33 | 3,29 | 0,0355 |
| Error | 49333,33 | 84 | 587,30 | | |
| Total | 59000,00 | 89 | | | |
| TEST: BONFERRONI | | | | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E. | Rangos | |
| T6 | 66,67 | 15 | 6,26 | A | |
| T4 | 83,33 | 15 | 6,26 | AB | |
| T5 | 86,67 | 15 | 6,26 | A B | |
| T1 | 90,00 | 15 | 6,26 | AB | |
| T2 | 93,33 | 15 | 6,26 | AB | |
| T3 | 100,00 | 15 | 6,26 | B | |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) | | | | | |

Anexo 3. Resultados obtenidos del ensayo de sobrevivencia de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 30 días de evaluación.

| ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKALL WALLIS | | | | | |
|--|---------|--------------------------|--------|--------|---------|
| Variable | N | Coeficiente de variación | | | |
| % Sobrevivencia | 90 | 948,68 | | | |
| Fuente de variación | SC | GL | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 555,56 | 5 | 111,11 | 1,00 | 0,4229 |
| Tratamiento | 555,56 | 5 | 111,11 | 1,00 | 0,4229 |
| Error | 9933,33 | 84 | 111,11 | | |
| Total | 9933,33 | 89 | | | |
| TEST: BONFERRONI | | | | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E. | Rangos | |
| T3 | 0,00 | 15 | 2,72 | A | |
| T2 | 0,00 | 15 | 2,72 | A | |
| T1 | 0,00 | 15 | 2,72 | A | |
| T5 | 0,00 | 15 | 2,72 | A | |
| T4 | 0,00 | 15 | 2,72 | A | |
| T6 | 6,7 | 15 | 2,72 | A | |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) | | | | | |

Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo inducción de callos de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 30 días de evaluación.

| ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKALL WALLIS | | | | | |
|--|-----------|--------------------------|---------|--------|---------|
| Variable | N | Coeficiente de variación | | | |
| % Sobrevivencia | 105 | 98,80 | | | |
| Fuente de variación | SC | GL | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 52619,05 | 6 | 8769,84 | 5,12 | 0,0001 |
| Tratamiento | 52619,05 | 6 | 8769,84 | 5,12 | 0,0001 |
| Error | 168000,00 | 98 | 1714,29 | | |
| Total | 220619,05 | 98 | | | |
| TEST: BONFERRONI | | | | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E. | Rangos | |
| T1 | 0,00 | 15 | 10,69 | A | |
| T2 | 26,67 | 15 | 10,69 | AB | |
| T5 | 40,00 | 15 | 10,69 | AB | |
| T4 | 40,00 | 15 | 10,69 | AB | |
| T3 | 50,00 | 15 | 10,69 | B | |
| T6 | 63,33 | 15 | 10,69 | B | |
| T7 | 73,33 | 15 | 10,69 | B | |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) | | | | | |

Anexo 5. Resumen de los resultados obtenidos en los ensayo de desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 30 días de evaluación.

| TRATAMIENTOS | Porcentaje de contaminación | Porcentaje de oxidación fenólica | Porcentaje de sobrevivencia |
|---|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | Media \pm EE* | Media \pm EE* | Media \pm EE* |
| T1: 25,00 % NaClO | 46,70 \pm 10,40 | 90,00 \pm 6,26 | 0,00 \pm 0,00 |
| T2: 50,00 % NaClO | 40,00 \pm 10,40 | 93,30 \pm 6,26 | 0,00 \pm 0,00 |
| T3: 75,00 % NaClO | 40,00 \pm 10,40 | 100,00 \pm 6,26 | 0,00 \pm 0,00 |
| T4: 5,00 % H ₂ O ₂ | 53,30 \pm 10,40 | 83,30 \pm 6,26 | 0,00 \pm 0,00 |
| T5: 10,00 % H ₂ O ₂ | 53,30 \pm 10,40 | 86,70 \pm 6,26 | 0,00 \pm 0,00 |
| T6: 15,00 % H ₂ O ₂ | 86,70 \pm 10,40 | 66,70 \pm 6, 26 | 6,70 \pm 2,72 |

Anexo 6. Siembra *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de invernadero para la fase de desinfección.

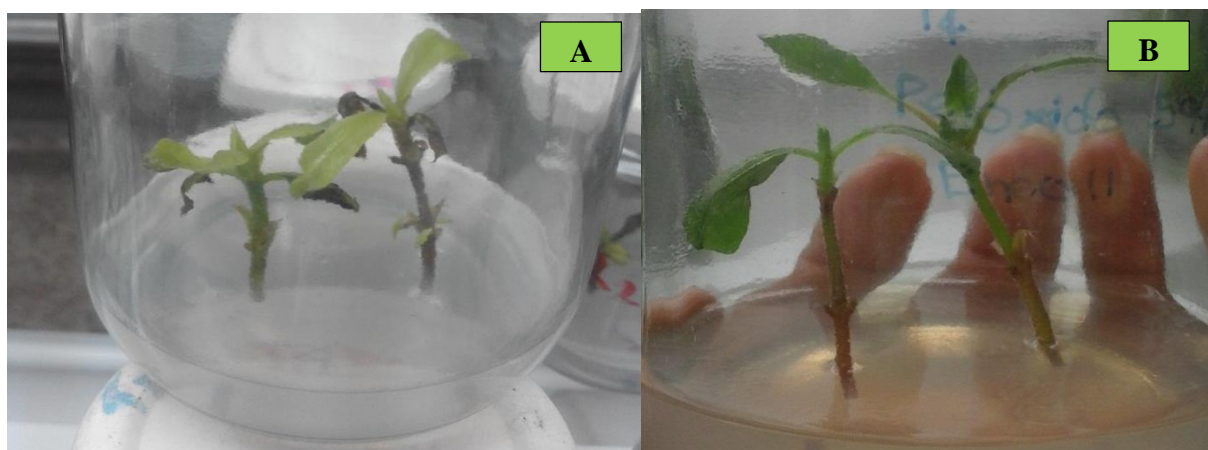


Figura 1. A) Siembra de explantes de *Cinchona officinalis* L., aplicando la desinfección con NaClO, B) Siembra de explantes de *Cinchona officinalis* L., aplicando la desinfección con H₂O₂.

Anexo 7. Siembra *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de invernadero para la fase de inducción de callos.



Figura 2. Siembra de explantes de *Cinchona officinalis* L., aplicando la desinfección con NaClO AL 50,00 % para inducir callos.

Anexo 8. Resultados del ensayo de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de invernadero.

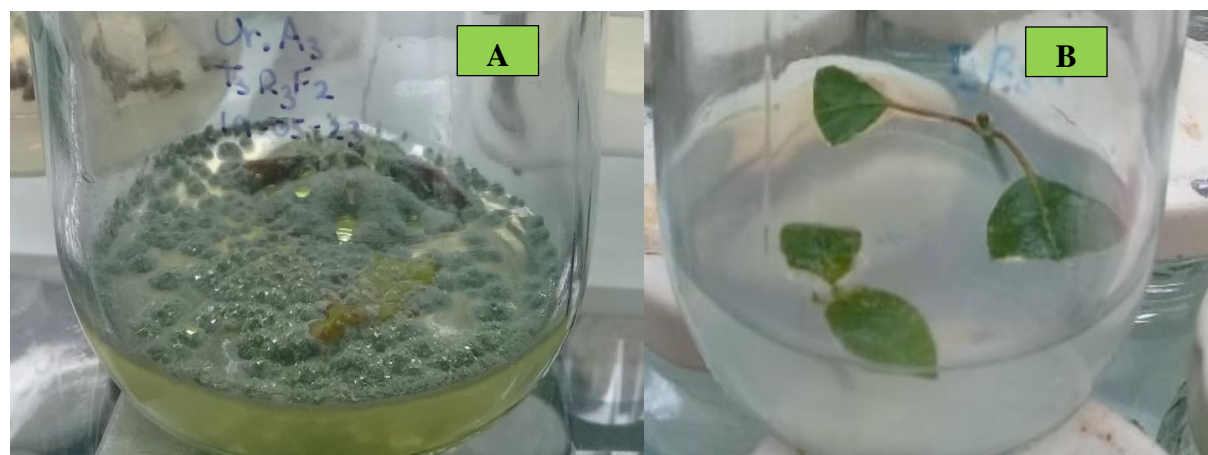
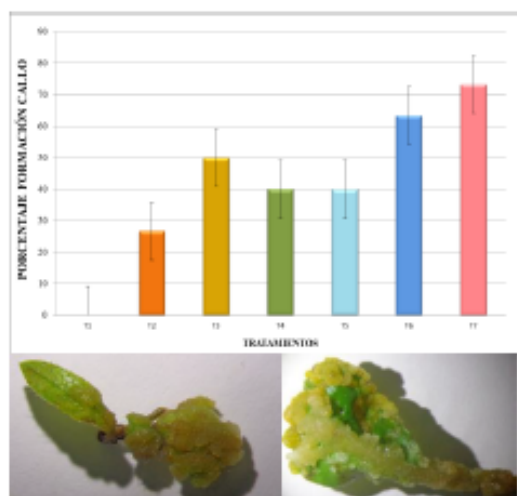


Figura 3. Fase de inducción de callos. **A)** Contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., **B)** Supervivencia de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Anexo 9. Trípico

2. Inducción de Callos en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero.

Según el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 % existe diferencia significativa entre tratamientos ($p= 0.0002$), el tratamiento T7 (3,00 mg/L 2, 4-D + 0,50 mg/L KIN) presentó el mayor porcentaje de formación de callo, en cambio el tratamiento T2 (1,00 mg/L 2, 4-D + 0,0 mg/L KIN) no presentó formación de callo.



Formación de Callos, tratamiento T7 a los 50 días de evaluación.

CONCLUSIONES

- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero, los tratamientos con 50,00 y 75,00 % NaClO presentaron menor porcentaje de contaminación.
- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., la oxidación fenólica

de los explantes fue superior al 66,70 % en todos los tratamientos ensayados.

- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, la sobrevivencia al término de los 30 días de evaluación alcanzó bajos niveles en todos los tratamientos ensayados.
- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes provenientes de invernadero, el uso de la combinación hormonal Auxina-Citoquinina resultó adecuada, siendo el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN), el que obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos.
- En la fase de inducción de callos de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, la utilización de la auxina 2,4-D, en concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00 mg L⁻¹ presentó mejores resultados en la inducción de callos fiables.

RECOMENDACIONES

- Previa a la fase del establecimiento *in vitro* de explantes de invernadero, se podría tratar las plántulas una vez por semana con productos fungicidas y bactericidas con la finalidad de disminuir la contaminación *in vitro*.
- Se puede probar concentración y tiempo de inmersión de los explantes a fin de establecer protocolos que permitan la implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *in vivo* del invernadero.
- Para la inducción de callos se debería aprobar exposición a luz de los explantes, así como tipos de explantes.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y RECURSOS
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Laboratorio de Micropropagación Vegetal

“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN *Cinchona officinalis* L., A PARTIR DE PLÁNTULAS DEL INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA”.



Responsable: Jessica Alejandra Guartanza L.

Director: Ing. Víctor Hugo Eras Guaman Mb. Sc

LOJA – ECUADOR

2019

INTRODUCCIÓN

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

En los bosques de la provincia de Loja se explotó la casarilla hasta el siglo XIX, debido a sus propiedades medicinales, causando así la reducción de sus poblaciones en su hábitat natural. Por la importancia de la especie, se requiere realizar estudios aplicando técnicas *in vitro* que permitan la propagación y conservación de *Cinchona officinalis* L.,

OBJETIVOS

General

Contribuir a la generación de información sobre procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos *Cinchona officinalis* L. A nivel de laboratorio.

Específicos

- Ensayar la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de Laboratorio.
- Evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas del invernadero.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló en El Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la UNL.

2. Metodología para evaluar la desinfección de explantes de *C. officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero.

Se utilizó explantes de invernadero de 3 a 5 cm de altura, el medio de cultivo MS, suplementado con vitaminas y antioxidantes. Se evaluó seis tratamientos, empleando dos desinfectantes: cloro comercial (ingrediente activo hipoclorito de sodio al 5,25 %) en concentraciones de 25,00; 50,00 y 75,00 % y peróxido de hidrogeno al 5,00; 10,00 y 15,00 %) por 10 minutos de inmersión. Se evaluó porcentaje de contaminación, días a la contaminación, fenolización y sobrevivencia de los explantes.

3. Metodología para evaluar la concentración de reguladores de crecimiento, para la inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas del invernadero.

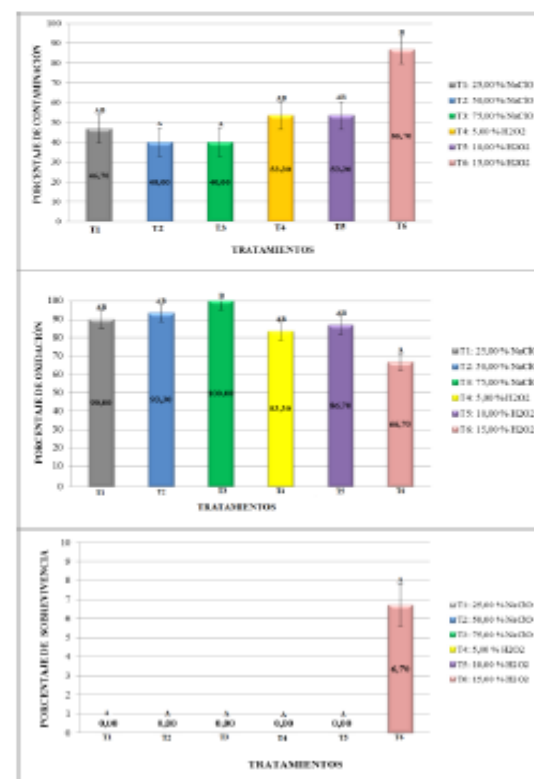
Se utilizó yemas axilares y apicales de invernadero de 1 a 2 cm de altura, el medio de cultivo MS, suplementado con 2-4 D y KIN. Se evaluó % de formación de callo, color de callo, friabilidad de callo, fenolización y sobrevivencia del callo.

| TRATAMIENTO | REGULADORES DE CRECIMIENTO | |
|-------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | 2,4-D (mg L ⁻¹) | KINETINA (mg L ⁻¹) |
| T1 | 0,00 | 0,00 |
| T2 | 1,00 | 0,0 |
| T3 | 2,00 | 0,0 |
| T4 | 3,00 | 0,0 |
| T5 | 1,00 | 0,5 |
| T6 | 2,00 | 0,5 |
| T7 | 3,00 | 0,5 |

RESULTADOS

1. Desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas de invernadero.

Según el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 % existe diferencia significativa entre tratamientos de las variables contaminación y oxidación fenólica; a excepción de la variable de sobrevivencia que no presentó diferencias significativas entre sus tratamientos.





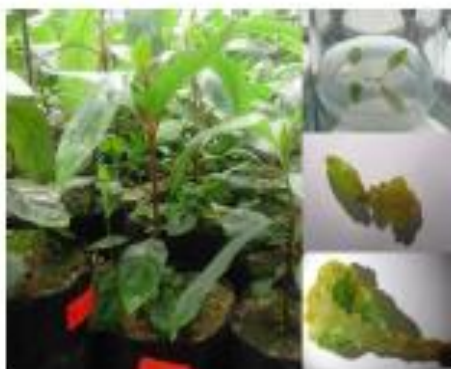
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Laboratorio de Micropropagación Vegetal

**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA
IMPLANTACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLOS EN
Cinchona officinalis L., A PARTIR DE
PLÁNTULAS DEL INVERNADERO, A NIVEL DE
LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA.**



Responsables:

Jessica Alejandra Guartahza Loja
Víctor Hugo Eras Guamán

**LOJA – ECUADOR
2019**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| CONTENIDO | Pág. |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 81 |
| 2. METODOLOGÍA | 82 |
| 2.1. Ubicación del área de estudio | 82 |
| 2.1.1. Metodología para la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio | 83 |
| 2.1.2. Selección del material vegetal | 83 |
| 2.1.3. Colecta de material vegetal | 83 |
| 2.1.4. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) | 83 |
| 2.1.5. Desinfección de material vegetal | 84 |
| 2.1.6. Inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes | 84 |
| 2.1.7. Diseño experimental | 85 |
| 2.1.8. Especificaciones del diseño experimental | 85 |
| 2.1.9. Hipótesis del modelo | 86 |
| 2.1.10. Análisis estadístico de datos | 86 |
| 2.2. Metodología para evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., en explantes provenientes de plántulas del invernadero | 87 |
| 2.2.1. Fase de inducción de callos | 87 |
| 2.2.1.1. Selección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 87 |
| 2.2.1.2. Preparación del medio de cultivo | 87 |
| 2.2.1.3. Desinfección de los explantes | 88 |
| 2.2.1.4. Inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes | 88 |
| 2.2.1.5. Diseño experimental | 88 |
| 2.2.1.6. Especificaciones del diseño experimental | 89 |
| 2.2.1.7. Hipótesis del modelo | 90 |
| 2.2.1.8. Análisis estadístico | 90 |
| 2.3. Metodología para la difusión de resultados | 90 |
| 3. RESULTADOS | 90 |
| 3.1. Desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero | 90 |
| 3.1.1. Porcentaje de contaminación | 90 |
| 3.1.2. Días a la contaminación | 91 |
| 3.1.3. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes | 91 |
| 3.1.4. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes | 92 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2. | Fase de inducción de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero | 92 |
| 3.2.1. | Porcentaje de formación de callo | 92 |
| 3.2.2. | Número de días a la formación de callo | 93 |
| 3.2.3. | Color de callo a los 50 días de evaluación | 94 |
| 3.2.4. | Friabilidad del callo | 94 |
| 3.3. | Difusión de información generada | 95 |
| 4. | CONCLUSIONES | 95 |
| 5. | BIBLIOGRAFÍA | 96 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| CONTENIDO | pág. |
|---|------|
| Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.. | 82 |
| Figura 2. Plántulas codificadas del invernadero de <i>C. officinalis</i> L. | 83 |
| Figura 3. Colecta de explantes de <i>C. officinalis</i> L., en el invernadero. | 83 |
| Figura 4. A) Solución fungicida- bactericida B) Sumersión de explantes | 84 |
| Figura 5. Preparación del medio de cultivo basal sólido MS | 84 |
| Figura 6. Solución PVP | 84 |
| Figura 7. A) Disección de explantes de <i>C. officinalis</i> L. dentro de la cámara, B) Siembra <i>in vitro</i> | 85 |
| Figura 8. Ubicación de los frascos de vidrio en el cuarto de luces para su incubación | 85 |
| Figura 9. Preparación del medio de cultivo MS sólido para inducir callos. | 87 |
| Figura 10. A) Cámara de flujo laminar, B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %. | 88 |
| Figura 11. A) Obtención de ápices y segmentos nodales, B) Siembra <i>in vitro</i> de explantes | 88 |
| Figura 12. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 91 |
| Figura 13. Curva de contaminación acumulativa de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 91 |
| Figura 14. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de <i>C. officinalis</i> L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación | 92 |
| Figura 15. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de <i>C. officinalis</i> L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación | 92 |
| Figura 16. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero a los 50 días de evaluación. | 93 |
| Figura 17. Formación de callos a partir de explantes de invernadero de <i>C. officinalis</i> L. | 93 |
| Figura 18. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación. | 94 |
| Figura 19. Porcentaje de color de callo de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., evaluados a los 50 días | 94 |
| Figura 20. Formación de callos a los 50 días de evaluación | 94 |
| Figura 21. Porcentaje de friabilidad de callo de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., hasta los 50 días de evaluación. | 95 |
| Figura 22. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL. | 95 |

1. INTRODUCCIÓN

Sudamérica es el centro de origen de muchas especies vegetales utilizadas históricamente para la cura de enfermedades (Vallejo, 1998). Según Buitrón (1999) manifiesta que: Ecuador siendo un país sudamericano, es megadiverso en términos biológicos y culturales, está entre las diecisiete naciones que albergan más del 70,00 % de las especies, que propician su condición de país megadiverso.

En Ecuador, una de las provincias que alberga mayor biodiversidad es Loja, localizada en la Región Sur del país, su diversidad biológica está influenciada por diversos factores, que facilitan las condiciones para el desarrollo de flora y fauna (Cuesta *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2005). Dentro de esta biodiversidad se encuentra *C. officinalis* L., especie nativa de Loja, considerada como uno de los géneros de mayor importancia por su valor medicinal (Nieto, 2000; Taylor, 2005). Actualmente, quedan poblaciones pequeñas que han sobrevivido a la sobreexplotación y a las presiones antrópicas sobre los bosques, haciéndose cada vez más escasa su presencia en las zonas de distribución (Epiquián, 2009).

El futuro de *C. officinalis* L., en el Ecuador es incierto, ya que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración; por lo que, está catalogada como una especie amenazada (Valencia *et al.*, 2000). Bajo esta perspectiva, la presente investigación se realizó con el propósito de contribuir a la generación de protocolos sobre Procesos Biotecnológicos de *Cinchona officinalis* L., para lograr la desinfección e inducción de estructuras calogénicas en explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro* que crecen en el invernadero, y de esta manera contribuir a la conservación y mejoramiento genético de la especie.

2. METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del área de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, al sur de la ciudad de Loja, en las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S - 79° 12' 00" O (Figura 1) (Díaz, 2012).



Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

2.1.1. Metodología para la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., de plántulas provenientes del invernadero, en la fase de implantación a nivel de laboratorio

2.1.2. Selección del material vegetal

Se seleccionó plántulas del invernadero, provenientes de árboles codificados de *Cinchona officinalis* L., del relicto boscoso ubicado en el sitio Uritusinga, cuyas coordenadas geográficas son: 55°33'79" S; 70°24'92" O, los mismos que fueron seleccionados previamente por el Proyecto de Investigación Macro de *cinchona*, en base a las mejores características fenotípicas y de fisiología reproductiva. Los explantes fueron recolectados de las plántulas codificadas del invernadero, que se encuentra adjunto al laboratorio de Micropropagación Vegetal, de una altura de 5 a 15 cm, las mismas que se obtuvieron de la germinación de semillas y que presentaron características morfológicas adecuadas, de acuerdo a como se muestran en la figura 2.

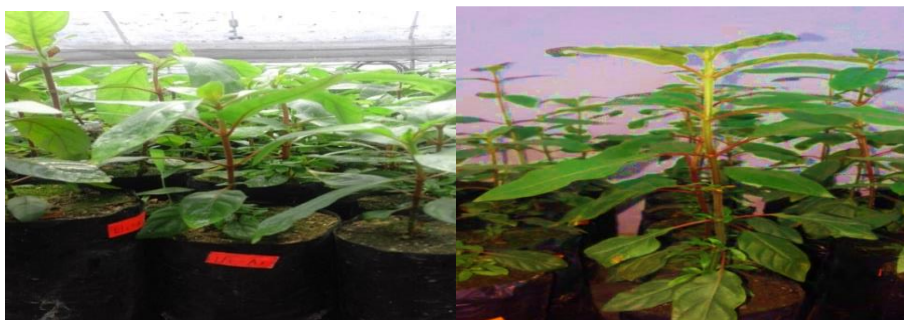


Figura 2. Plántulas codificadas del invernadero de *C. officinalis* L.

2.1.3. Colecta de material vegetal

Las plántulas seleccionadas fueron tratadas con fungicida ($2,00 \text{ g L}^{-1}$ Benomil) y bactericida (Kasumin $1,00 \text{ \% L}^{-1}$) un mes antes de la colecta. Se colectaron hojas, brotes axilares y brotes terminales, los mismos que fueron llevados al Laboratorio para la desinfección (Figura 3).



Figura 3. Colecta de explantes de *C. officinalis* L., en el invernadero.

2.1.4. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962)

Se utilizó el medio de cultivo basal sólido con las sales minerales de MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con tiamina $1,00 \text{ mg L}^{-1}$; mio-inositol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$; sacarosa $2,00 \text{ \%}$; $100,00 \text{ mg L}^{-1}$ ácido cítrico; $150,00 \text{ mg L}^{-1}$ ácido ascórbico; agar $5,80 \text{ g L}^{-1}$, cloranfenicol $100,00 \text{ mg L}^{-1}$; y, el pH se ajustó a $5,80 \pm 0,20$ con hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Se distribuyó 30 ml del medio de cultivo por frasco de vidrio, posteriormente se esterilizó en la autoclave a 120°C de temperatura y $1,50 \text{ kg/cm}^2$ de presión, durante 20 minutos (Figura 4).



Figura 4. Preparación del medio de cultivo basal sólido MS. A) Colocación de Sales del MS, B) Ajuste de pH, C) Distribución en los frascos de vidrio, D) Esterilización.

2.1.5. Desinfección de material vegetal

Previa a la desinfección del material vegetal, en la cámara de flujo laminar se realizó un enjuague con agua corriente para retirar los residuos de tierra. Además, los explantes se sumergieron en una solución fungicida – bactericida (Benomil 2,00 g L⁻¹ Kasumin 1,00 %) por cinco minutos (Figura 5), se realizó un enjuague con agua destilada a fin de retirar residuos de la solución, finalmente se sumergió los explantes en una solución de polyvinylpyrrolidone (PVP) por 5 minutos (Figura 6).

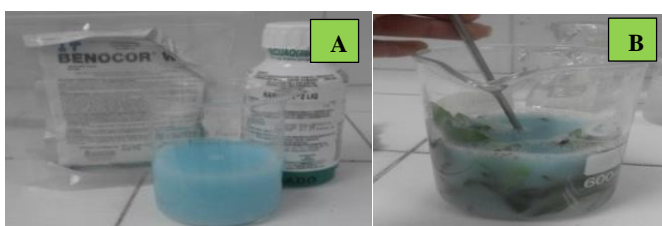


Figura 5. A) Solución fungicida- bactericida B) Sumersión de explantes.



Figura 6. Solución PVP

En esta fase se probó el efecto de dos desinfectantes: hipoclorito de sodio al 25,00 %; 50,00 % y 75,00 % y peróxido de hidrógeno al 5,00 %; 10,00 % y 15,00 %, con el propósito de controlar la contaminación de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, en un tiempo de inmersión de 10 minutos en todos los tratamientos.

La desinfección de los explantes se realizó en la cámara de flujo laminar, para lo cual los explantes fueron sumergidos en alcohol al 70,00 % por un minuto, seguido de un enjuague con agua destilada estéril, seguidamente los explantes se sumergieron en la solución desinfectante de acuerdo a cada tratamiento y finalmente se eliminó la solución desinfectante con tres enjuagues con agua destilada estéril (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos ensayados para la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de invernadero.

| TRATAMIENTOS | CONCENTRACIÓN DEL DESINFECTANTE | | TIEMPO (Minutos) |
|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| | NaClO (%) | H ₂ O ₂ (%) | |
| T1 | 25,00 | - | 10 |
| T2 | 50,00 | - | 10 |
| T3 | 75,00 | - | 10 |
| T4 | - | 5,00 | 10 |
| T5 | - | 10,00 | 10 |
| T6 | - | 15,00 | 10 |

2.1.6. Inoculación e incubación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar, para ello, sobre una caja petri se diseccionó con

un bisturí, eliminando los segmentos necrosados, obteniendo explantes de 2 a 3 cm de longitud, y se sembraron 2 explantes por frasco, dando un total de 180 explantes en el ensayo (Figura 7).

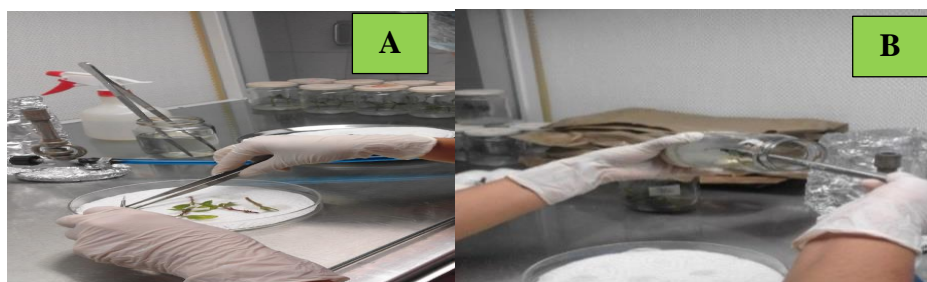


Figura 7. **A)** Disección de explantes de *C. officinalis* L. dentro de la cámara, **B)** Inoculación *in vitro*.

Se identificó cada frasco según su tratamiento y se procedió a ubicarlos en el cuarto de luces o cuarto de incubación (Figura 8), donde se mantuvo a una temperatura de ± 23 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 30 días.



Figura 8. Ubicación de los frascos de vidrio en el cuarto de luces para su incubación.

2.1.7. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 6 tratamientos y 3 repeticiones. En la Tabla 3, se muestran los tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., usando hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno en 10 minutos de inmersión.

Tabla 3. Tratamientos ensayados para evaluar la desinfección de explantes de *C. officinalis* L.

| TRATAMIENTO (T) | DESCRIPCIÓN | CÓDIGO* |
|-----------------|--|---------|
| T1 | 25,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T1D1C1 |
| T2 | 50,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T2D1C2 |
| T3 | 75,00 % NaClO x 10 min. de inmersión | T3D1C3 |
| T4 | 5,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T4D2C1 |
| T5 | 10,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T5D2C2 |
| T6 | 15,00 % H ₂ O ₂ x 10 min. de inmersión | T6D2C3 |

* T=Tratamiento, D=Desinfectante; C= Concentración.

2.1.8. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue un frasco de vidrio formado con dos explantes, cada tratamiento estuvo conformado por 30 explantes, dando un total de 180 explantes del ensayo (Tabla 4).

2.2. Metodología para evaluar la concentración de reguladores del crecimiento, para la inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., en explantes provenientes de plántulas del invernadero

El objetivo de este ensayo fue determinar el balance hormonal adecuado auxina y citoquinina: 2,4-D ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina (KIN), en diferentes concentraciones, con el propósito de inducir la formación de callos (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callos en explantes de *Cinchona officinalis* L.

| TRATAMIENTO | REGULADORES DE CRECIMIENTO | |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | 2,4-D (mg L ⁻¹) | KINETINA (mg L ⁻¹) |
| T1 | 1,00 | 0,00 |
| T2 | 2,00 | 0,00 |
| T3 | 3,00 | 0,00 |
| T4 | 1,00 | 0,50 |
| T5 | 2,00 | 0,50 |
| T6 | 3,00 | 0,50 |
| T7 | 0,00 | 0,00 |

2.2.1. Fase de inducción de callos

2.2.1.1. Selección de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Para esta fase se utilizó explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, aplicando el mejor método de desinfección de la fase de implantación. Se colectaron hojas, brotes axilares, brotes terminales y fueron llevados al laboratorio para la desinfección.

2.2.1.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo sólido con las sales minerales de MS, suplementado con tiamina 1,00 mg L⁻¹; mio-inositol 100,00 mg L⁻¹; piridoxina 1,00 mg L⁻¹; ácido nicotínico 2,00 mg L⁻¹; glicina 1,00 mg L⁻¹ y ergostín 1,50 mg L⁻¹, sacarosa 2,00 % (como fuente exógena de carbono), agar 6,00 g L⁻¹ (agente solidificante), cloranfenicol 100,00 mg L⁻¹ (para evitar contaminación); auxinas y citoquininas: 2,4-D y KIN en diferentes concentraciones (Figura 9). Se ensayó cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno. El pH se ajustó a 6,50 ± 0,20 con NaOH 1N.



Figura 9. A) Preparación del medio de cultivo MS sólido para inducir callos. B) Tratamientos con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas.

El medio de cultivo se distribuyó 25 ml en 105 frascos, luego fue esterilizado en el autoclave a 120 °C de temperatura y 1,50 kg/cm² de presión, durante 20 minutos, conjuntamente con el material de vidriería, disección y fungible necesarios para la inoculación *in vitro*.

2.2.1.3. Desinfección de los explantes

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

Posteriormente en la cámara de flujo laminar se aplicó el protocolo de desinfección de explantes, sumergiendo en alcohol al 70,00 % por un minuto, luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril, seguidamente se aplicó la solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaClO) al 50,00 % (Figura 10) por 10 minutos, finalmente se realizó 2 enjuagues con agua destilada estéril y un enjuague con PVP, para posteriormente realizar la siembra *in vitro*.



Figura 10. A) Cámara de flujo laminar, B) Solución desinfectante NaClO al 50,00 %.

2.2.1.4. Inoculación e incubación *in vitro* de los explantes

La inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., se efectuó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar; para ello, con la ayuda de un bisturí se eliminó las partes necrosadas del material vegetal; y, luego, sobre una caja petri con papel absorbente se diseccionó, con el fin de obtener ápices y segmentos nodales de un cm con hojas (explantes); inoculándose 2 explantes por frasco (Figura 11).



Figura 11. A) Obtención de ápices y segmentos nodales, B) Siembra *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

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

2.2.1.5. Diseño experimental

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

2.2.1.7. Hipótesis del modelo

Ho: El balance hormonal auxina-citoquinina no influye en la inducción de callos de explantes inoculados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de plántulas del invernadero.

Hi: El balance hormonal auxina-citoquinina influye en la inducción de callos de explantes inoculados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de plántulas del invernadero.

2.2.1.8. Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto hormonal de la auxina y citoquinina: 2,4-D y kinetina en la fase de inducción de callos, se manipularon los datos de las diferentes variables evaluadas en el software SPSS, para probar supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2016); se realizó un análisis de varianza no paramétrica de kruskall wallis; y, la prueba estadística con el test de bonferroni al 5,00 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

2.3. Metodología para la difusión de resultados

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

- Socialización de tesis al equipo técnico del proyecto *Cinchona* del laboratorio de micropropagación vegetal de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un folleto técnico informativo y tríptico, con el fin de dar a conocer los resultados obtenidos de la presente investigación.
- Elaboración de un artículo científico
- Elaboración y publicación de tesis.

3. RESULTADOS

3.1. Desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero

3.1.1. Porcentaje de contaminación

La evaluación del porcentaje de contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se realizó al término de 30 días, en donde los menores porcentaje de contaminación se presentaron en los tratamientos T2 (50,00 % NaClO) y T3 (75,00 % de NaClO) con el 40,00 %; mientras que el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂) obtuvo el mayor porcentaje de contaminación, con 86,70 %. Según el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significancia de bonferroni al 5,00 % se observó que existe diferencia estadística entre tratamientos (Figura 12), en donde la contaminación en los explantes y medio de cultivo fue causada por bacterias y hongos (Figura 13).

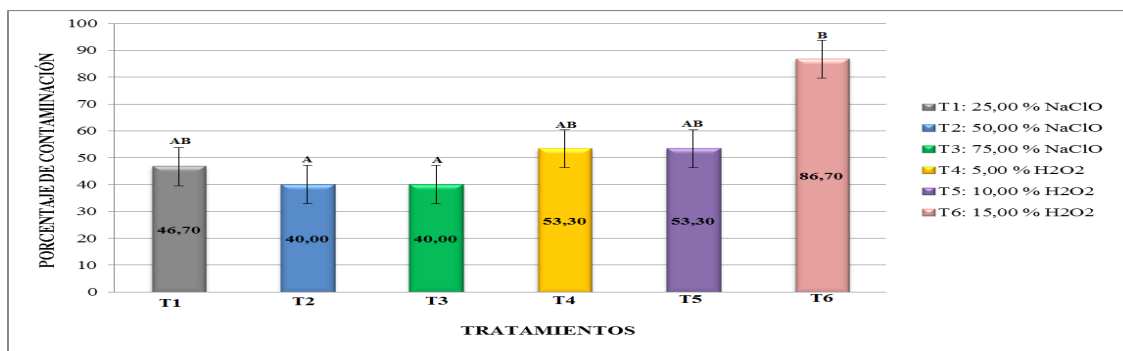


Figura 12. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

3.1.2. Días a la contaminación

La contaminación de los explantes inoculados *in vitro*, provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se observó al tercer día en los tratamientos T3, T4 y T6 iniciando con porcentajes de 20,00 %; 3,30 % y 10,30 % respectivamente. La contaminación se estabilizó a los 17 días en los tratamientos T3 y T6, con 40,00 % y 86,70 % respectivamente; mientras que para el T4 la contaminación se estabilizó a los 20 días, con un 53,30 %. En el T1, T2 y T5 la contaminación inició al quinto día de instalado el ensayo, con 6,70 %; 13,30 % y 13,30 % respectivamente. La contaminación se estabilizó a los 20 días para el tratamiento T1, con 46,70 %; mientras que el T2 y T5, se estabilizó a los 14 días, con 40,00 % y 53,30 %, respectivamente (Figura 13).

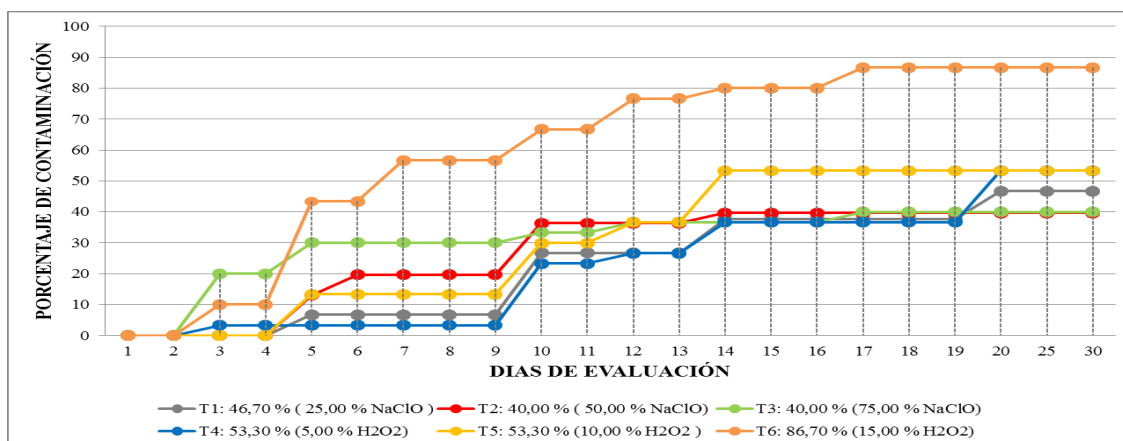


Figura 13. Curva de contaminación acumulativa de explantes de *Cinchona officinalis* L.

3.1.3. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes

En cuanto a la variable de oxidación fenólica de los explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero, el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂), presentó el menor porcentaje de oxidación fenólica con el 66,70 %; mientras que el tratamiento T3 (75,00 % NaClO) obtuvo el mayor porcentaje de fenolización con el 100,00 % de explantes fenolizados. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 %; se observó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, con un p-valor de 0,0355 (Ver figura 14).

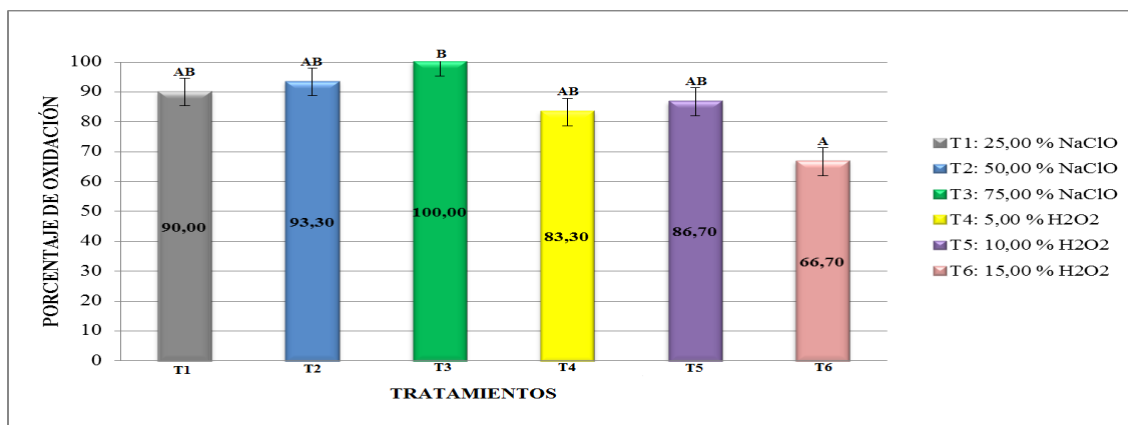


Figura 14. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de *C. officinalis* L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

3.1.4. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes

En lo que respecta a la variable porcentaje de sobrevivencia de los explantes, el tratamiento T6 (15,00 % H₂O₂) presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia con el 6,70 %, en contraste con los tratamientos T1 (25,00 % NaClO), T2 (50,00 % NaClO), T3 (75,00 % NaClO), T4 (5,00 % H₂O₂) y T5 (10,00 % H₂O₂), que no presentaron porcentaje de sobrevivencia con el 0,00 %. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 % se encontró que no existe diferencia significativa entre tratamientos, con un p-valor de 0,4229 (Figura 15).

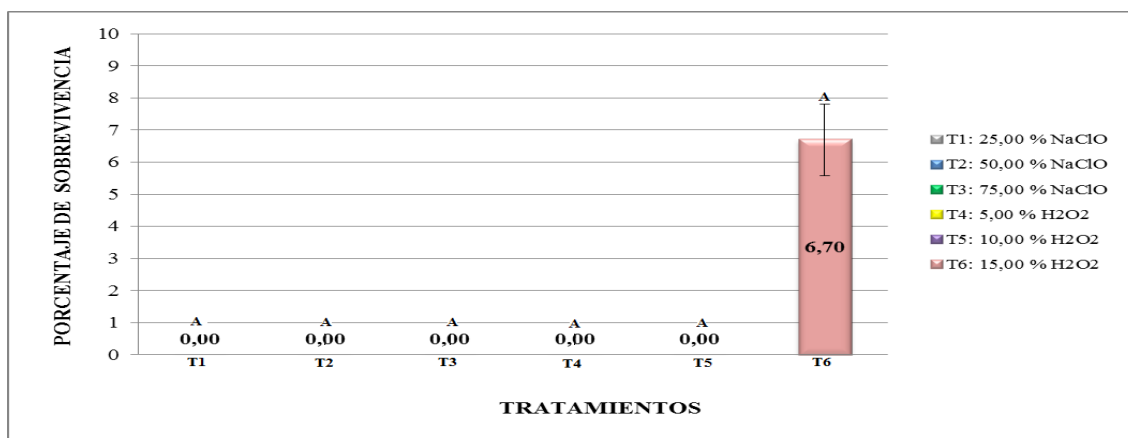


Figura 15. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *C. officinalis* L., por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

3.2. Fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., de explantes provenientes de plántulas codificadas del invernadero

3.2.1. Porcentaje de formación de callo

Durante la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* a partir de explantes de plántulas codificadas del invernadero, al término de 50 días de evaluación en la oscuridad, el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo con el 73,30 %; mientras que el tratamiento T1 (0,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN), no presentó formación de callo (Figura 16 y 17). Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica

de kruskall wallis y la prueba de significación de bonferroni al 5,00 %,se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos; por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula al ser $p < \alpha (0,05)$ en todos los casos.

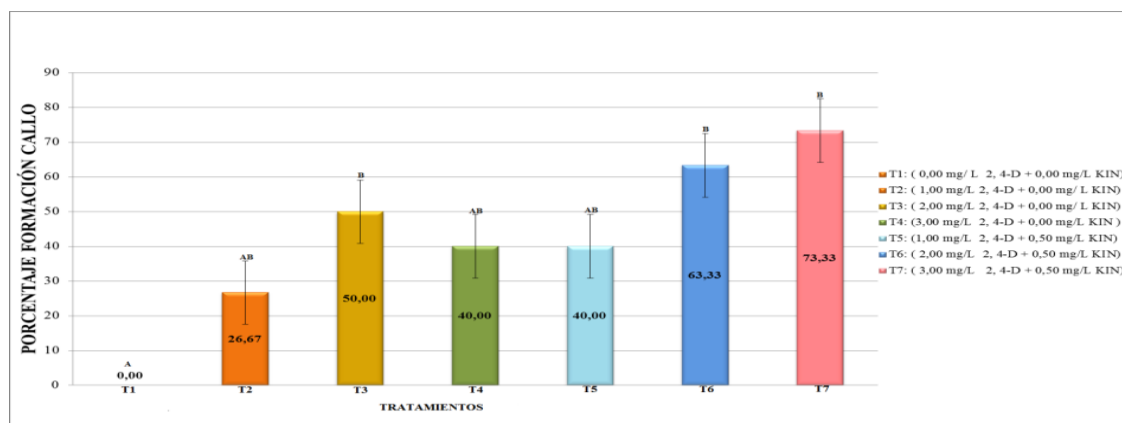


Figura 16. Porcentaje de formación de callos, a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero a los 50 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

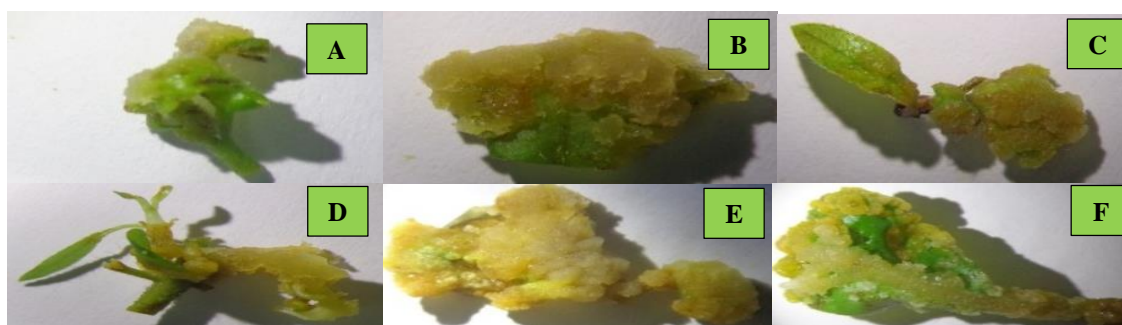


Figura 17. Formación de callos a partir de explantes de invernadero de *C. officinalis* L. A) Callos obtenidos del T2 B) Callos obtenidos del T3 C) Callos obtenidos del T5 D) Callos obtenidos del T5 E) Callos obtenidos del T6 F) Callos obtenidos del T7 a los 50 días de evaluación.

3.2.2. Número de días a la formación de callo

La formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, se evidenció a los 5 días, para los tratamientos T3, T4, T5 y T6 con porcentajes de 3,00 %; 13,00 %; 7,00 % y 17,00 % respectivamente. Para los tratamientos T2 y T7 la formación de callos inició a los 10 días de evaluación, con porcentajes de 3,30 % y 23,30 % respectivamente. El tratamiento T2 y T3 se estabilizaron a los 30 días de evaluación con porcentajes de 26,70 % y 50,00 % respectivamente; el tratamiento T4 se estabilizó a los 40 días con el 40,00 %; el tratamiento T5 se estabilizó a los 15 días de evaluación, con un porcentaje de 40,00 %; los tratamientos T6 y T7 se estabilizaron a los 20 días de instalado el ensayo, con un porcentaje de 60,00 % y 73,30 %, respectivamente. Finalmente el tratamiento T1 se mantuvo estable, durante todo el periodo de evaluación con el 0,00 % (Figura 18), es decir no hubo la formación de callo.

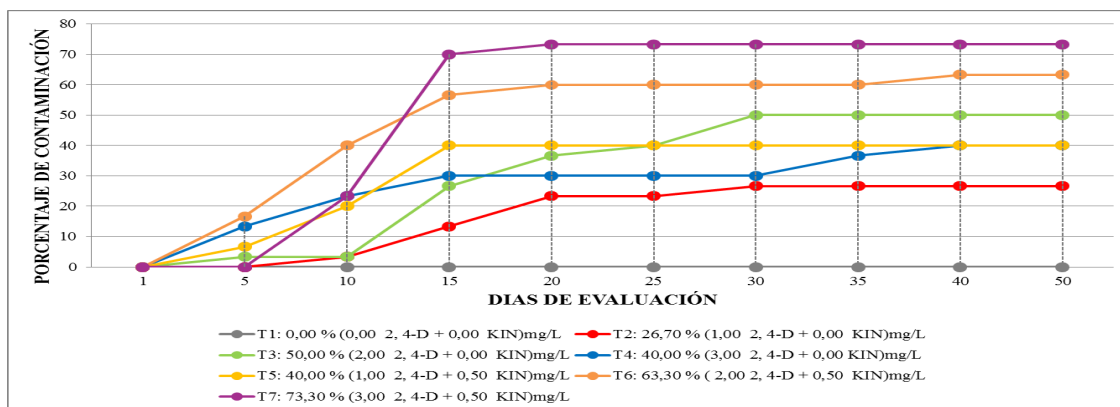


Figura 18. Número de días a la formación de callos a partir de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, a los 50 días de evaluación.

3.2.3. Color de callo a los 50 días de evaluación

En la Figura 19, se observa que el tratamiento T3 (2,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) al término de los 50 días de evaluación, obtuvo el más alto porcentaje de callos de color Crema con el 73,00 %; así mismo, el tratamiento T7 (3,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,50 mg L⁻¹ KIN) obtuvo el mayor porcentaje de callos de color carmelita, con el 73,00 %. Finalmente, el tratamiento T5 (1,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00 mg L⁻¹ KIN) a más de presentar callos de color crema y carmelita, presentó callos de color amarillo, con el 16,70 % (Figura 20).

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

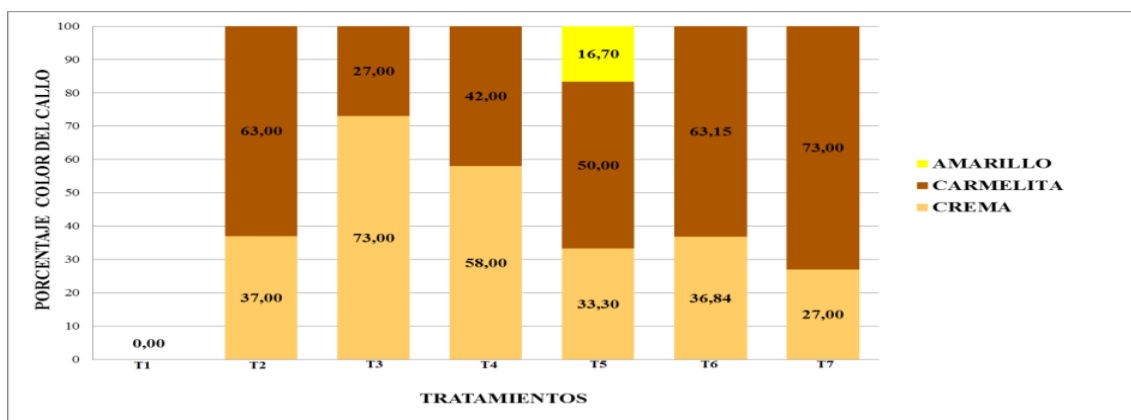


Figura 19. Porcentaje de color de callo de explantes de *Cinchona officinalis* L., hasta los 50 días de evaluación.



Figura 20. A) Callos de color crema (T7), B) Callos de color amarillo (T5), C) Callos de color carmelita (T6).

3.2.4. Friabilidad del callo

Para concluir la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., dentro de las variables se evaluó también la friabilidad del callo, que se define como la capacidad para disgregarse, en donde, en casi todos los tratamientos, a excepción del tratamiento T1 (0,00 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0,00

mg L⁻¹ KIN), se obtuvo una friabilidad de callo del 100,00 %, como se muestra en la Figura 21; es decir, todos los callos formados en cada uno de los tratamientos tuvieron consistencia homogénea y firme.

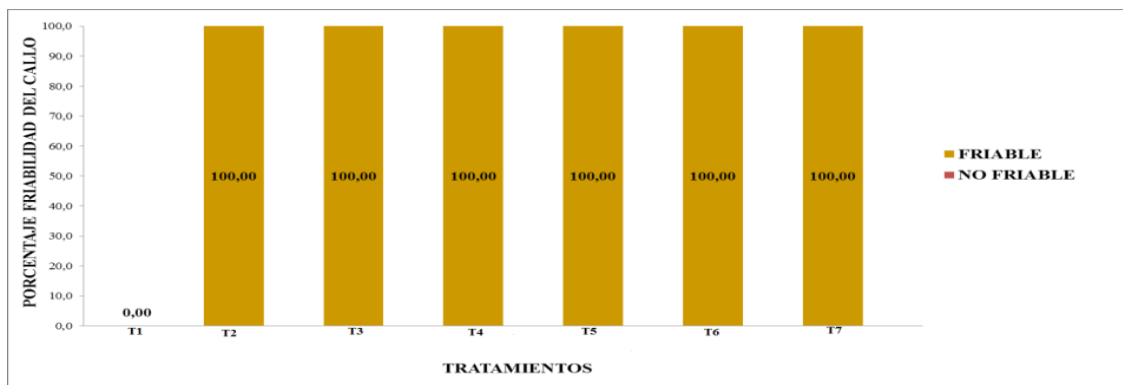


Figura 21. Porcentaje de friabilidad de callo de explantes de *Cinchona officinalis* L., hasta los 50 días de evaluación.

3.3. Difusión de información generada

Dada la importancia de la información generada en la presente investigación, la socialización de los resultados de esta investigación se realizó al equipo técnico del proyecto *Cinchona* 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 en la presente investigación (Figura 22).

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

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



Figura 22. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL.

4. CONCLUSIONES

- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas codificadas del invernadero, los tratamientos T2 (50,00 % NaClO) y T3 (75,00 % NaClO) presentaron la menor contaminación de explantes, con 40,00 %, en 10 minutos de inmersión de los explantes respectivamente.
- En la fase de implantación de explantes de *Cinchona officinalis* L., la oxidación fenólica de los explantes fue elevada, con niveles que superaron el 66,70 % en todos los tratamientos ensayados.

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

5. BIBLIOGRAFÍA

- Anda, A. 2002. *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de semillas*. Revista de Investigaciones Altoandinas, 20(2): 169-178.
- Araméndiz, Valencia, et al., (2000). *Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la Provincia de Loja*. (Tesis de grado. Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador.
- ASTRE. (2004). *Germinación in vitro de semillas de Nolina parviflora* (HBK) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2): 27-33.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales. Situación Actual y Aspectos Importantes. Para su Conservación*. Recuperado el 09 de Octubre de 2015, de Traffic Interntational. Disponible en: www.traffic.org/medicinal-reports/traffic_pub_medicinal27.pdf.
- Conger, B. (1981). *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Florida. 273. <http://trove.nla.gov.au/work/9939002?selectedversion=NBD1771775>.
- Conde Solano, V. M. (2015). *Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de Hualtaco Laxopterygium huasango Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja*. Bosques Latitud Cero, 7(1).
- Cuéllar, J. M. (1997). *Propagación vegetativa in vitro a partir de hojas jóvenes de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)*. Agronomía Mesoamericana, 74-80.
- Cruz, M., & Irigoyen, J. (2005). *Guía técnica de semilleros y viveros*. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=1CYOAQAIAAJ&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, L. D., De Bièvre, B., & Posner, J. (2014). *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos*. CONDESAN. Quito, Ecuador.

- Epiquién Mirbel. (2009). *Los últimos árboles de la quina*. Biodiversity Perú
- Gonzalez, M. (2002). *Manual de laboratorio de técnicas de micropropagación*. Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid-España. ES.
- HRM- Hospital Ramos Mejía, Argentina. (1993). *Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes*.
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). *Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador*. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 42(1): 63-89.
- MacDicken, K., Jonsson, Ö. Piña, L., Maulo, S., Contessa, V., Adikari, Y., D'Annunzio, R. (2016). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015: cómo están cambiando los bosques del mundo*.
- Meneses, L. (2017). *Saberes ancestrales, memoria del territorio, usos y costumbres estudio etnobotánica 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.
- Montoya, L. (1991). *Cultivos de Tejidos Vegetales*. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77.
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo*
- 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): 43-46.
- Quichimbo, D., & Del Cisne, G. (2012). *Procesos morfogénicos in vitro de cedro (Cedrela montana Moritz ex Turcz.) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma* (Bachelor's thesis).
- Raisman, J. (1999). *Hormonas de las plantas*. Recuperado de: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.
- Rodríguez, M.S; García, R.O., & Muñoz, M.R. (2004). *Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de Moringa Lam, tropicalizada en Cuba*.
- Sánchez, Y. J. M. (2004). *Producción de bioinsecticida a base de Bacillus thuringiensis*.
- Taylor, M. F., Suckling, K. F., & Rachlinski, J. J. (2005). *The effectiveness of the Endangered Species Act: a quantitative analysis*. *BioScience*, 55(4): 360-367.
- Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez S., & Jorgensen, P. (2000). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Vallejo, V. (1992). *Nutrición de plantas de Dendranthema grandiflora obtenidas in vitro durante su aclimatación en invernadero*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4): 377-383.
- 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*.