



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal

Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas

**Trabajo de Integración Curricular,
previa a la obtención del título de
Ingeniero Forestal**

AUTOR:

Jimmy Vicente Correa Jaramillo.

DIRECTOR:

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

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 22 de agosto de 2023

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán

DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas**, previo a la obtención del título de **Ingeniero Forestal**, de autoría del estudiante **Jimmy Vicente Correa Jaramillo**, con cédula de identidad Nro. **1150272324**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos estipulados exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Firmado electrónicamente por:
**VICTOR HUGO ERAS
GUAMAN**

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

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Jimmy Vicente Correa Jaramillo**, declaro ser autor del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.



Firma:

Cédula de identidad: 1150272324

Fecha: 29 de febrero de 2024

Correo electrónico: jimy_11jc@hotmail.com

Celular: 0959650466

Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total, y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo, **Jimmy Vicente Correa Jaramillo**, declaro ser autor del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas**, como requisito para optar el título de **Ingeniero Forestal**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los veintinueve días del mes de febrero del dos mil veinticuatro.



Firma:

Autor: Jimmy Vicente Correa Jaramillo

Cédula de identidad: 1150272324

Dirección: Loja, La Argelia.

Correo electrónico: jimy_11jc@hotmail.com

Celular: 0959650466

DATOS COMPLEMENTARIOS:

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

Dedicatoria

A mis padres Gloria Jaramillo y José Correa, que siempre estuvieron presentes para guiarme por el camino del bien, quienes, con su amor, cariño y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir el objetivo, gracias por inspirar en mí la valentía de no temer a las adversidades y salir siempre adelante.

A mis hermanos Silvana, Darwin, Marco y Danny por su apoyo incondicional, durante este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A mis sobrinos Annie, Abdel y Valentina que con sus ocurrencias me daban fuerzas de seguir adelante. A mis abuelitos que, aunque no estuvieron presentes, fueron los que me inspiraron para cumplir este sueño.

A toda mi familia por sus consejos y palabras de aliento que hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Jimmy Vicente Correa Jaramillo

Agradecimiento

Agradezco primeramente a Dios por brindarme vida y salud en todo momento.

A la Universidad Nacional de Loja Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por medio de la Carrera de Ingeniería Forestal por darme la oportunidad de formar parte de ella; a los excelentes docentes que con su paciencia y profesionalismo me ayudaron a prepararme académica y personalmente.

Así mismo, agradecer de forma especial al Ingeniero Víctor Hugo Eras Guamán, director de mi trabajo de investigación, por brindarme su confianza y permitirme formar parte del equipo de investigación Cinchona, por su ayuda, responsabilidad, dedicación y entrega que puso en el asesoramiento en mi trabajo de investigación.

Al equipo de investigación, la Ing. Magaly Yaguana por su apoyo incondicional en la impartición de sus conocimientos y experiencias para poder cumplir con la fase de laboratorio y al Ing. Darlin González por su tiempo y dedicación que contribuyó a la realización de mi trabajo de investigación.

Finalmente, a cada uno de mis compañeros de curso que durante todo el proceso académico compartieron su amistad, experiencias y conocimientos dentro y fuera de las aulas académicas.

Jimmy Vicente Correa Jaramillo

Índice de contenidos

| | |
|---|------------|
| Portada | i |
| Certificación | ii |
| Autoría | iii |
| Carta de autorización | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimiento | vi |
| Índice de contenidos | vii |
| Índice de tablas | xii |
| Índice de figuras | xiv |
| Índice de anexos | xvii |
| 1. Título | 1 |
| 2. Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| 3. Introducción | 4 |
| 4. Marco teórico | 7 |
| 4.1. Antecedentes históricos de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 7 |
| 4.2. Descripción taxonómica y botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L | 7 |
| 4.3. Ubicación geográfica y distribución de <i>Cinchona officinalis</i> L | 8 |
| 4.4. Usos medicinales de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 9 |
| 4.5. Métodos de propagación vegetativa..... | 9 |
| 4.5.1. Propagación sexual | 10 |
| 4.5.2. Propagación asexual..... | 10 |
| 4.6. Micropropagación de las plantas por cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> | 10 |
| 4.6.1. Fases de la micropropagación vegetativa <i>in vitro</i> | 10 |
| 4.7. Fotoperiodo | 12 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.8. | Medio de cultivo | 12 |
| 4.8.1. | Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962) | 12 |
| 4.8.2. | Sales minerales del medio de cultivo (MS-1962) | 12 |
| 4.9. | Reguladores de crecimiento vegetal | 13 |
| 4.9.1. | Auxinas | 14 |
| 4.9.2. | Citoquininas | 15 |
| 4.10. | Callogénesis <i>in vitro</i> | 15 |
| 4.10.1. | Cultivo de callos..... | 15 |
| 4.11. | Organogénesis | 16 |
| 4.11.1. | Organogénesis directa | 16 |
| 4.11.2. | Organogénesis indirecta | 16 |
| 4.12. | Embriogénesis somática..... | 17 |
| 4.13. | Investigaciones de propagación <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 17 |
| 5. | Metodología | 21 |
| 5.1. | Ubicación del sitio de estudio | 21 |
| 5.2. | Material vegetal..... | 21 |
| 5.3. | Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo | 22 |
| 5.3.1. | Preparación de medio de cultivo | 22 |
| 5.3.2. | Inoculación <i>in vitro</i> de los explantes..... | 23 |
| 5.3.3. | Incubación <i>in vitro</i> | 23 |
| 5.3.4. | Diseño experimental | 24 |
| 5.3.5. | Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental en el laboratorio..... | 25 |
| 5.3.6. | Variables evaluadas..... | 25 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.3.7. | Análisis de datos | 26 |
| 5.4. | Metodología para determinar el efecto de las citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, en la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas | 27 |
| 5.4.2. | Preparación de medio de cultivo | 27 |
| 5.4.3. | Inoculación <i>in vitro</i> de los explantes..... | 28 |
| 5.4.4. | Incubación <i>in vitro</i> | 28 |
| 5.4.5. | Diseño experimental | 28 |
| 5.4.6. | Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental en el laboratorio..... | 29 |
| 5.4.7. | Variables evaluadas..... | 29 |
| 5.4.8. | Análisis de datos | 30 |
| 5.5. | Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación | 31 |
| 6. | Resultados | 32 |
| 6.1. | Efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo..... | 32 |
| 6.1.1. | Contaminación de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación. | 32 |
| 6.1.2. | Fenolización de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación. | 33 |
| 6.1.3. | Formación de brotes <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación..... | 33 |
| 6.1.4. | Formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación..... | 34 |
| 6.1.5. | Días a la formación de brotes <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación. | 35 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.1.6. | Días a la formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación..... | 35 |
| 6.1.7. | Longitud de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación. | 36 |
| 6.1.8. | Longitud de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación | 36 |
| 6.2. | Determinar el efecto de dos citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, para la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas | 37 |
| 6.2.1. | Contaminación de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 37 |
| 6.2.2. | Fenolización de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 38 |
| 6.2.3. | Formación de brotes <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 38 |
| 6.2.4. | Formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 39 |
| 6.2.5. | Número de días a la formación de brotes <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 40 |
| 6.2.6. | Número de días a la formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 40 |
| 6.2.7. | Longitud de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 41 |
| 6.2.8. | Longitud de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación | 41 |
| 6.3. | Difusión de los resultados de la investigación para su conocimiento y aplicación | 43 |
| 7. | Discusión | 45 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 7.1. | Contaminación de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina - citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación | 45 |
| 7.2. | Fenolización de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina – citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación | 46 |
| 7.3. | Número y longitud promedio de formación de brotes <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina-citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación | 46 |
| 7.4. | Número y longitud promedio de formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L..... | 48 |
| 8. | Conclusiones | 50 |
| 9. | Recomendaciones | 51 |
| 10. | Bibliografía | 52 |
| 11. | Anexos | 60 |

Índice de tablas

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabla 1. | Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) | 13 |
| Tabla 2. | Clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal..... | 13 |
| Tabla 3. | Síntesis cronológica de los trabajos realizados en la micropropagación <i>in vitro</i> por cultivo de tejidos de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L. | 17 |
| Tabla 4. | Concentraciones hormonales evaluadas para determinar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 22 |
| Tabla 5. | Especificaciones del diseño experimental de las diferentes combinaciones hormonal auxina - citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 24 |
| Tabla 6. | Factores y niveles de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en fotoperiodo. | 24 |
| Tabla 7. | Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 25 |
| Tabla 8. | Escala para el registro de los datos de las formaciones de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 26 |
| Tabla 9. | Citoquininas evaluadas para determinar la diferenciación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 27 |
| Tabla 10. | Especificaciones del diseño experimental de las diferentes concentraciones de citoquininas, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 28 |

| | |
|--|----|
| Tabla 11. Factores y niveles de las concentraciones de citoquininas, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo..... | 29 |
| Tabla 12. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de dos concentraciones de citoquininas, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo. | 29 |
| Tabla 13. Escala para la toma de datos de la formación de raíces <i>de novo</i> en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 30 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Árbol de <i>Cinchona officinalis</i> L. | 7 |
| Figura 2. Distribución natural de <i>Cinchona</i> | 9 |
| Figura 3. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal (LMV) de la UNL. | 21 |
| Figura 4. A) Preparación medio de cultivo MS-1962 + KIN y BAP; B) Ajuste del Ph; C) Etiquetado de tratamientos; D) Distribución del medio de cultivo. | 23 |
| Figura 5. A) Cámara de flujo laminar para la inoculación; B) Inoculación de los explantes; C) Explantes inoculados en el medio de cultivo MS-1962. | 23 |
| Figura 6. Distribución de los tratamientos en el cuarto de incubación del LMV, en donde permanecieron los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 90 días de evaluación. | 24 |
| Figura 7. Porcentaje del número de explantes contaminados de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos concentraciones de ANA y cuatro de KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 32 |
| Figura 8. Ilustración de la contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L, iniciado en el medio de cultivo en los tratamientos: A) T0R1F2 (0 mg L ⁻¹ ANA + 0 mg L ⁻¹ KIN y B) T2R1F1 (0,5 mg L ⁻¹ ANA + 2,5 mg L ⁻¹ KIN. | 32 |
| Figura 9. Número promedio de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 33 |
| Figura 10. Brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos tratamientos: A) T1: 0,5 mg L ⁻¹ (ANA) + 1,5 mg L ⁻¹ (KIN) y B) T3: 0,5 mg L ⁻¹ (ANA) + 3,5 mg L ⁻¹ (KIN), a los 90 días de evaluación. | 33 |
| Figura 11. Porcentaje del número de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 34 |
| Figura 12. Raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., observados en los tratamientos: A) T1: 0,5 mg L ⁻¹ ANA + 1,5 mg L ⁻¹ KIN y B) T3: 0,5 mg L ⁻¹ ANA + 3,5 mg L ⁻¹ KIN, a los 90 días de evaluación. | 34 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Número de días a la formación de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 35 |
| Figura 14. Número de días a la formación de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 35 |
| Figura 15. Longitud promedio de los brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 36 |
| Figura 16. Longitud promedio de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 36 |
| Figura 17. Porcentaje del número de explantes contaminados de <i>Cinchona officinalis</i> L, en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 37 |
| Figura 18. Ilustración de la contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L, en los tratamientos: A) T1R2F5 (1,5 mg L ⁻¹ BAP) y B) T2R1F4 (2,5 mg L ⁻¹ BAP), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación. | 37 |
| Figura 19. Número promedio de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 38 |
| Figura 20. Brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos tratamientos: A) T2R3F2 (2,5 mg L ⁻¹ BAP) y B) T3R3F1 (3,5 mg L ⁻¹ BAP), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación. | 38 |
| Figura 21. Porcentaje del número de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 39 |
| Figura 22. Ilustración de la formación de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., observadas en los tratamientos: A) T5R3F4 (1,5 mg L ⁻¹ KIN) y B) T6R3F1 (3,5 mg L ⁻¹ KIN), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación. | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Número de días a la formación de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 40 |
| Figura 24. Número de días a la formación de raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en cuatro concentraciones de BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 41 |
| Figura 25. Longitud promedio de los brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 41 |
| Figura 26. Longitud promedio de las raíces <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., en cuatro concentraciones de BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación. | 42 |
| Figura 27. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales; A) Exposición de los resultados preliminares del TIC a los actores interesados que asistieron a la en la casa abierta organizada por la CIF; B) Presentación del poster; C) Socialización de los resultados del TIC ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona D) Elaboración de un manual técnico; E) Elaboración de un tríptico derivado del TIC; F) Elaboración de un póster científico; y, G) Elaboración de un borrador del artículo científico, derivado del TIC. | 44 |

Índice de anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Poster científico de los resultados preliminares, para la difusión a los actores interesados que asistieron a la casa abierta organizada por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL. | 60 |
| Anexo 2. Datos obtenidos en la formación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de la combinación hormonal auxina – citoquinina en fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad), a los 90 días de evaluación..... | 61 |
| Anexo 3. Datos obtenidos en la formación de estructuras organogénicas <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto de diferentes concentraciones hormonales de dos citoquininas en fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad), a los 90 días de evaluación. | 62 |
| Anexo 4. Visita del Director del Trabajo de Integración Curricular (TIC), Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, a los ensayos instalados en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL. | 63 |
| Anexo 5. Manual técnico para la difusión de los resultados a los actores sociales interesados. | 64 |
| Anexo 6. Tríptico para la difusión de los resultados a los actores sociales interesados. | 65 |
| Anexo 7. Análisis de significancia del número de explantes contaminados de <i>Cinchona officinalis</i> L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas. | 66 |
| Anexo 8. Análisis de significancia del número de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas..... | 66 |
| Anexo 9. Análisis de significancia del número de raíces de <i>Cinchona officinalis</i> L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas..... | 67 |
| Anexo 10. Análisis de significancia de la longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Anexo 11. Análisis de significancia de la longitud de raíces de <i>Cinchona officinalis</i> L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas..... | 68 |
| Anexo 12. Certificación de la traducción del Abstrac | 69 |

1. Título

Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas

2. Resumen

Cinchona officinalis L., es una especie forestal de gran relevancia económica, ecológica y medicinal, distribuida en los bosques de montaña de los Andes y destaca en la región sur del país como especie nativa. Las poblaciones *C. officinalis* han sido amenazadas por diversas actividades antropogénicas y por problemas en su entorno natural. Por tanto, es de vital importancia poner en práctica la utilización de técnicas alternativas, como es la de micropropagación vegetal, con el objetivo de conservar y aumentar los individuos de *C. officinalis*. La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar el balance hormonal óptimo para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas; probando en el medio de cultivo de Murashige y Skoog, diferentes combinaciones de auxina (Ácido Naftalenacético-ANA) – citoquinina (Kinetina-K), con cuatro tratamientos; y para las diferentes concentraciones de dos citoquininas 6-Bencilaminopurina y Kinetina, siete tratamientos y tres repeticiones, en condiciones de fotoperiodo. El material vegetal *in vitro* empleado fue a partir de callos, obtenidos en ensayos preestablecidos. Las variables evaluadas en la diferenciación de estructuras organogénicas fueron: contaminación, fenolización, número de formación de brotes *de novo*, número de formación de raíces *de novo*, número de días a la formación de brotes *de novo*, número de días a la formación de raíces *de novo*, longitud de los brotes *de novo* y longitud de las raíces *de novo*. Los resultados obtenidos demostraron que la contaminación se presentó, en las combinaciones de auxina – citoquinina, en los tratamientos T0 y T2 con el 20 % y 14 %, respectivamente; así mismo, en las concentraciones de dos citoquininas, en los tratamientos T1 y T2 con un 13 %, seguidos de los tratamientos T5 y T6 con un 7 %. En cuanto a la fenolización, no se registró en ninguno de los tratamientos. Con respecto a la formación de brotes *de novo* se obtuvo mejor resultado al utilizar la citoquinina BAP de forma individual, en el T2 con un promedio de 0,57 de formaciones. En la formación de raíces *de novo*, se obtuvo mejor resultado en la utilización de la citoquinina KIN en forma individual, en el T5 con el 93 %.

Palabras clave: Cinchona, auxina, citoquinina, micropropagación, órganos *de novo*.

Abstract

As a forest species of high economic, ecological, and medicinal significance, *Cinchona officinalis* L. is distributed in the mountain forests of the Andes and stands out in the southern region of the country as a native species. *C. officinalis* populations have been threatened by various anthropogenic activities and problems with their natural environment. Therefore, it is of vital importance to implement the use of alternative techniques, such as plant micropropagation, in order to conserve and increase *C. officinalis* individuals. In the present study, the goal was to determine the optimal hormonal balance for the differentiation of *de novo* organogenic structures from callogenic formations in *Cinchona officinalis* L. ; testing in Murashige and Skoog's culture medium, different combinations of auxin (Naftaleneacetic Acid-ANA) - cytokinin (Kinetin-K), with four treatments; and for the different concentrations of two cytokinins 6-Benzylaminopurine and Kinetin, seven treatments and three replicates, under photoperiod conditions. The *in vitro* plant material used was from the callus, obtained in pre-established trials. The variables evaluated in the differentiation of organogenic structures were: contamination, phenolization, number of *de novo* shoot formation, number of *de novo* root formation, number of days to *de novo* shoot formation, number of days to *de novo* root formation, length of *de novo* shoots and length of *de novo* roots. As shown by the results, contamination in the auxin-cytokinin combinations occurred in treatments T0 and T2 with 20 % and 14 %, respectively; likewise, in the concentrations of two cytokinins, in treatments T1 and T2 with 13 %, followed by treatments T5 and T6 with 7 %. As for phenolization, it was not recorded in any of the treatments. As regards the formation of *de novo* shoots, the best results were obtained when individual BAP cytokinins were used in T2, with an average of 0.57 formations per application. In *de novo* root formation, the best result was obtained when using cytokinin KIN individually, at T5 with 93 %.

Key words: *Cinchona*, auxin, cytokinin, micropropagation, *de novo* organs.

3. Introducción

Ecuador es considerado un país megadiverso por la abundante riqueza biológica que posee, ya que cuenta con 47 de los 103 ecosistemas descritos a nivel mundial (Martínez et al., 2018). Además, posee 16 087 especies de plantas vasculares y cuenta con más de seis centros de diversidad y endemismo de plantas (Bravo, 2014). Gran parte de esta diversidad se encuentra en la provincia de Loja, con la presencia de 3 039 especies y con la particularidad de que 639 son endémicas (Jorgensen y Yáñez, 1999; Aguirre et al., 2017).

Cinchona officinalis L., es una especie de gran importancia cultural y económica debido a que es una especie nativa de la región sur del país (Espinosa y Ríos, 2014), donde se considera el árbol de la vida o la planta salvadora de la humanidad (Acosta, 1946). Además, es una de las especies más significativas en la historia de la medicina en Ecuador, siendo el primer medicamento-terapéutico que aportó América a la medicina mundial (Buitrón, 1999), todo ello gracias a que la corteza de este árbol contiene un alcaloide llamado quinina, el mismo que entre los siglos XVIII y XIX se utilizó para el tratamiento y cura de enfermedades como la malaria y paludismo (Villar et al., 2018).

Además, *C. officinalis* posee un valor ecológico significativo para los bosques nublados de los Andes, ya que las raíces de esta especie ayudan a estabilizar el suelo en las laderas montañosas, lo que reduce la erosión del suelo ayudando a la conservación de los ecosistemas donde se encuentra presente (Zevallos, 1989; Bazán, 2021). Así mismo, posee asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos en sus raíces, mejorando la capacidad para absorber los nutrientes del suelo (Álvarez, 2016; Arévalo y Loján, 2023).

Sin embargo, las poblaciones naturales de *C. officinalis* y otras especies forestales están amenazadas por varios factores, como la deforestación, ampliación de la frontera agrícola y pecuaria, incendios forestales, incremento de la urbanización y la utilización de la especie (corteza) en el ámbito medicinal (Armijos et al., 2021), lo que ha provocado la pérdida significativa de individuos de la especie dentro de la provincia de Loja y Ecuador, haciendo que forme parte de la lista de especies en amenaza de extinción (Moreno et al., 2019).

Así mismo, esta especie afronta problemas en su entorno natural como la reducida viabilidad de las semillas, debido a que no pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo, por su corta viabilidad (Campos, 2016); Por ejemplo, Caraguay et al. (2016) manifiestan que el promedio de la viabilidad de las semillas de *C. officinalis* es de 58 %, y que pierde rápidamente el poder germinativo, dificultando la propagación sexual de la especie.

Ante esta problemática, la biotecnología surge como una solución, ya que brinda nuevas herramientas que mejoran las técnicas tradicionales de la propagación de especies forestales y el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales, principalmente con fines de conservación y mejoramiento de los recursos genéticos (Martínez et al., 2003); siendo, la micropropagación una técnica alternativa para mejorar la calidad genética, fisiológica y fitosanitaria de un gran número de especies, aumentando así su tasa de multiplicación potencial y facilitando la producción escala de especies vegetales. (Prieto et al., 2005; Kessel, 2008; Cueva et al., 2019)

En este sentido, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una de las técnicas que se han probado exitosamente para la conservación y propagación de *C. officinalis*, la cual cuenta con dos procesos principales: organogénesis y embriogénesis (Hay et al., 1986; Lima et al., 2018). Estas técnicas se basan en la totipotencialidad celular, donde cada célula posee información genética, para formar una planta completa o desempeñar funciones de cualquier órgano (Seijo, 2003). La organogénesis puede ser indirecta, cuando la formación de brotes adventicios sucede mediante una fase intermedia de formación de callos y directa, sin fase intermedia (Randel et al., 2015).

Con los antecedentes señalados, la presente investigación, formó parte del Proyecto de Investigación macro titulado: **“Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.”**, el mismo que se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja, y que tuvo como finalidad generar información científica mediante estudios alternativos, a través de metodologías no convencionales, como es el caso del uso de técnicas biotecnológicas, para la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas obtenidas de vitroplantas, que se han desarrollado en condiciones asépticas, en fotoperiodo, durante 90 días de evaluación (marzo – junio del 2023) y de esta manera incrementar la tasa de multiplicación potencial de la especie, en un menor tiempo y en espacios reducidos; y de esta forma contribuir a la conservación y protección de *Cinchona*; para lo cual, los objetivos que orientaron la presente investigación fueron los siguientes:

Objetivo general:

- Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la influencia de las auxinas y citoquininas, para la inducción de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperíodo.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperíodo.
- Determinar el efecto de las citoquininas, en condiciones de fotoperíodo, para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

4. Marco teórico

4.1. Antecedentes históricos de *Cinchona officinalis* L

La cascarilla o “quina” destaca como uno de los productos forestales más significativos del Ecuador. Su valor económico, específicamente en el ámbito medicinal, y su significado cultural como el origen histórico del “árbol de la vida”, han dado un reconocimiento a la provincia de Loja como principal fuente de *Cinchona* (Madsen, 2002).

La cascarilla o quina, fue descubierta en el siglo XVII, contiene en la corteza, principalmente el alcaloide quinina, que fue utilizado desde el tiempo de los Incas, para curar el paludismo o malaria, y fue considerada como la “salvación de la humanidad”, por ser remedio contra las fiebres palúdicas (Espanet, 2015).

La importancia de la cascarilla se debe a los alcaloides: quinidina, cincortina, quinina, etc., presentes en la corteza, siendo el último (quinina) el más importante antimalárico. Además, de taninos, flavonoides, amargos (ácidos triterpénicos), resinas, trazas de aceite esencial, entre otros compuestos químicos (Larreátegui, 2011). En el año de 1820 se aisló la quina, alcaloide con el cual se certificó su presencia en diversas especies de *Cinchona spp.* (Tapia, 2013).

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



Figura 1. Árbol de *Cinchona officinalis* L.

Fuente: Eras Guamán et al. (2019)

Según Zevallos (1989), la especie posee la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiácea

Género: *Cinchona*

Especie: *officinalis*

Nombre científico: *Cinchona officinalis* L.

Nombre común: cascarilla, quina, quinina, quina-quina, polvos de la condesa.

Cinchona officinalis L., es un árbol de 11 - 15 m de alto con un fuste cilíndrico de aproximadamente 30 - 40 cm de diámetro, la parte externa de la corteza es de color marrón oscuro ligeramente fisurada, mientras que la parte interna es de color arenoso que se oxida al contacto con el aire cambiando a un color anaranjado rojizo. Las hojas son elípticas, las flores hermafroditas, actinomorfas; cáliz gamosépalo de aproximadamente 4 mm de longitud, cilíndrico, con 5 lóbulos pequeños y el fruto es una cápsula marrón oscuro de forma elipsoide, semillas con forma fusiforme, rodeada por un ala membranosa (Zevallos, 1989).

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

El árbol de cascarilla, nativo de los valles andinos de Sudamérica, encontrados entre los 1 000 a 3 500 m s.n.m., en los países de Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador y Bolivia, se distribuye desde 10° latitud norte hasta 19° latitud sur, encontrándose en alturas que van desde los 700 m s.n.m. hasta los 2 900 m s.n.m (Garmendia, 2005) (Figura 1). En Ecuador se puede encontrar distribuido en las provincias de Bolívar, Chimborazo, El Oro, Cañar, Azuay, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja (Jorgensen y Yáñez, 1999).

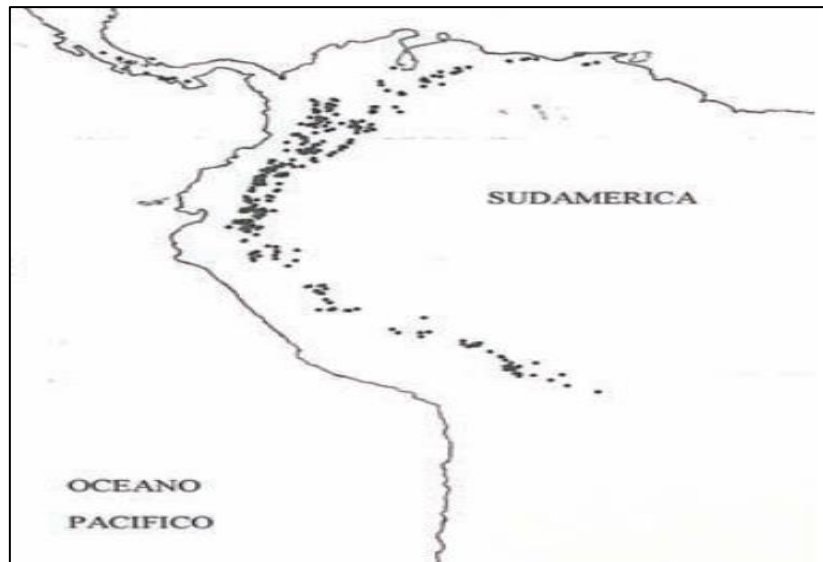


Figura 2. Distribución natural de *Cinchona*.

Fuente: Jorgensen y Yáñez, 1999.

4.4. Usos medicinales de *Cinchona officinalis* L

La principal utilidad de la especie es la producción de quinina, a través de la corteza y raíces, por lo que la convierte en un agente con propiedades antipiréticas (disminuye la fiebre); así mismo, para el tratamiento y prevención de la malaria y el paludismo. Además, es utilizada para la distrofia miotónica y problemas musculares asociadas con fallas del hígado.

Otro de los beneficios medicinales de la especie es para tratar el trastorno de la frecuencia cardiaca anormal, dado que influye en la resistencia del corazón. Adicionalmente, posee principios astringentes, por la alta concentración de taninos, lo que ayuda a cicatrizar heridas y úlceras (Muñoz, 2021).

4.5. Métodos de propagación vegetativa

La propagación de las plantas es una herramienta importante de apoyo para el desarrollo de programas de mejoramiento genético forestal, encaminados a reproducir individuos de alto nivel genético para el establecimiento de huertos semilleros, conservar genotipos de alto valor económico o en peligro de extinción y multiplicar especies de importancia genética, económica y paisaje (Iglesias et al., 1996).

Existen dos alternativas de propagación de plantas: sexualmente, la misma que se realiza básicamente por semillas y asexualmente, esta se realiza mediante tejidos vegetales tiene la particularidad de conservar la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular, para crear individuos con partes vegetativas de la planta (Osuna et al., 2016).

4.5.1. Propagación sexual

La propagación sexual, es aquella que se produce por la unión del material genético (masculino y femenino), que por medio 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 (Osuna et al., 2016).

4.5.2. Propagación asexual

La propagación asexual o también conocida como propagación 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. Esta técnica es de fundamental importancia, ya que existen plantas que no producen semillas y es imprescindible la utilización de métodos asexuales para la multiplicación (Reyes, 2015).

4.6. Micropropagación de las plantas por cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Implica el cultivo de diversas secciones de plantas, conocidas como "explantes", como por ejemplo fragmentos de hojas, tallos y raíces, junto con otros tejidos u órganos vegetales, en un entorno artificial dentro de recipientes de vidrio. En este entorno controlado, se supervisa la asepsia, el crecimiento y el desarrollo de estos tejidos. Es esencial prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados, como bacterias y hongos, mientras se asegura un desarrollo óptimo de los tejidos o plantas cultivadas (Martínez y Gago, 2008).

A pesar de ser la técnica de propagación vegetativa más recientemente, por razones de costo no ha reemplazado el uso de los sistemas tradicionales, especialmente en especies forestales, donde la producción masiva en viveros continúa siendo más económica. Esta técnica moderna, es un complemento de la producción de plantas en vivero, al permitir producir material de alta calidad genética, que podrá ser reproducido en forma masal por semilla (Jiménez y Agramonte, 2013)

4.6.1. Fases de la micropropagación vegetativa *in vitro*

4.6.1.1. FASE 0: Preparación de la planta madre

Para iniciar el cultivo bajo condiciones asépticas, es de fundamental importancia obtener explantes con niveles óptimos de nutrientes y un desarrollo adecuado. Para lo cual, es aconsejable mantener la planta madre, en un invernadero bajo condiciones controladas, esto durante un tiempo que puede variar desde varias semanas hasta meses (Castillo, 2004).

4.6.1.2. FASE 1: Desinfección del material vegetal

Una vez seleccionada la planta madre, se obtienen los fragmentos de los cuales se obtendrán los explantes, los cuales pueden ser yemas, trozos de hojas, secciones de raíces, semillas, etc. Previo a la extracción de los explantes, se realiza la desinfección de los fragmentos de la planta madre con la finalidad de eliminar cualquier contaminante externo (Castillo, 2004).

Después de desinfectar el material vegetal, es sumamente importante mantenerlo bajo condiciones de asépticas. Para conseguir esto, se utilizan cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se colocan en un tubo de cultivo, los mismos que contiene un medio de iniciación, lo que permite controlar la sanidad y la viabilidad (Castillo, 2004).

4.6.1.3. FASE 2: Inoculación del material *in vitro*

Después de haber realizado la desinfección de semillas o yemas según sea el caso del material vegetal seleccionado, se procederá a inocular en un medio de cultivo estéril. Esto se lo realizará en un tiempo determinado que varía de ocho a quince días, dando inicio a la germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales (cultivo *in vitro*) (Castillo, 2004).

4.6.1.4. FASE 3: Multiplicación de brotes

Durante esta fase, se espera que los explantes que sobrevivieron a las fases anteriores, produzcan brotes con múltiples hojas. Cada hoja contendrá una yema que se desarrollará al entrar en contacto con el medio de cultivo. Estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio, a partir de resiembras en tubos de cultivo. La cantidad de plantas obtenidas variarán según la especie vegetal y las condiciones del medio de cultivo (Castillo, 2004).

4.6.1.5. FASE 4: Elección de un medio de cultivo para enraizamiento de los explantes

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación, se trasladan a un medio libre de reguladores de crecimiento o que contenga solo hormonas del tipo auxinas, para promover el desarrollo de raíces (Castillo, 2004).

4.6.1.6. FASE 5: Aclimatación

El éxito o fracaso del proceso depende en gran medida de la aclimatación, ya que los explantes enraizados son sensibles a los cambios ambientales. Durante esta fase las plantas experimentan diferentes cambios, que están relacionados con los estomas, la fotosíntesis y el sustrato natural, lo que les permite adaptarse a vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004).

4.7. Fotoperiodo

El fotoperiodo es el conjunto de procesos que permite a las plantas regular las funciones biológicas, utilizando el número de horas de luz y oscuridad que hay a lo largo del día, durante el periodo de luz las plantas realizan la fotosíntesis y en el periodo de oscuridad realizan una serie de reacciones enzimáticas, las cuales producen los enlaces C - C de los carbohidratos (Miranda y Quiroz, 2013).

La inducción fotoperiódica es un proceso regulado que tiene lugar en el momento en el cual las hojas de una planta reconocen el fotoperiodo, a través del uso de los receptores denominados fitocromos y fotorreceptores, los cuales mandan señales al brote apical, influyendo directamente en las etapas de floración y crecimiento vegetativo de las especies (Cruz, 2008).

4.8. Medio de cultivo

El medio de cultivo, es una solución nutritiva de la técnica de cultivo *in vitro*, que funciona como sustrato y fuente de energía para el desarrollo de tejidos vegetales. El medio de cultivo es una combinación de componentes que varían según las características del tejido a desarrollar, estos pueden ser, callos, partes de hojas, células, partes de tallos, etc.; así mismo, interviene en el proceso morfogénético a seguir ya sea, para el cultivo de meristemos, organogénesis, embriogénesis somática, entre otros (Suárez, 2020).

4.8.1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962)

El medio Murashige y Skoog (MS-1962) fue desarrollado tomando como modelo de referencia el cultivo *in vitro* de tabaco, y siguiendo un procedimiento cuantitativo, se establecieron las concentraciones apropiadas de todos los nutrientes. Este medio es el más adecuado y más utilizado para la mayoría de las especies vegetales, a excepción de las especies sensibles a la salinidad debido a su alta concentración salina (Avenza, 2018).

4.8.2. Sales minerales del medio de cultivo (MS-1962)

Las sales minerales se clasifican en macro y micro nutrientes (Tabla 1), las cuales son elementos que constituyen el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

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

| N° | Solución madre | Componentes | Concentración (mg L ⁻¹) |
|----|----------------|---|-------------------------------------|
| 1 | Nitratos | Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃) | 1 650,00 |
| | | Nitrato de potasio (NO ₃ K) | 1900,00 |
| 2 | Sulfatos | Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 370,00 |
| | | Sulfato de manganeso (MnSO ₄ ·4H ₂ O) | 22,3 |
| | | Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·4H ₂ O) | 8,60 |
| | | Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O) | 0,025 |
| | | Cloruro de potasio (CaCl ₂ ·2H ₂ O) | 440,00 |
| 3 | Haloides | Yoduro de potasio (KI) | 0,83 |
| | | Cloruro de cobalto (CoCl ₂ ·6H ₂ O) | 0,025 |
| | | Fosfato di básico de potasio (KH ₂ ·PO ₄) | 170,00 |
| 4 | P, B, Mo | Ácido bórico (H ₃ ·BO ₃) | 6,20 |
| | | Molibdato de sodio (Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O) | 0,25 |
| | | Sulfato ferroso (FaSO ₄ ·7H ₂ O) | 27,81 |
| 5 | Na, Fe, EDTA | Ácido Etildiaminotetraacético (Na ₂ EDTA) | 37,31 |

4.9. Reguladores de crecimiento vegetal

Son compuestos producidos artificialmente o provenientes de otros organismos, los cuales cumplen un papel fundamental en la regulación de los diversos procesos bioquímicos a nivel celular en las especies vegetales. Los cuales se pueden clasificar según la estructura molecular, actividad a nivel vegetal, efectos estimulantes, etc., detallados en la Tabla 2 (Alcantara et al., 2019).

Tabla 2. Clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal.

| Fitohormonas | Variedades encontradas | Efecto a nivel vegetal | Efecto a nivel celular | Precursor orgánico |
|--------------|---|--|--|--------------------|
| Auxinas | AIA | Formación y elongación de tallos | División y elongación celular. Diferenciación celular. | L-Triptófano |
| | AIB | Producción de diferentes raíces adventicias. | Promoción división celular meristemática. Aumenta el contenido osmótico celular. | |
| | 2,4-D Ácido α-naftalenacético (NAA) (sintético) | Aumento de la dominancia apical. | Aumenta la permeabilidad celular. Aumento de producción proteica. Disminución de la presión de la pared celular. | |

| | | | | |
|--------------|--|---|---|-----------------|
| Giberelinas | GA1 GA2 GA3 | Aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante. Elongación de raíces, hojas jóvenes y floración. Alargamiento de segmentos nodales. Participan en procesos de iniciación floral Vital en fertilidad de plantas masculinas y femeninas Induce germinación de semillas., | Estimula la elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad. Promociona el crecimiento embrionario. Producida de manera endógena durante los procesos de germinación y desarrollo apical. | ent- Kaureno |
| Citoquininas | Kinetina Zeatina Benciladenina 4 hidroxifeniletíl alcohol | Induce la iniciación y elongación de raíces. Activa la senescencia de las hojas. Estimulan desarrollo Fotomorfogénico vegetal. Estimula la generación de brotes axilares a nivel vegetal. | Pueden sustentar e iniciar la proliferación de tejidos vegetales madre. Permite producir una alta proliferación y división celular. Se produce con mayor abundancia en las células de los ápices radiculares. | Adenina |

4.9.1. Auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales, que regulan aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006). Son reguladores de crecimiento que estimulan la dominancia apical, el crecimiento y división celular, desarrollo meristemático, inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos, son producidas a partir de órganos en crecimiento y en el meristemo de la raíz. La forma predominante de las auxinas en estado natural de las plantas, son el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los mismos que son sintetizados en los ápices foliares, desde los cuales se desplazan en forma basipétala a la parte radical (Suárez, 2020).

Entre las auxinas sintetizadas, se encuentran: el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), las cuales se usan en una concentración de 0,001 a 10 mg L⁻¹. En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, los más utilizados son: AIB y ANA, este último es una hormona de crecimiento, que estimula el desarrollo de las raíces y la misma puede ser combinada con citoquininas para controlar la formación de brotes y raíces. Es de vital importancia, en la micropropagación de meristemas y organogénesis, ya que inducen a la formación de raíces

adventicias en los callos no diferenciados, ayudando a la división de células, que tienen la finalidad de obtener precocidad en el ciclo del cultivo (Pinto et al., 2012)

4.9.2. Citoquininas

Las citoquininas tienen la capacidad para estimular la división celular, la inhibición de desarrollo de raíces adventicias 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 (Rodríguez y Moreno, 2010).

Según Borjas et al. (2020) las citoquininas están compuestas de adeninas y son clasificadas como: 2-Bencilaminopurina (BAP), 2 isopentil adenina (2IP), Kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,03 – 30 mg L⁻¹, según el tipo de desarrollo que se desee inducir.

La Kinetina (KIN), es una sustancia que estimula la división celular, no se ha demostrado que esté presente como compuesto natural. Pero a partir de 1995, se aislaron varias sustancias a partir de ADN, mismas que ocurren naturalmente y las cuales están relacionadas directamente con KIN, en la actualidad comprende la sustancia más conocida para la división celular. Otra de las citoquininas, es 6-Bencilaminopurina (BAP), un regulador de crecimiento vegetal, producido sintéticamente y responsable de procesos de división celular, tales como la formación y crecimiento de brotes axilares, maduración de cloroplastos y diferenciación celular (Roca y Mroginski, 1991).

4.10. Callogénesis *in vitro*

La callogénesis es uno de los métodos para producir masivamente material vegetal en condiciones *in vitro*. Con la ayuda de reguladores de crecimiento y la inducción de callos, se puede obtener la formación de órganos *de novo*, mediante organogénesis indirecta o de embriones somáticos, mediante embriogénesis somática indirecta (Páez et al., 2012).

4.10.1. Cultivo de callos

El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido, la formación comienza con el aislamiento de un órgano o tejido diferenciado, los cuales subsiguientemente se diferencian ante el efecto de auxinas exógenas en el medio de cultivo, presentando en las células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejidos indiferenciados.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, por lo que un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienden a aumentar la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos, dependiendo fundamentalmente del balance hormonal auxina - citoquinina en el medio de cultivo.

El callo puede tener diferentes características fenotípicas dependiendo de la especie o genotipo con la que se trabaje, así como las condiciones de cultivo *in vitro*. El color puede variar de blanco, blanco amarillento a pardo, los callos que no se regeneran muestran una apariencia que varía entre acuosa o compactos, secos y nodulares (Litz y Jarret, 1991).

4.11. Organogénesis

Consiste en la formación *in vitro* de nuevos órganos, como raíces o tallos adventicios, a partir de explantes sin meristemos preexistentes (Suárez, 2020).

4.11.1. Organogénesis directa

Esta vía morfométrica ocurre cuando los brotes se originan a partir de meristemos caulinares, los cuales se han desarrollado directamente de las células presentes en el explante. La serie de eventos que se realizan en la organogénesis, son el establecimiento del explante, la producción de un meristemo, crecimiento de una yema y la elongación de un tallo. Los explantes que dan origen a tallos mediante la organogénesis, son generalmente aquellos con alto grado de juvenilidad y que contienen células con bajos niveles de diferenciación (Suárez, 2020).

4.11.2. Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta es un proceso en el que nuevos brotes crecen a partir de células que provienen de una capa de callo que se desarrolla a partir del explante (Pérez et al., 2008). Durante las etapas de desarrollo de este proceso, las células se diferencian, lo que les permite recuperar su competencia y sufrir cambios internos que determinan sus funciones y características.

Los tallos formados durante la organogénesis indirecta surgen de nodos de meristemos conocidos como meristemoides inmersos en el tejido calloso, y esta formación está estrechamente relacionada con el tipo de planta que se va a propagar (Suárez, 2020).

4.12. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso en el que se desarrolla un embrión a partir de una célula sin fusión de gametos, permitiendo la regeneración de plantas a partir de células somáticas diferenciadas (Guan et al., 2016). Esta forma de apomixis, conocida como embrionía adventicia, ocurre naturalmente en la naturaleza.

En el contexto del cultivo de tejidos, este fenómeno ha demostrado ser muy efectivo en la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la bipolaridad del embrión, que facilita la automatización del proceso de producción que conduce a una rápida reproducción de las plantas en un corto período de tiempo.

Además, al aplicar los principios de la cinética microbiana, estas estructuras pueden encapsularse para producir "semillas artificiales" útiles para la propagación y mejora de plantas (Freire, 2003).

4.13. Investigaciones de propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L

A continuación, en la Tabla 3 se muestra de manera cronológica los trabajos realizados en propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., en el laboratorio de Micropropagación vegetal.

Tabla 3. Síntesis cronológica de los trabajos realizados en la micropropagación *in vitro* por cultivo de tejidos de la especie *Cinchona officinalis* L.

| N° | Tema | Autor | Año | Objetivos |
|----|--|-------------------------------|------|--|
| 1 | “Procesos biotecnológicos para la propagación <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de diferentes fuentes de material vegetal” | Lima Jiménez, Nelson Ramiro | 2016 | – Evaluar la desinfección de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L, aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión. – Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la fase de multiplicación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> . |
| 2 | “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas, en la Argelia - Loja” | Chamba Granda, Lorena Melania | 2017 | – Probar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. a partir de vitroplantas para maximizar el brotamiento de los explantes. – Encontrar el nivel adecuado de auxinas que conlleven a obtener un mayor enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. |
| 3 | “Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de | González Valdívico, | 2018 | – Probar el efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de la especie |

| | | | | |
|---|---|---|------|--|
| | vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja” | Karina Cecibel | | <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia y cantón de Loja. – Determinar el balance hormonal adecuado para la inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio. |
| 4 | “Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” | Méndez Montaño, Katherine Isabel | 2018 | – Probar el efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones, en la fase de formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L. – Determinar el mejor balance hormonal para la formación estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. |
| 5 | Procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos en <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja. | Guartanza Loja, Jessica Alejandra | 2019 | – Ensayar la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> 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 <i>Cinchona officinalis</i> L., de explantes provenientes de plántulas del invernadero. |
| 6 | “Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja” | Paredes Jiménez, Daniela Katherine | 2019 | – Determinar el efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L. – Establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. |
| 7 | “Procesos biotecnológicos para la inducción <i>in vitro</i> de raíces a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” | Cueva Coronel, Claudia Milena | 2020 | – Evaluar el balance hormonal de dos auxinas, para la inducción <i>in vitro</i> de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. – Evaluar el balance hormonal auxina - citocinina, para la inducción <i>in vitro</i> de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. |

| | | | | |
|----|---|-------------------------------------|------|--|
| 8 | Procesos biotecnológicos para la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., de relictos boscosos de la provincia de Loja | Rueda Rodríguez, Johanna Gabriela | 2020 | <ul style="list-style-type: none"> – Evaluar el balance hormonal auxina – citocinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L. – Determinar la influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L. |
| 9 | “Inducción de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., de relictos boscosos de la provincia de Loja” | Lima Suquilanda, Katty María | 2020 | <ul style="list-style-type: none"> – Evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina, para la inducción de estructuras <i>de novo</i>, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio. – Evaluar el efecto de una Citoquinina, para la inducción de estructuras <i>de novo</i>, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a nivel de laboratorio. |
| 10 | Caracterización morfológica de los órganos vegetativos y reproductivos de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de dos relictos boscosos en la provincia de Loja. | Correa Torres, Gabriela Dayanara | 2021 | <ul style="list-style-type: none"> – Realizar la caracterización morfológica de los órganos vegetativos de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos relictos boscosos de la Provincia de Loja, con la finalidad de establecer diferencias cuali-cuantitativas en las dos procedencias. – Determinar la caracterización morfológica de los órganos reproductivos de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos relictos boscosos de la Provincia de Loja, con la finalidad de establecer diferencias cuali-cuantitativas en las dos procedencias. |
| 11 | Sistematización bibliométrica de las investigaciones realizadas sobre cultivo de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la universidad nacional de Loja. | Orellana Sigcho, Jessica del Carmen | 2022 | <ul style="list-style-type: none"> – Sistematizar la información generada de investigaciones realizadas en cultivos de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la Universidad Nacional de Loja. – Realizar un análisis crítico comparativo de las metodologías implementadas en las investigaciones sobre cultivo de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L. |
| 12 | Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad. | Camacho Sánchez, Jordy Gabriel | 2023 | <ul style="list-style-type: none"> – Determinar el efecto del fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. – Evaluar el efecto de la total oscuridad y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. |

| | | | | |
|----|--|-------------------------|------|---|
| 13 | Procesos morfológicos para la inducción de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad. | Ramon Abad, Sayda Nidia | 2023 | – Determinar el efecto del fotoperiodo y dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. – Evaluar el efecto de la oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. |
|----|--|-------------------------|------|---|

Fuente: Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja y LMV, 2023.

5. Metodología

5.1. Ubicación del sitio de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal (Bloque 15 del campus universitario), de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la Universidad Nacional de Loja (Figura 3), el cual se encuentra ubicado en la provincia de Loja, cantón de Loja, entre las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S - 79° 12' 00" O.



Figura 3. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal (LMV) de la UNL.

5.2. Material vegetal

Para el establecimiento de los ensayos, el material vegetal empleado fue en base de callos de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de cultivos preestablecidos, la procedencia del mismo fue del árbol nro. 5 del sector Uritusinga, provincia de Loja, identificados por el Proyecto de Investigación Macro: “Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L”; los cuales, se subcultivaron por un periodo de 30 días, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962) suplementado con 3 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético 2-4 D + 0,5 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP), en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, éste material no recibió tratamiento de desinfección por tratarse de material vegetal *in vitro* (Camacho, 2023), es decir en condiciones de asepsia.

5.3. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo

5.3.1. Preparación de medio de cultivo

En la Figura 3 se observa cómo se preparó el medio de cultivo basal con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS-1962); suplementado con las vitaminas: tiamina 1,0 mg L⁻¹ y mio-inositol 100 mg L⁻¹; sacarosa 2 % y agar 0,6 %.

Las combinaciones hormonales, que se utilizaron para la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., estuvieron conformados por el balance hormonal auxina - citoquinina: ácido naftalenacético (ANA) + Kinetina (KIN), en diferentes concentraciones, en condiciones de fotoperiodo, las cuales constituyeron los tratamientos evaluados (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones hormonales evaluadas para determinar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| TRATAMIENTOS | REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg L ⁻¹) | |
|--------------|--|-----|
| | ANA | KIN |
| T0 | 0,0 | 0,0 |
| T1 | 0,5 | 1,5 |
| T2 | 0,5 | 2,5 |
| T3 | 0,5 | 3,5 |

Leyenda: T= Tratamientos; ANA= Ácido naftalenacético; KIN: Kinetina.

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

Posteriormente, el pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,2$, utilizando para ello hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl). Luego se distribuyó el medio de cultivo a razón de 25 ml en cada frasco de vidrio y finalmente fueron esterilizados en la autoclave, a temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm² de presión, durante el tiempo de 20 minutos (Figura 4).

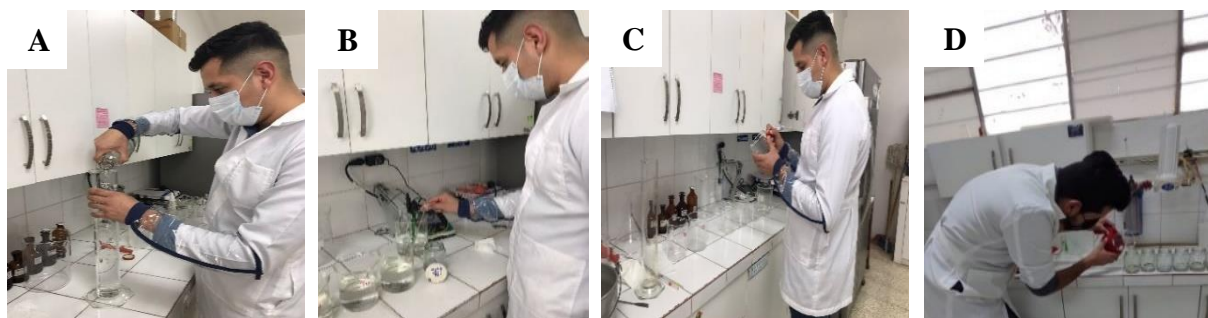


Figura 4. A) Preparación medio de cultivo MS-1962 + KIN y BAP; B) Ajuste del Ph; C) Etiquetado de tratamientos; D) Distribución del medio de cultivo.

5.3.2. *Inoculación in vitro de los explantes*

Una vez seleccionados los callos, en la cámara de flujo laminar y en condiciones de asepsia, con la ayuda de un bisturí, pinzas y cerca del mechero bunsen, se tomaron los segmentos de callos (explantes) y se inocularon en el medio de cultivo MS-1962, con las diferentes combinaciones de concentraciones de auxina - citoquinina, correspondiente a cada tratamiento. Se colocaron dos explantes en cada frasco de vidrio (Figura 5).



Figura 5. A) Cámara de flujo laminar para la inoculación; B) Inoculación de los explantes; C) Explantes inoculados en el medio de cultivo MS-1962.

5.3.3. *Incubación in vitro*

La incubación de los explantes se realizó cuando se colocaron los frascos inoculados en el cuarto de incubación, bajo las condiciones de fotoperiodo constante, de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y en un rango de temperatura de 22 a 25 °C, durante el periodo de evaluación de 90 días evaluación (Figura 6).



Figura 6. Distribución de los tratamientos en el cuarto de incubación del LMV, en donde permanecieron los explantes de *Cinchona officinalis* L., durante 90 días de evaluación.

5.3.4. Diseño experimental

En esta fase se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos, tres repeticiones y donde la unidad experimental fue un explante/callos y (Tabla 5).

Tabla 5. Especificaciones del diseño experimental de las diferentes combinaciones hormonal auxina - citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| Unidad experimental | Un explante |
|---|-------------|
| Número de tratamientos | 4 |
| Número de repeticiones | 3 |
| Número de frascos por repetición | 5 |
| Número total de frascos por tratamiento | 15 |
| Número total de frascos del ensayo | 60 |
| Número total de explante por frasco | 2 |
| Número de explantes por repetición | 10 |
| Número total de explantes del ensayo | 120 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

5.3.4.1. Factores y niveles

Los factores y niveles evaluados y sus concentraciones se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores y niveles de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en fotoperiodo.

| Factores | Niveles mg L ⁻¹ |
|---|----------------------------|
| Niveles de concentración de auxina (A) | 1. 0,0 |
| | 2. 0,5 |
| Niveles de concentración de citoquinina (C) | 1. 0,0 |
| | 2. 1,5 |
| | 3. 2,5 |
| | 4. 3,5 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

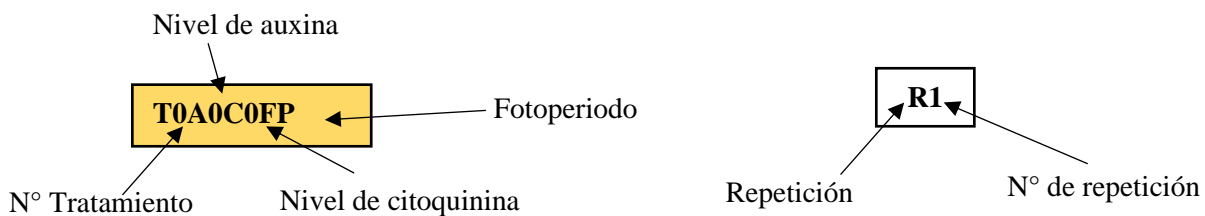
5.3.5. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental en el laboratorio

Los tratamientos y repeticiones del ensayo de evaluación del efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, para la diferenciación de órganos *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas en fotoperiodo, estuvieron distribuidos en el cuarto de incubación del laboratorio, de la siguiente manera (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| | | | | | |
|-----------------|----|----|-----------------|----|----|
| T0A0C0FP | | | T1A1C1FP | | |
| R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| T2A2C2FP | | | T3A3C3FP | | |
| R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |

Legenda: Tn= Tratamiento; Rn= Repetición; A=Auxina; C=Citoquinina; FP=Fotoperiodo



5.3.6. Variables evaluadas

Las evaluaciones se realizaron mediante observación directa a partir del tercer día de realizada la inoculación y posteriormente, para la determinación del número de explantes contaminados y fenolizados cada 5 días; para el número de formación de brotes/raíces *de novo* y el número de días a la formación de brotes/raíces *de novo* se evaluó cada 15 días; finalmente, la longitud de los brotes/raíces *de novo*, se evaluó a los 15, 45 y 90 días de establecidos los ensayos.

Cabe mencionar que para la toma de datos de la variable del número de formaciones *de novo* raíces, se elaboró la Tabla 9 donde constó de una escala que fue de 0 a 4, debido a la cantidad de raíces que presentaban algunos explantes al instalar el ensayo. Así mismo, para las variables longitud de los brotes/raíces *de novo*, se promedió entre el brote/raíz *de novo* de menor y de mayor tamaño.

Tabla 8. Escala para el registro de los datos de las formaciones de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

| Raíces | | | |
|----------------|----------|--|---|
| 0 | Sin raíz | | 0 |
| 1 a 10 | Bajo | | 1 |
| 11 a 20 | Medio | | 2 |
| 21 a 30 | Alto | | 3 |
| 31 en adelante | Muy alto | | 4 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

5.3.7. Análisis de datos

A partir de los datos obtenidos en las variables evaluadas de los tratamientos ensayados, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (al no cumplir con el supuesto de normalidad) y la prueba de comparación de medias de Stewart-Holmes, y los resultados se presentan en histogramas (barras) para cada una de las variables. El análisis de datos se realizó a través de hojas de cálculo en Microsoft Excel y en el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

5.4. Metodología para determinar el efecto de las citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, en la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas

5.4.1. Obtención del material vegetal

Los explantes tuvieron la misma procedencia del objetivo uno y fueron inoculados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962), con las diferentes concentraciones de citoquininas: BAP y Kinetina, probadas de forma individual e incubados en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad (16/8).

5.4.2. Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo basal que se utilizó fue el de Murashige y Skoog (MS-1962); suplementado con vitaminas: tiamina 1,0 mg L⁻¹ y mio-inositol 100 mg L⁻¹); sacarosa 2 % y agar 0,6 %.

Las concentraciones de citoquininas empleadas para la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., estuvieron conformadas por: bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN), en diferentes concentraciones, las cuales constituyeron los tratamientos a ser evaluados (Tabla 9).

Tabla 9. Citoquininas evaluadas para determinar la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., provenientes de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| TRATAMIENTOS | REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg L ⁻¹) | |
|--------------|--|-----|
| | BAP | KIN |
| T0 | 0,0 | 0,0 |
| T1 | 1,5 | |
| T2 | 2,5 | |
| T3 | 3,5 | |
| T4 | | 1,5 |
| T5 | | 2,5 |
| T6 | | 3,5 |

Leyenda: T= Tratamientos; BAP= 6-Bencilaminopurina; KIN: Kinetina.

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

Posteriormente, el pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,2$, utilizando para ello hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl), según fue el caso; a continuación, se distribuyó el medio de cultivo a razón de 25 ml en cada frasco de vidrio y finalmente fueron esterilizados en la autoclave, a una temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm² de presión, durante un tiempo de 20 minutos.

5.4.3. *Inoculación in vitro de los explantes*

Una vez seleccionados los callos, en la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia, con la ayuda de un bisturí, pinzas y cerca del mechero bunsen, se tomaron las formaciones callogénicas y se inocularon en el medio de cultivo MS-1962, con las diferentes concentraciones de citoquininas: BAP o Kinetina, que corresponden a cada tratamiento, se colocó dos explantes en cada frasco de vidrio.

5.4.4. *Incubación in vitro*

La incubación de los explantes se realizó en el cuarto de incubación, bajo un fotoperiodo constante de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, durante un periodo de 90 días de evaluación.

5.4.5. *Diseño experimental*

Aquí se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con siete tratamientos, tres repeticiones y donde la unidad experimental fue un explante/callo (Tabla 10).

Tabla 10. Especificaciones del diseño experimental de las diferentes concentraciones de citoquininas, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| Unidad Experimental | Un explante |
|--|-------------|
| Número de tratamientos | 7 |
| Número de repeticiones | 3 |
| Número de frascos por repetición | 5 |
| Número total de frascos por tratamiento | 15 |
| Número total de frascos del ensayo | 105 |
| Número total de explante por frasco | 2 |
| Número de explantes por repetición | 30 |
| Número de unidades experimentales del ensayo | 210 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

5.4.5.1. Factores y niveles

Los factores, niveles a evaluar y sus concentraciones se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Factores y niveles de las concentraciones de citoquininas, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| Factores | Niveles mg L ⁻¹ |
|--|----------------------------|
| Niveles de concentración de citoquinina (BAP) | 1. 0,0 |
| | 2. 1,5 |
| | 3. 2,5 |
| | 4. 3,5 |
| Niveles de concentración de citoquinina (Kinetina) | 1. 0,0 |
| | 2. 1,5 |
| | 3. 2,5 |
| | 4. 3,5 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

5.4.6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones del diseño experimental en el laboratorio

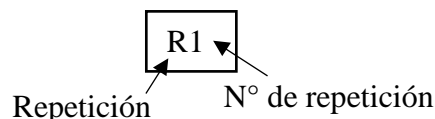
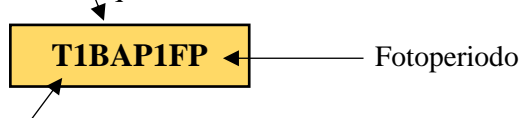
Los tratamientos y repeticiones del ensayo para evaluar el efecto de las dos citoquininas, para la diferenciación estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas en fotoperiodo, estuvieron distribuidos de la siguiente manera (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de dos concentraciones de citoquininas, en la inducción *in vitro* de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

| | | | | | |
|-----------------|----|----|-----------------|----|----|
| T0FP | | | T1BAP1FP | | |
| R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| T2BAP2FP | | | T3BAP3FP | | |
| R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| T4K1FP | | | T5K2FP | | |
| R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| T6K3FP | | | | | |
| R1 | R2 | R3 | | | |

Leyenda: Tn= Tratamiento; R= Repetición; BAP=; K=Kinetina; FP=Fotoperiodo

Nivel de citoquinina



Nº de Tratamiento

5.4.7. Variables evaluadas

Las variables fueron evaluadas mediante observación directa; así: para la determinación del número de explantes contaminados y fenolizados se realizó cada 5 días; para el número de formación de brotes/raíces *de novo* y el número de días a la formación de brotes/raíces *de novo*

se evaluó cada 15 días; finalmente, la longitud de los brotes/raíces *de novo*, se evaluó a los 15, 45 y 90 días de establecidos los ensayos.

Es importante señalar, que para la toma de datos de la variable del número de formaciones *de novo* raíces, se elaboró una escala Tabla 13 debido a la cantidad de raíces que presentaban algunos explantes al momento de la siembra. Así mismo, para las variables de longitud de los brotes/raíces *de novo*, se obtuvo un promedio entre el brote/raíz *de novo* de menor y de mayor tamaño.

Tabla 13. Escala para la toma de datos de la formación de raíces *de novo* en explantes de *Cinchona officinalis* L.

| Raíces | | | |
|----------------|----------|--|---|
| 0 | Sin raíz | | 0 |
| 1 a 10 | Bajo | | 1 |
| 11 a 20 | Medio | | 2 |
| 21 a 30 | Alto | | 3 |
| 31 en adelante | Muy alto | | 4 |

Fuente: Proyecto de Investigación Cinchona-UNL-2023.

5.4.8. Análisis de datos

A partir de los datos obtenidos en las variables evaluadas de los tratamientos ensayados, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (al no cumplir con el supuesto de normalidad) y la prueba de comparación de medias de Stewart-Holmes, y los resultados se presentan en histogramas (barras) para cada una de las variables. El análisis de datos se realizó a través de hojas de cálculo en Microsoft Excel y en el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

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

La difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación, se realizó mediante el desarrollo de las siguientes actividades:

- Se socializó los resultados del Trabajo de Integración Curricular (TIC) a los actores sociales involucrados en el campo forestal, que formaron parte en la casa abierta de la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Se socializó los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC), ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona, del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la FARNR, de la Universidad Nacional de Loja.
- Se elaboró un póster y tríptico para la difusión de los resultados del Trabajo de Integración Curricular.
- Se elaboró un manuscrito de artículo científico con los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Se elaboró y se publicó el documento final del Trabajo de Integración Curricular (TIC).

6. Resultados

6.1. Efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

6.1.1. Contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

La contaminación de los explantes se registró a partir del quinto día de haber sido instalado el ensayo, en los tratamientos T0 y T2 con el 20 % y 13 % de contaminación, respectivamente. Por otro lado, los tratamientos T1 y T3 no presentaron contaminación, tal como se muestra en la Figura 7, los cuales estadísticamente presentaron significancia ($p = 0,0085$). La Figura 8 muestra la contaminación que se registró en el medio de cultivo MS - 1962 y posteriormente en los explantes, específicamente en los tratamientos T0R1F2 y T2R1F1.

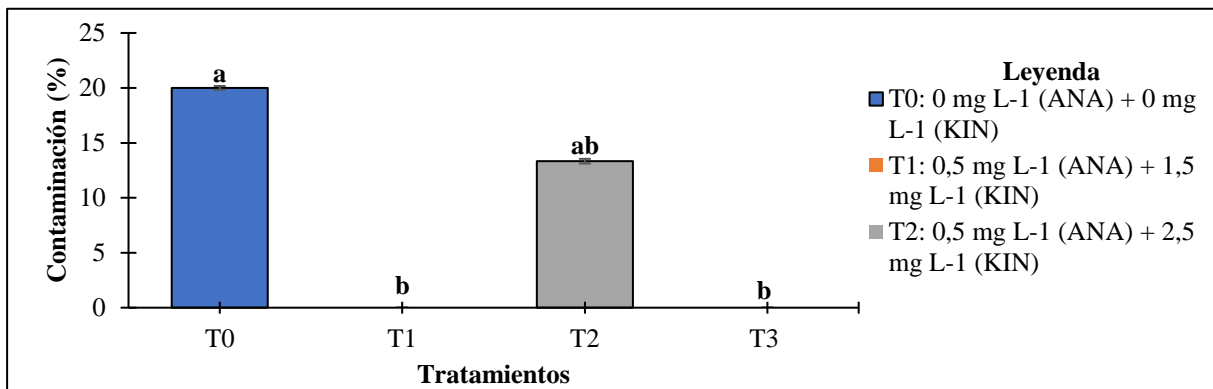


Figura 7. Porcentaje del número de explantes contaminados de *Cinchona officinalis* L., en dos concentraciones de ANA y cuatro de KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

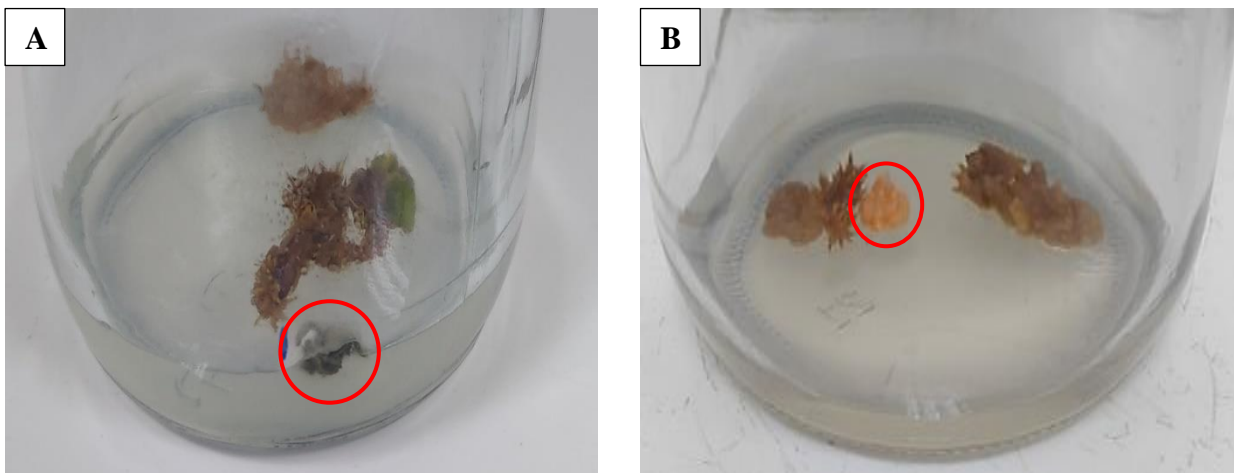


Figura 8. Ilustración de la contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L, iniciado en el medio de cultivo en los tratamientos: A) T0R1F2 (0 mg L⁻¹ ANA + 0 mg L⁻¹ KIN y B) T2R1F1 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ KIN).

6.1.2. Fenolización de los explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

Con respecto a la oxidación fenólica en explantes de *C. officinalis*, al cabo de 90 días de evaluación, no se registró en los explantes, en los cuatro tratamientos ensayados.

6.1.3. Formación de brotes de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

En la figura 9, se observa los tratamientos que registraron mayor número de brotes *de novo* por explante. Los tratamientos que destacaron fueron T0 y T2 (ocho brotes) con un promedio de 0,27 brotes cada uno. Sin embargo, en los tratamientos T1 y T3 registraron menor número (seis brotes) con un promedio de 0,20 brotes cada uno, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p = 0,3986$). En la Figura 10 se muestran los brotes *de novo* a partir de callos a los 90 días de evaluación, en condiciones de fotoperiodo.

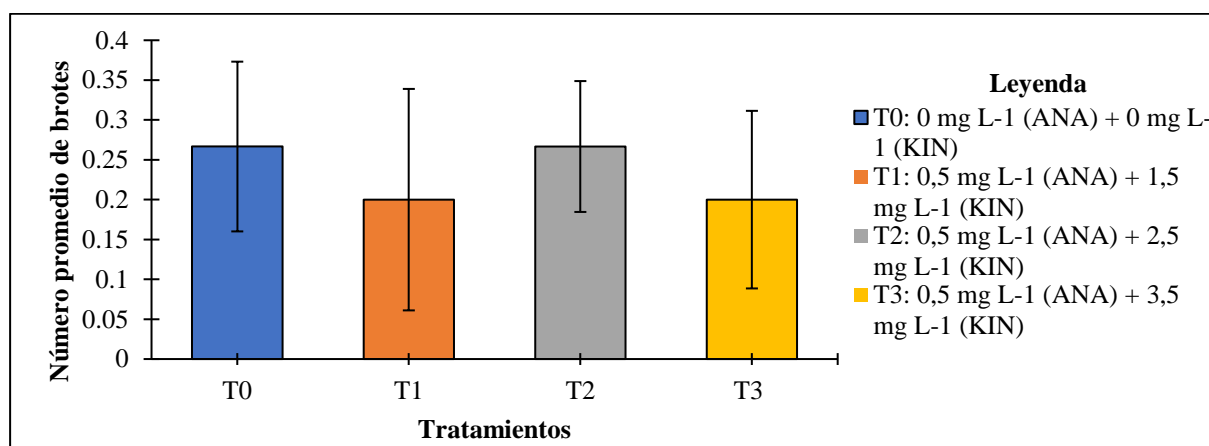


Figura 9. Número promedio de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

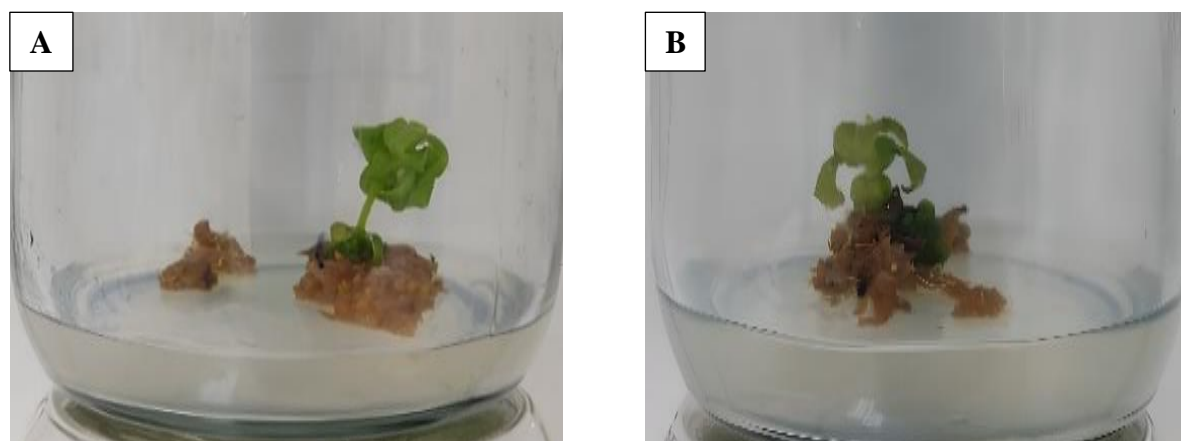


Figura 10. Brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en dos tratamientos: A) T1: 0,5 mg L⁻¹ (ANA) + 1,5 mg L⁻¹ (KIN) y B) T3: 0,5 mg L⁻¹ (ANA) + 3,5 mg L⁻¹ (KIN), a los 90 días de evaluación.

6.1.4. Formación de raíces de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

Con respecto a la formación de raíces *de novo* en estructuras callogénicas de *C. officinalis*, durante 90 días de evaluación, en la Figura 11, se muestra que el tratamiento T1, registró el mayor porcentaje con el 87 % de formación de raíces, seguido del tratamiento T2 con 85 %. Mientras tanto, los tratamientos con menor porcentaje con el 73 % y 71 % fueron el T3 y T0 respectivamente, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p = 0,3235$). En la Figura 12 se muestra la formación de raíces *de novo* en los explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación en condiciones de fotoperíodo.

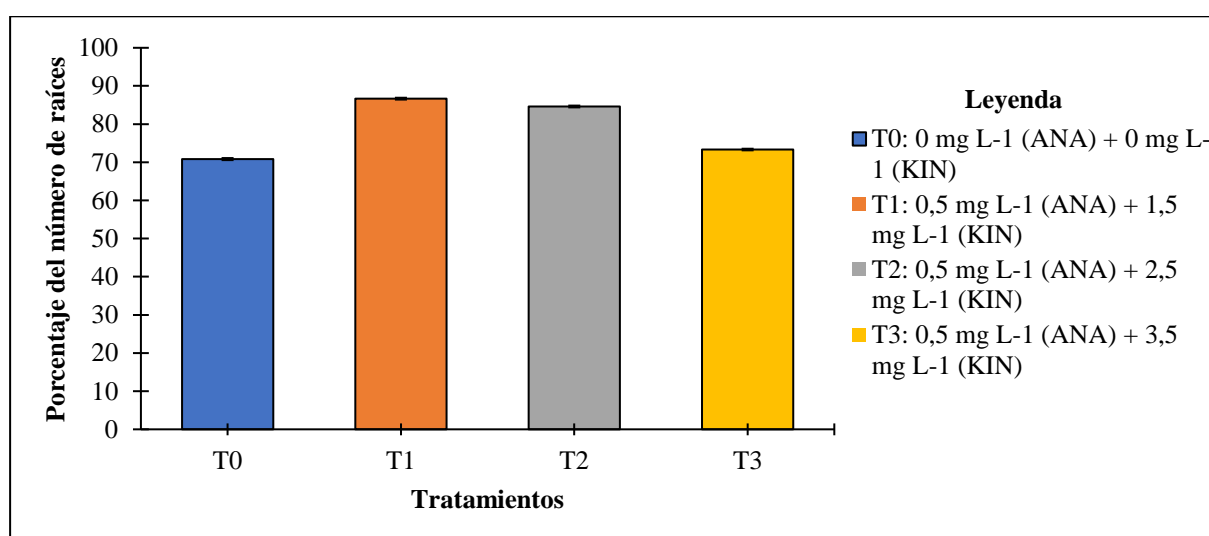


Figura 11. Porcentaje del número de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperíodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

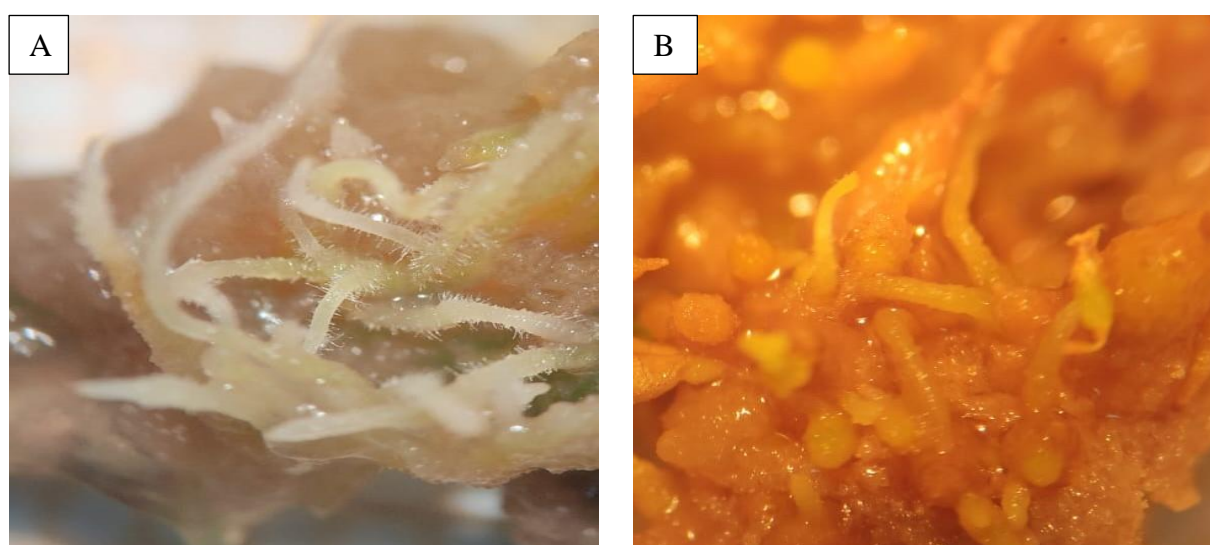


Figura 12. Raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., observados en los tratamientos: A) T1: 0,5 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ KIN y B) T3: 0,5 mg L⁻¹ ANA + 3,5 mg L⁻¹ KIN, a los 90 días de evaluación.

6.1.5. Días a la formación de brotes de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

La formación de brotes *de novo* en explantes de *C. officinalis*, como se observa en la Figura 13, ocurrió a partir de los 15 días de evaluación, destacando los tratamientos el testigo T0, T2 y T3 con tres brotes. Mientras que, el T1 registró la formación de dos brotes *de novo* a partir del día 30. Manteniéndose constante hasta el día 60 en todos los tratamientos. A partir de esta evaluación, se registraron nuevos brotes hasta la última toma de datos (90 días).

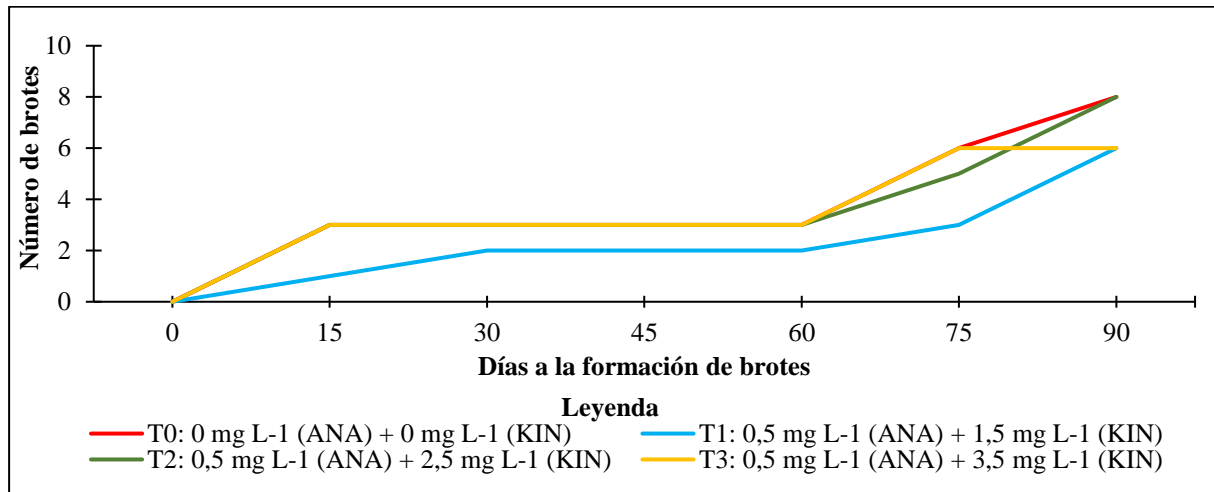


Figura 13. Número de días a la formación de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.1.6. Días a la formación de raíces de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

En la Figura 14, se observa la formación de raíces *de novo* en explantes de *C. officinalis*, explantes durante los primeros 15 días en todos los tratamientos (T0; T1; T2 y T3), a partir de la inoculación de los explantes. Además, la aparición de raíces *de novo* se fue dando paulatinamente en cada una de la toma de datos.

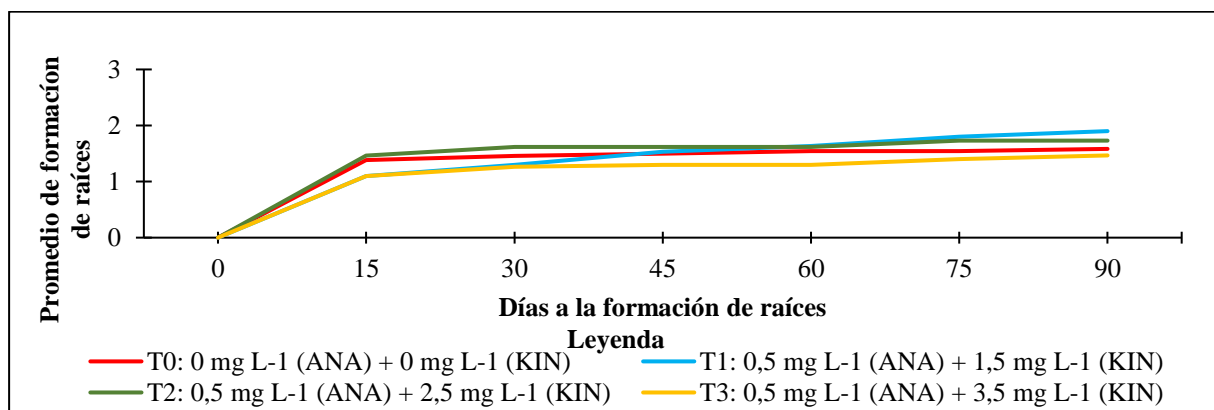


Figura 14. Número de días a la formación de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.1.7. Longitud de brotes de novo de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación.

En cuanto a la longitud de brotes *de novo* de *C. officinalis*, el tratamiento que registró mayor valor fue el T2 con una longitud promedio de 2,23 mm; seguido del tratamiento T0 con 1,32 mm. Mientras que los tratamientos con menor longitud fueron el tratamiento T3 y T1 con 1,12 y 0,90 mm, respectivamente. Lo cual no mostró diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p = 0,3781$) (Figura 15).

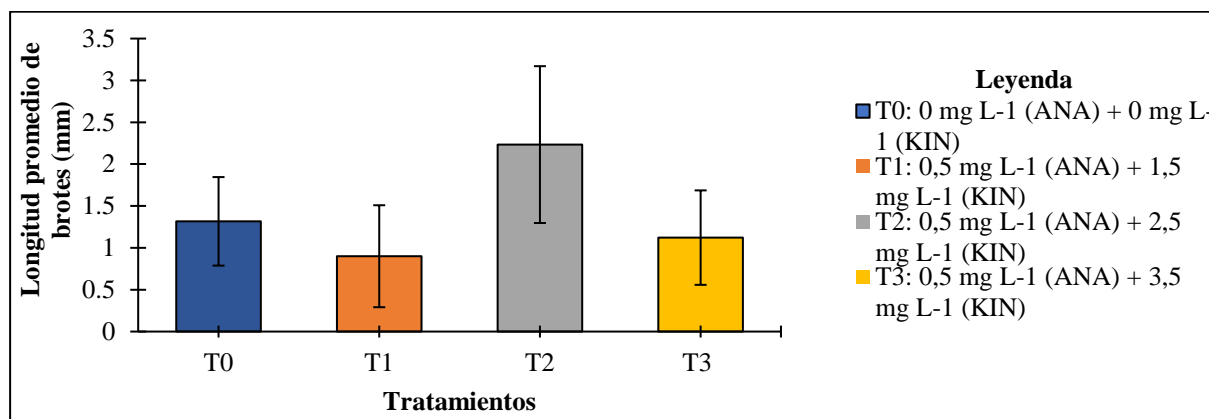


Figura 15. Longitud promedio de los brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.1.8. Longitud de raíces de novo de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina, a los 90 días de evaluación

Como se puede observar en la Figura 16, la longitud promedio de raíces *de novo* fue superior a 1,5 mm; destacándose el T1 con una longitud promedio de 2,97 mm; seguido del T2 con 2,09 mm; mientras que los tratamientos T3 y T0 registraron menor longitud promedio de raíces *de novo*, con 1,82 y 1,79 mm respectivamente. Resultados que no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p = 0,3534$).

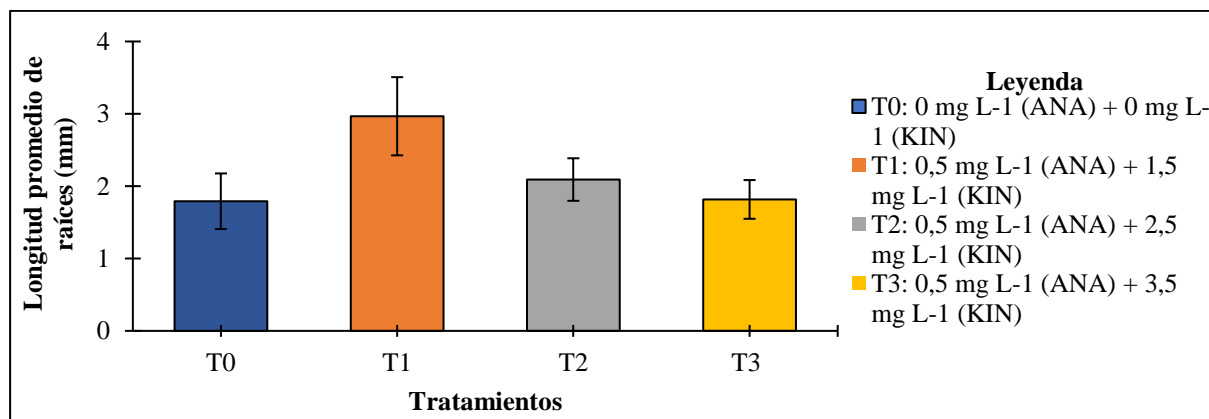


Figura 16. Longitud promedio de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la combinación hormonal de ANA + KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.2. Determinar el efecto de dos citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas

6.2.1. Contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Los explantes de *C. officinalis*, que registraron el mayor porcentaje de contaminación con el 13 % fueron los tratamientos T1 y T2; seguidos de los tratamientos T5 y T6 con un porcentaje de 7 %. Por otra parte, tanto el tratamiento testigo T0 como los tratamientos T3 y T4 no presentaron contaminación, como se puede observar en la Figura 17. Estos valores no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0628$). En la Figura 18 se muestra la contaminación de los explantes a los 90 días de evaluación en dos tratamientos: T1R2F5 y T2R1F4.

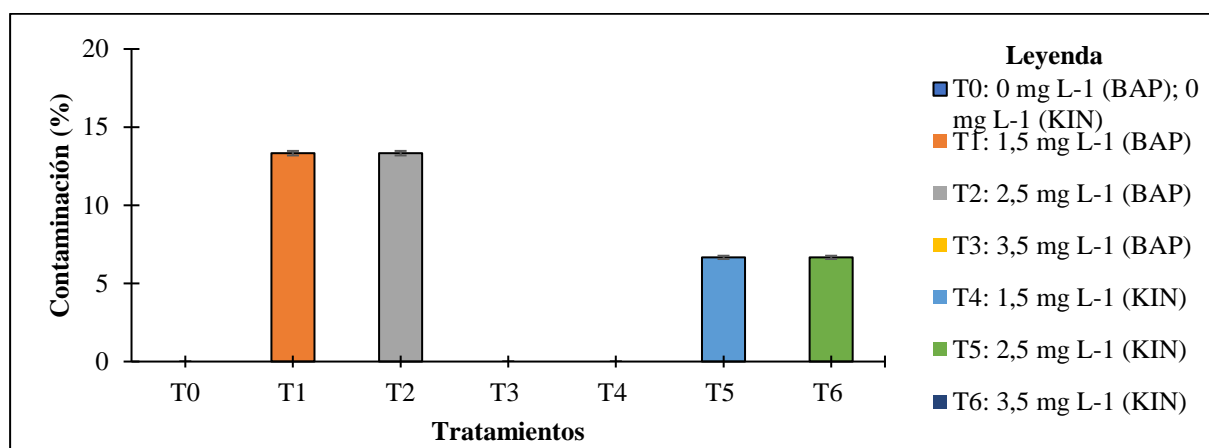


Figura 17. Porcentaje del número de explantes contaminados de *Cinchona officinalis* L, en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

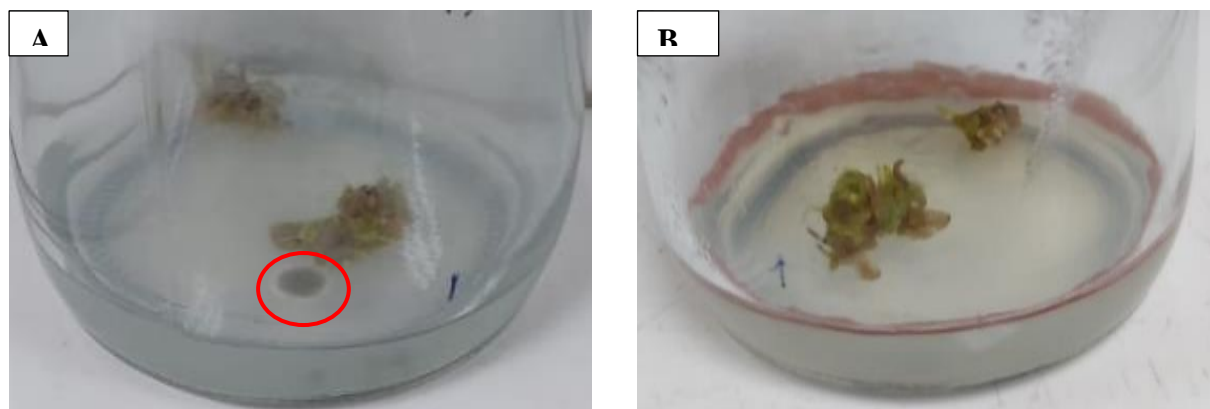


Figura 18. Ilustración de la contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L, en los tratamientos: A) T1R2F5 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) y B) T2R1F4 ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

6.2.2. Fenolización de los explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

En el presente ensayo no se registraron explantes de *C. officinalis* con oxidación fenólica, en ninguno de los tratamientos ensayados.

6.2.3. Formación de brotes de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

En la Figura 19 se puede observar que los explantes de *C. officinalis*, registraron mayor número de brotes *de novo* en los tratamientos T2 y T3, con un promedio de 0,57 y 0,47 brotes *de novo*, respectivamente. Mientras que, los tratamientos T1 y T6 registraron menor número con un promedio de 0,20 brotes *de novo* cada uno, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p = 0,5362$). La Figura 20 muestra los brotes *de novo*, a partir de callos a los 90 días de evaluación en dos tratamientos específicos: T2R3F2 y T3R3F1.

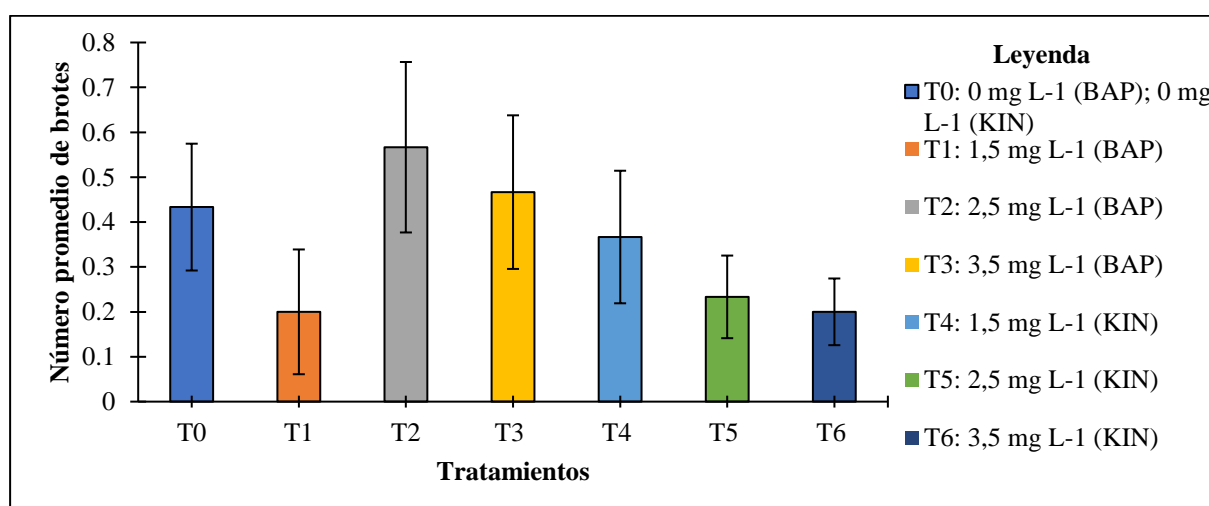


Figura 19. Número promedio de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

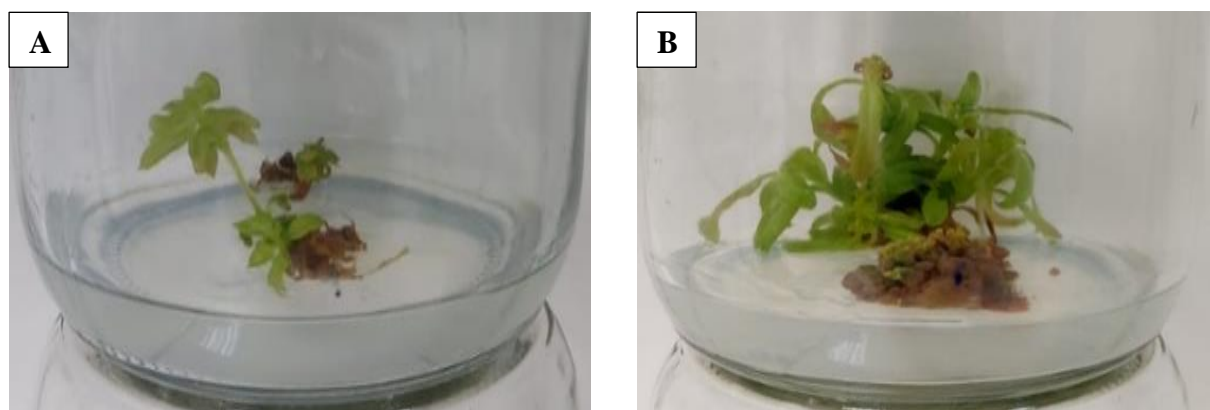


Figura 20. Brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en dos tratamientos: A) T2R3F2 (2,5 mg L⁻¹ BAP) y B) T3R3F1 (3,5 mg L⁻¹ BAP), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

6.2.4. Formación de raíces de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Con respecto a la formación de raíces *de novo* de *C. officinalis*, en la Figura 21, se muestra que los tratamientos T5 y T6, registraron el mayor porcentaje con el 93 % y 86 % de formación de raíces *de novo*, respectivamente. Entre tanto, los tratamientos con menor porcentaje fueron el tratamiento testigo T0 con un 77 % y el tratamiento T3 con el 67 % de formaciones de raíces *de novo*, resultados que estadísticamente presentaron significancia ($p = 0,0169$). La Figura 22 muestra la formación de raíces *de novo* a partir de callos a los 90 días de evaluación, específicamente en dos tratamientos: T5R3F4 y T6R3F1.

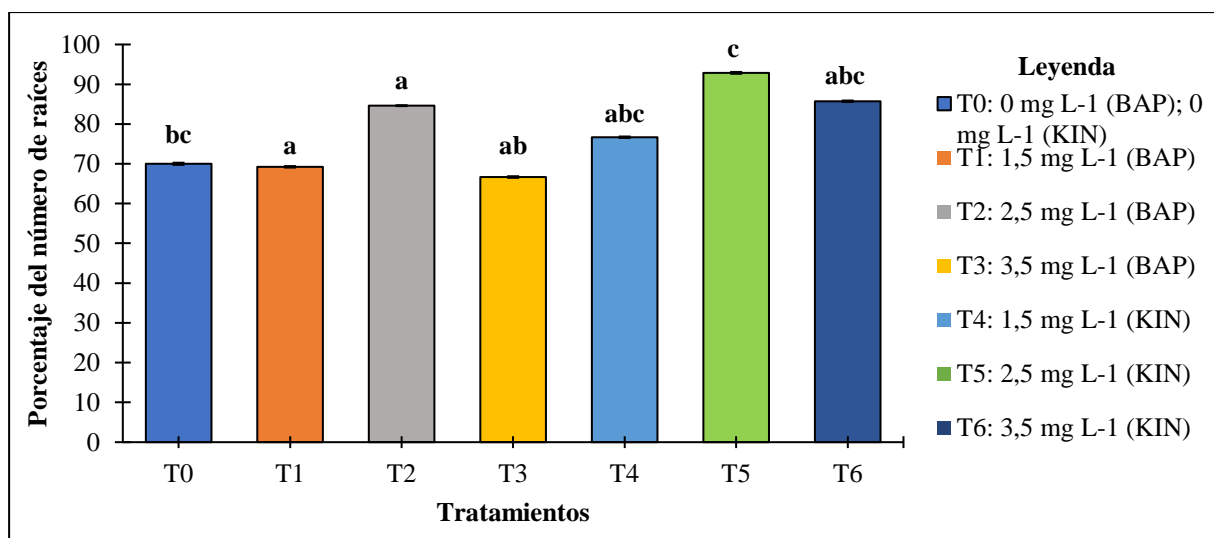


Figura 21. Porcentaje del número de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

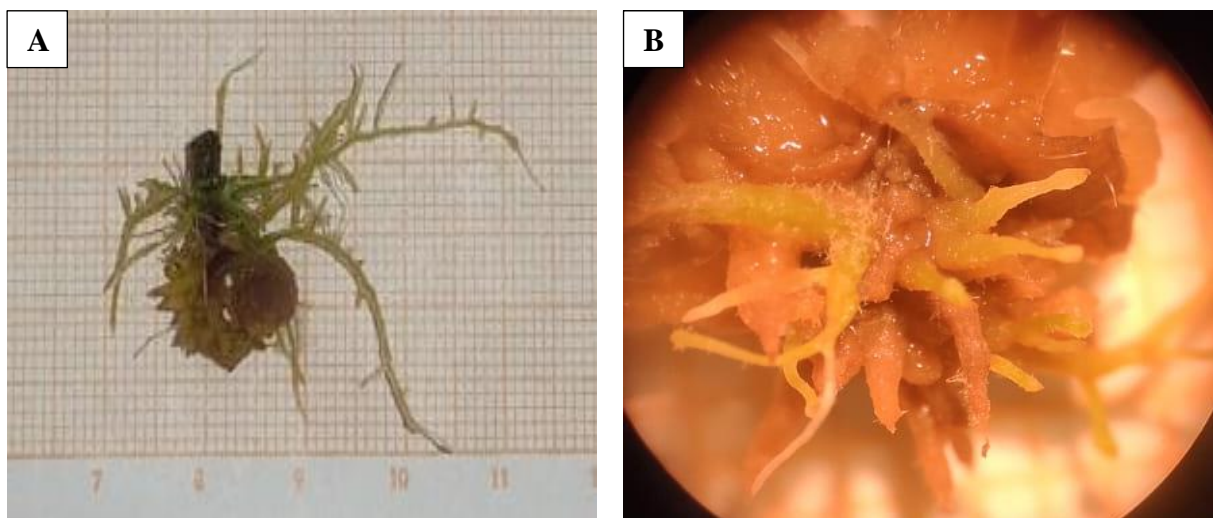


Figura 22. Ilustración de la formación de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., observadas en los tratamientos: A) T5R3F4 (1,5 mg L⁻¹ KIN) y B) T6R3F1 (3,5 mg L⁻¹ KIN), en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación.

6.2.5. Número de días a la formación de brotes de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Como se muestra en la Figura 23, la formación de brotes *de novo* en explantes de *C. officinalis*, se evidenciaron a partir de los 15 días de evaluación en todos sus tratamientos. Destacándose el tratamiento T2 con siete brotes *de novo*, seguido del T5 con cuatro brotes *de novo*. Cabe señalar que la aparición de brotes *de novo* se registró paulatinamente en cada una de las evaluaciones, hasta el último día (90 días), a excepción del T6 que se estabilizó a los 45 días.

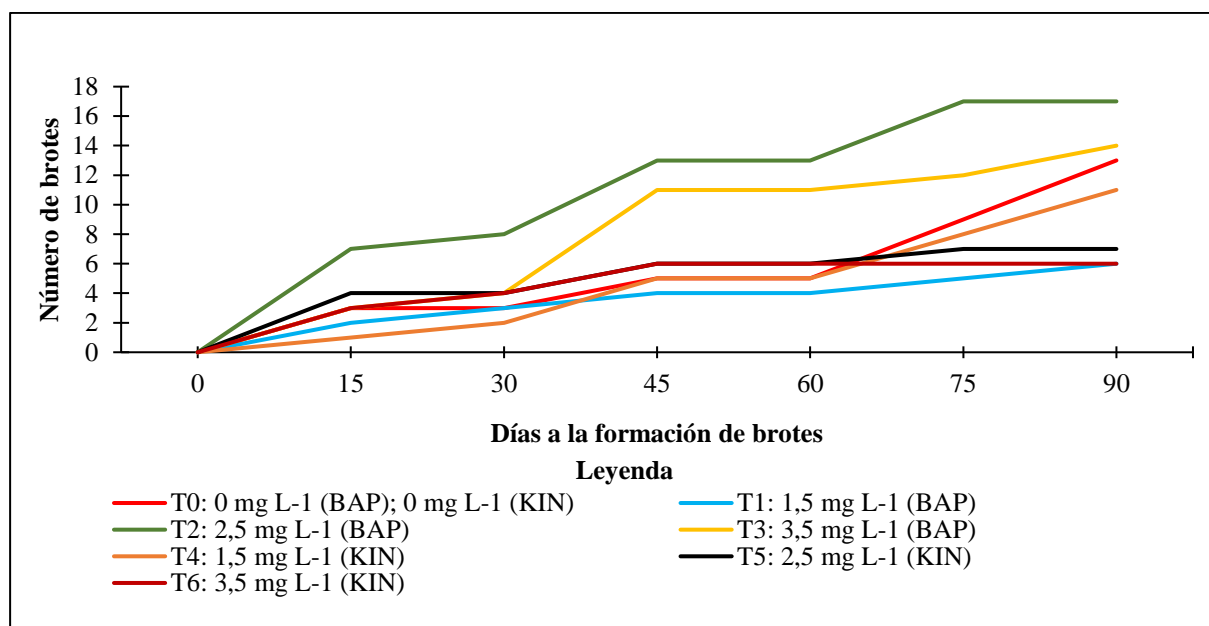


Figura 23. Número de días a la formación de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.2.6. Número de días a la formación de raíces de novo en explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Como se observa en la Figura 24, la formación de raíces *de novo* en explantes inició desde el día 15 en todos los tratamientos. Cabe destacar que la aparición de raíces *de novo* fue dándose gradualmente en cada una de la toma de datos, hasta el último día que se realizó la evaluación final de datos (90 días).

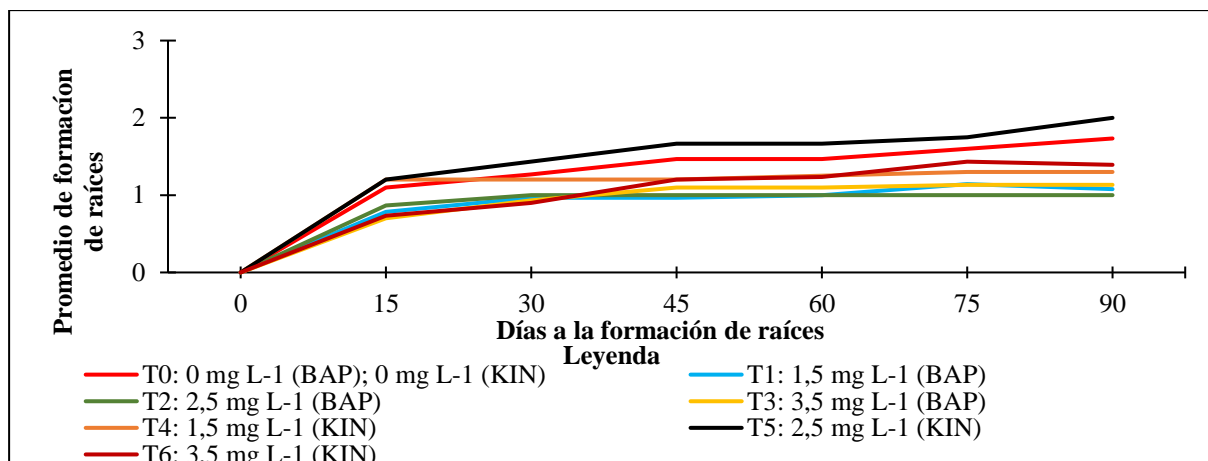


Figura 24. Número de días a la formación de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en cuatro concentraciones de BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.2.7. Longitud de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Como se puede observar en la Figura 25, en cuanto a la longitud de brotes *de novo* de *C. officinalis*, el tratamiento que registró mayor valor fue el T2, con una longitud promedio de 3,68 mm, seguido del T3 con 2,91 mm; mientras que los tratamientos T1 y T4 registraron menores valores con 0,74 y 1,34 mm respectivamente, lo cual no mostró diferencia estadística significativa ($p = 0,5858$).

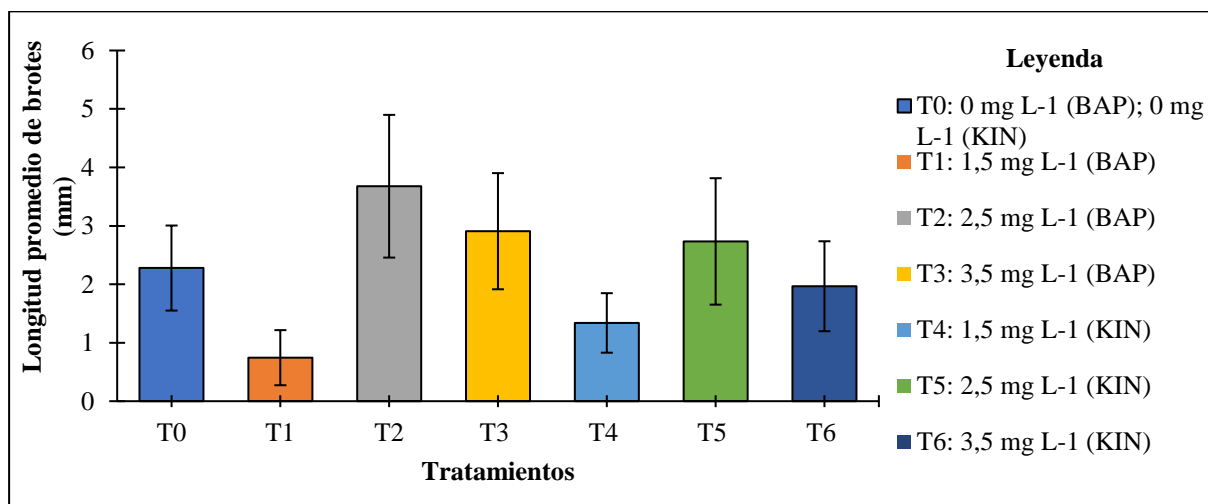


Figura 25. Longitud promedio de los brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en diferentes concentraciones de dos citoquininas BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.2.8. Longitud de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas, a los 90 días de evaluación

Como se puede observar en la Figura 26, la longitud de raíces *de novo* fue superior a 1,3 mm destacándose el T5 con una longitud promedio de 2,78 mm, seguido del tratamiento T4

con 2,47 mm, mientras que los tratamientos con menores resultados fueron el T3 y T1 con una longitud de 1,43 mm y 1,96 mm respectivamente, lo cual mostró diferencia estadística significativa ($p = 0,0315$).

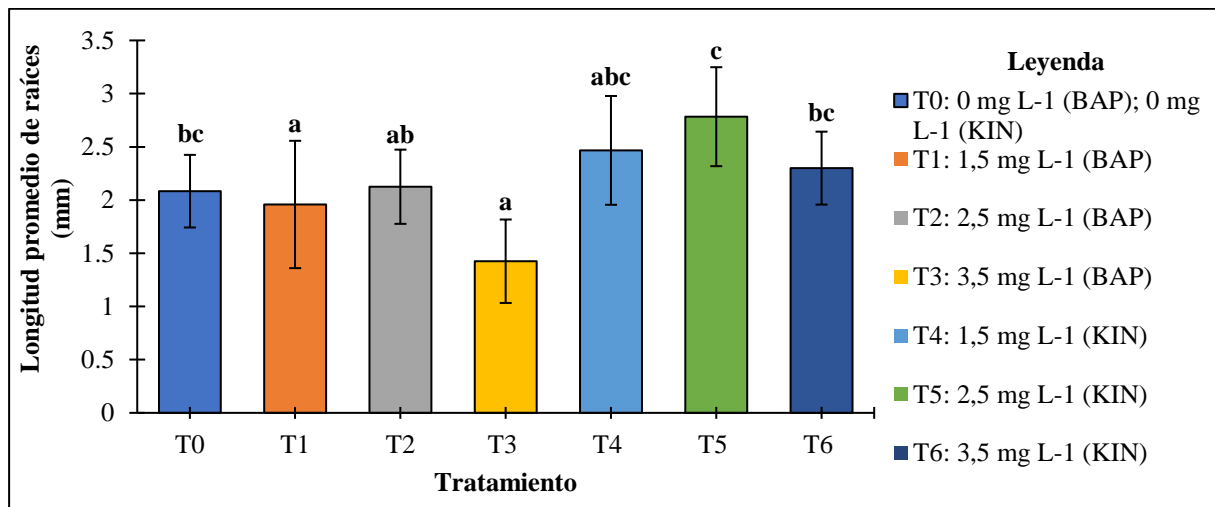


Figura 26. Longitud promedio de las raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., en cuatro concentraciones de BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.

6.3. Difusión de los resultados de la investigación para su conocimiento y aplicación

En la Figura 27, se evidencian las distintas actividades que se cumplieron, con la finalidad de difundir los resultados de la presente investigación a los actores interesados, mismas que se detallan a continuación:

- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte en la casa abierta de la carrera de Ingeniería Forestal, realizada el 28 de julio del 2023.
- Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular (TIC), ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona, del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la FARNR de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un póster y tríptico para la difusión de los resultados del Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Elaboración de un artículo científico con los resultados del Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Elaboración y publicación del documento final del Trabajo de Integración Curricular (TIC).

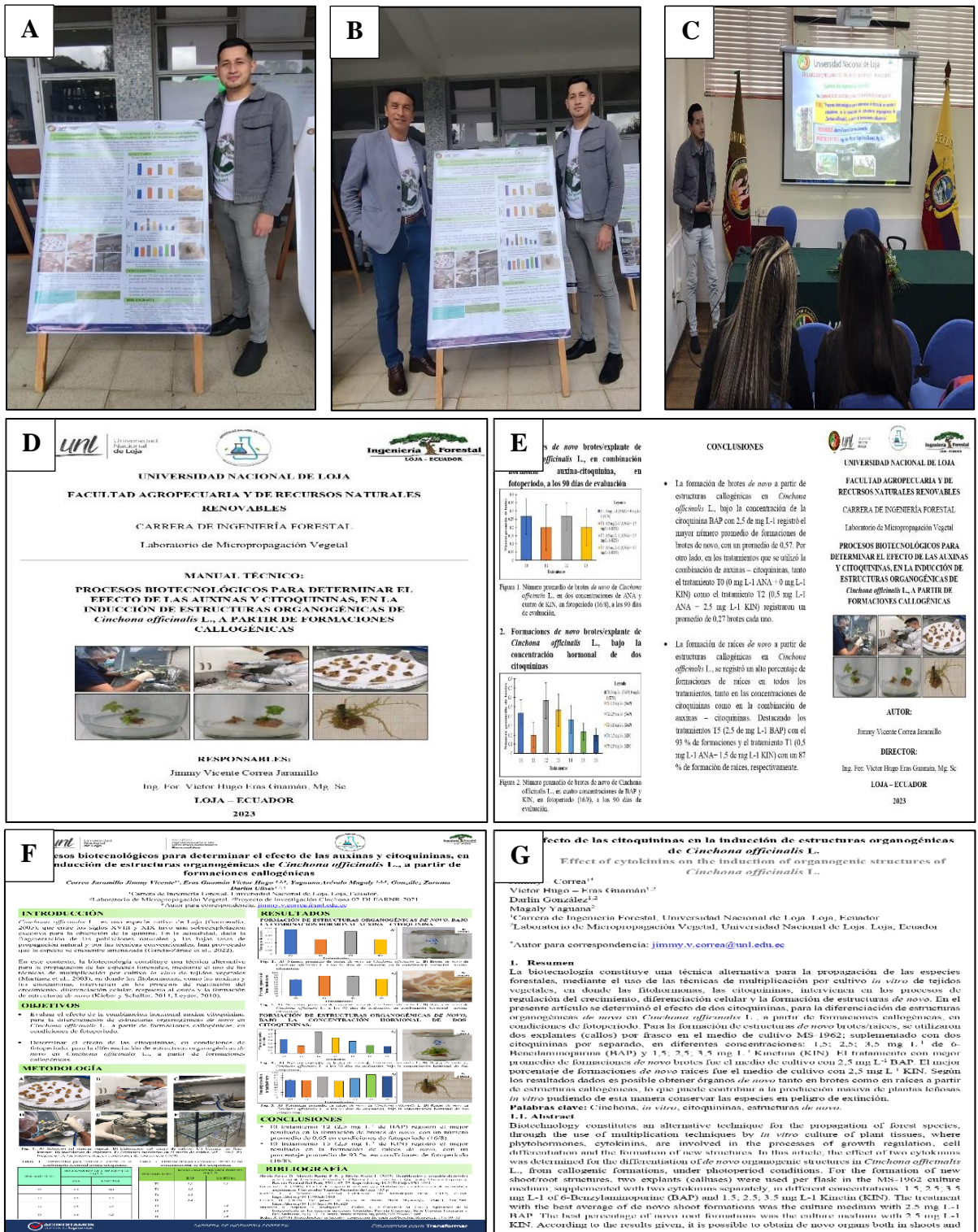


Figura 27. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales; A) Exposición de los resultados preliminares del TIC a los actores interesados que asistieron a la en la casa abierta organizada por la CIF; B) Presentación del poster; C) Socialización de los resultados del TIC ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación Cinchona D) Elaboración de un manual técnico; E) Elaboración de un tríptico derivado del TIC; F) Elaboración de un póster científico; y, G) Elaboración de un borrador del artículo científico, derivado del TIC.

7. Discusión

7.1. Contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina - citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación

Según Perea et al. (2009) manifiestan que la contaminación microbiana está relacionada a la presencia no deseada de microorganismos en cultivos *in vitro*; así, entre los contaminantes más frecuentes se encuentran los hongos, bacterias y levaduras, mismos que son considerados uno de los principales problemas a la hora de establecer cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.

En ese sentido, la presente investigación al analizar la combinación hormonal auxina – citoquinina, registró contaminación en los tratamientos T0 (0 mg L⁻¹ ANA + 0 mg L⁻¹ KIN) con un 20 % y el T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ KIN) con un 13 %, resultados inferiores a los obtenidos por Rueda (2020), en la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., utilizando la combinación hormonal de auxina – citoquinina, donde se registró 16 % de contaminación.

En relación a las concentraciones de dos citoquininas, se registró contaminación en los tratamientos T1 (1,5 mg L⁻¹ BAP) y T2 (2,5 mg L⁻¹ BAP) con 13 %, mientras que, en los tratamientos T5 (2,5 mg L⁻¹ KIN) y T6 (3,5 mg L⁻¹ KIN) un 7 % de contaminación, estos resultados muestran un nivel superior de contaminación a los obtenidos por Ramon (2023), en su estudio de inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., bajo diferentes concentraciones de citoquininas, donde registró el 6,67 % de contaminación.

La presencia de contaminación en el medio de cultivo de MS-1962 puede atribuirse, según Hernández y González (2010) a dos fuentes distintas: en primer lugar, a los microorganismos que habitan en la superficie o el interior de la muestra vegetal (endófitos); y en segundo lugar, por microorganismos introducidos durante las actividades de manipulación llevadas a cabo en el laboratorio. Lo cual, es corroborado por Reed y Tanprasert (1995), así como por Suárez (2020), quienes señalan que la proliferación de microorganismos en el medio de cultivo tiene distintos factores, como la presencia de microorganismos en el aire, agua, superficies cercanas al medio de cultivo de tejidos *in vitro* y así como al uso y manipulación de materiales y equipos contaminados en el laboratorio.

7.2. Fenolización de los explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina – citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación

La oxidación fenólica de los explantes se presenta como un ennegrecimiento o necrosis del tejido (Díaz et al., 2021), siendo este fenómeno el resultado de la acción de las enzimas como las polifenoloxidasas y tirosinasas, las mismas que se liberan generalmente cuando los tejidos sufren heridas o cortes (Hernández y González, 2010). En la presente investigación, no se observó fenolización en los explantes de *C. officinalis*, resultados que difieren a los presentados por Camacho (2023), quien obtuvo un 6 % de oxidación fenólica al emplear la combinación hormonal auxina – citoquinina, y de igual forma a los datos registrados por Ramon (2023), que en su investigación, donde utilizó diferentes concentraciones de citoquininas, presentó un 88,27 % oxidación fenólica.

Esto podría atribuirse a la procedencia del material vegetal utilizado, ya que se utilizaron vitroplantas, en las cuales no se realizaron incisiones en los explantes, dado que guarda relación con la presencia de compuestos fenólicos en los tejidos o con la posible necrosis en los explantes según lo señalado por Azofeifa (2009); Sánchez y Salaverría (2004). Otra posible explicación de que los explantes no presenten fenolización podría estar relacionada con el efecto de las citoquininas, especialmente el BAP, ya que promueve la formación de clorofila, mejorando así los procesos fotosintéticos y energéticos, logrando que la fenolización se reduzca o desaparezca (Mazid et al., 2011). Además, George et al. (2008) señalan que la presencia de fenolización puede ser prevenida o reducida cuando el material vegetal ha sido cultivado en oscuridad total.

7.3. Número y longitud promedio de formación de brotes *de novo* en explantes de *Cinchona officinalis* L., en combinación hormonal auxina-citoquinina y de dos citoquininas en forma individual, a los 90 días de evaluación

La formación de órganos nuevos en especies vegetales, como brotes *de novo*, se da a partir de la formación de explantes cultivados *in vitro*, dicho proceso se denomina como organogénesis, la misma que puede realizarse de dos maneras: organogénesis directa y organogénesis indirecta (Abdelnour y Escalant, 1994; Sharry et al., 2015); en la presente investigación se empleó la organogénesis indirecta, la misma que se inició con la formación de callos para posteriormente lograr formación de brotes *de novo*.

En relación a la variable de formación de brotes *de novo*, los tratamientos que emplearon la combinación auxina – citoquinina registraron mayor número promedio de brotes en los tratamientos T0 y T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ KIN) con 0,27 brotes cada uno; datos que son inferiores a los obtenidos por Eras Guamán et al. (2019) quienes en su estudio sobre la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., utilizando la combinación hormonal auxina – citoquinina, registró un número promedio de 0,33 brotes; en cuanto a la longitud de brotes *de novo*, el tratamiento T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ KIN) registró una longitud promedio de 2,23 mm, resultados que son menores a los datos registrados por Chamba (2017) en su investigación sobre brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., utilizando la combinación hormonal auxina – citoquinina obtuvo una longitud de 17,68 mm.

Considerando lo mencionado, es plausible afirmar que la combinación hormonal auxina – citoquinina mostró similitud con el tratamiento testigo, esta semejanza podría deberse en primera instancia, a las propiedades endógenas que posee la especie de brotar (Cuvi, 2009); en segunda instancia, la similitud podría explicarse debido a la interacción de las fitohormonas, ya que inducen a la formación de estructuras callogénicas o de raíces y no brotes, tal como manifiestan Rodríguez et al. (2014) donde el Ácido naftalenacético destacó como regulador de crecimiento que más influyó en la formación de callos o de raíces *de novo* en lugar de formación de brotes.

Por otro lado, en la formación y longitud de brotes *de novo* bajo diferentes concentraciones de dos citoquininas, el tratamiento que registró mayor número y longitud de brotes *de novo*, fue el T2 (2,5 mg L⁻¹ BAP) con un promedio de 0,57 brotes y una longitud de 4,24 mm, datos inferiores a los registrados por Rahim et al. (2013), quienes en su investigación, para determinar el efecto de diferentes concentraciones de NAA y BAP en la micropropagación de *Alstroemeria*, al utilizar BAP en varias concentraciones registraron un número promedio de 1,73 de brotes y una longitud de 3,38 cm.

Esto podría ser atribuido a lo señalado por George et al. (2008), quienes indican que el uso de 6-Bencilaminopurina, sin la combinación con otras fitohormonas o con bajas concentraciones de ANA incrementan la formación de brotes. Coincidiendo con la investigación realizada por Mayerni et al. (2015) sobre la multiplicación de brotes de *Cinchona*, donde se observó que la utilización de BAP contribuye al incremento en la formación de brotes.

7.4. Número y longitud promedio de formación de raíces *de novo* en explantes de *Cinchona officinalis* L

El enraizamiento es uno de los eventos fisiológicos más significativos en el cultivo *in vitro*, ya que desempeña un papel fundamental en el establecimiento *ex situ* de las plantas originadas en el laboratorio (*in vitro*), este acontecimiento se da mediante organogénesis radicular, es decir la formación de raíces adventicias (Prieto et al., 2005; Fiori et al., 2016).

En lo que respecta a la formación y longitud de raíces *de novo* de *C. officinalis*, bajo la combinación hormonal auxina – citoquinina, el tratamiento T1 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ KIN), destacó al registrar el mayor porcentaje con un 87 % de formación de raíces y una longitud promedio de 2,97, datos superiores a los obtenidos por Eras Guamán et al. (2021) en la inducción *in vitro* de raíces de *Cinchona officinalis* L., al emplear la combinación de auxina – citoquinina, donde obtuvieron un porcentaje de formación de raíces del 70 % y una longitud promedio de 1,2 mm.

El significativo porcentaje de formación de raíces mediante la combinación hormonal auxina – citoquinina, supone la acción de la auxina (ANA), ya que Jordán y Casaretto, (2006), mencionan que las auxinas regulan el desarrollo y crecimiento de las raíces *de novo*. Además, Großkinsky y Petrášek (2019) mencionan que se necesita una interacción entre las auxinas y citoquininas en distintos gradientes para mantener un desarrollo adecuado o inducir a la formación de raíces.

Por otra parte, en relación a la formación y longitud de raíces *de novo* de *C. officinalis* con diferentes concentraciones de dos citoquininas, el tratamiento T5 (2,5 mg L⁻¹ KIN) destacó al registrar el mayor porcentaje con el 93 % de formación de raíces *de novo*; así mismo, la mayor longitud promedio con 2,78 mm, datos que son superiores a los obtenidos por Ramon (2023) quién en su investigación, el porcentaje de formación de raíces registró un 50,94 % y una longitud de raíces *de novo* registró 0,16 mm.

Las concentraciones de dos citoquininas mostraron significancia estadística, esto podría atribuirse a la procedencia del material vegetal utilizado, ya que los las formaciones callogénicas fueron sub cultivadas en un medio de cultivo MS-1962, suplementado con la auxina 2-4 D, lo que habría influido como excedente o habría almacenado reservas en el material vegetal influyendo en la obtención de un alto porcentaje de enraizamiento (Balakrishnan et al., 2009), lo que es corroborado por Bishopp et al. (2011) quienes indican

que, la interacción entre las auxinas y citoquininas son determinantes en el desarrollo vascular de los tejidos inoculados *in vitro*.

8. Conclusiones

La similitud observada entre la combinación hormonal auxina – citoquinina y el tratamiento testigo sugiere posibles propiedades endógenas que influyen en la capacidad de brotación de la especie. Sin embargo, la interacción compleja de las fitohormonas induce a la formación de raíces, ya que se pudo evidenciar que en todos los tratamientos superaron el 50 % de formación de raíces *de novo* en *Cinchona officinalis* L8

El tratamiento T2 (2,5 mg L⁻¹ BAP) demostró ser el más eficaz en términos de número y longitud de brotes *de novo*, resaltando la crucial importancia de la concentración específica de BAP para lograr una formación exitosa de brotes en *Cinchona officinalis* L.

El porcentaje de contaminación de los explantes para todos los tratamientos fueron bajos (≥ 20 %), lo cual se atribuye al uso del material vegetal procedente de vitroplantas cultivadas en condiciones asépticas; sin embargo, se identificó la presencia de bacterias y hongos endógenos al material vegetal.

9. Recomendaciones

Para evitar o disminuir la oxidación fenólica en los explantes de *Cinchona officinalis* L., es recomendable utilizar material vegetal joven o vitroplantas y tratar de limitar las incisiones o cortes en los mismos, ya que esto está directamente relacionado con la producción de fenoles en los explantes.

Para incrementar el número brotes *de novo* en las estructuras callogénicas, utilizar el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962) y ensayar concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) de forma individual, en concentraciones superiores a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, ya que a partir de esta concentración se registró el mayor número promedio de formaciones de brotes *de novo*.

Para la formación de raíces *de novo*, a partir de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., utilizar el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS-1962) y añadir la combinación hormonal auxina – citoquinina, donde la concentración de auxina (ANA) sea inferior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ pudiendo ser de 0,4; 0,3 o $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que las concentraciones de citoquinina (KIN), pueden variar en concentraciones mayores a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

10. Bibliografía

- Abdelnour, A., y Escalant, J. (1994). Conceptos Basicos del cultivo de tejidos vegetales. *CATIE*, 12(45), 653–673. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/888>
- Acosta, M. (1946). *Cinchonas del Ecuador*. Editorial del Ecuador, Quito. https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/52/65/83/8a/5265838a-e64e-47d6-8985-84c4bf7bfb6e/files/ACO_Cinch_Ecuador.pdf
- Aguirre, Z., Aguirre, N., y Muñoz, J. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 523–542. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24206>
- Alcantara, J., Acero, J., Alcántara, J., y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129.
- Álvarez, P. (2016). Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Chinchona* spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja. In *Utpl*. [Tesis de grado, Universidad Técnica Particular de Loja]. http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/16098/1/Ochoa_Salinas_Kruscaya_Betza_beth.pdf
- Arévalo, Y., y Loján, P. (2023). Identificación morfológica de hongos micorrízicos arbusculares en poblaciones nativas de *Cinchona officinalis* en la provincia de Loja, Ecuador. *Cedamaz*, 13(2), 148–157. <https://doi.org/10.54753/cedamaz.v13i2.1849>
- Armijos, R., Espinosa, L., y Cueva, A. (2021). Indirect Shoot Regeneration Using 2,4-D Induces Somaclonal Variations in *Cinchona Officinalis*. *Floresta e Ambiente*, 28(3), 1–8. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0017>
- Avenza, Á. (2018). *Preparación del medio de cultivo*. Universidad de Lleida.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y obcurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Balakrishnan, V., Ram, M., Ravindran, K., y Philip, J. (2009). Clonal Propagation of *Morus alba* L. Through Nodal and Axillary Bud Explants. *Bot. Res. Int.*, 2(1), 42–49. <https://www.researchgate.net/publication/288811864%0AClonal>
- Bazán, F. (2021). Importancia del árbol de la Quina. *Instituto Nacional de Innovación Agraria*. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/1509>
- Bishopp, A., Benková, E., y Helariutta, Y. (2011). Sending mixed messages: Auxin-cytokinin

- crosstalk in roots. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(1), 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.014>
- Borjas, R., Julca, A., y Alvarado, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150–164.
<https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200150>
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*. Abya-Yala/UPS.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6788>
- Buitrón, X. (1999). *Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación*. TRAFFIC International.
<https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/Traf-061.pdf>
- Camacho, J. (2023). *Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de Cinchona officinalis L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad*. [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Campos, J. (2016). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. *Revista Científica Pakamuros*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.37787/5f2he718>
- Caraguay, K. A., Eras, V. H., Gonzalez, D., Moreno, J., Minchala, J., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2016). Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la provincia de Loja – Ecuador. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 18(3), 271–280.
<https://doi.org/10.18271/ria.2016.216>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA.
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Chamba, L. (2017). *Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de Cinchona officinalis L., a partir de vitroplantas, en la Argelia-Loja*. [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Cruz, M. (2008). Factores que influyen en el desarrollo: el fotoperíodo. *Revista Agropecuaria y Ganadera*, 2, 920–922.
- Cueva, A., Vélez, D., Arias, D., Curto, M., Meimberg, H., y Brinegar, C. (2019). Genetic characterization of fragmented populations of *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae), a

- threatened tree of the northern Andean cloud forests. *Tree Genetics and Genomes*, 15(6). <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1393-y>
- Cuvi, N. (2009). *Ciencia e imperialismo en América Latina: la Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas (1940-1945)* [Tesis Doctorals, Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/5182?locale-attribute=es#page=7>
- Díaz, M., Rodas, J., Gonzalez, L., y Ortiz, M. (2021). Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones *in vitro*. *Cedamaz*, 11(1), 1–5. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1029>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eras Guamán, V. H., Moreno, J., Méndez, K., Yaguana, M., y Poma, R. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 20–28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/682>
- Eras Guamán, V. H., Moreno Serrano, J. A., Yaguana Arévalo, M., Poma Angamarca, R. A., y Cueva Coronel, C. M. (2021). Inducción *in vitro* de raíces de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas. *Bosques Latitud Cero*, 11(2), 43–52. <https://doi.org/10.54753/blc.v11i2.1006>
- Espanet, A. (2015). *Tratado metódico y práctico de materia médica y de terapéutica fundado en la ley de los semejantes*. <https://es.scribd.com/document/374604015/Tratado-Metodico-y-Practico-de-Materia-MEDica-y-de-TerapEutica-Fundado-en-La-Ley-de-Los-Semejantes-Por-A>
- Espinosa, C., y Ríos, G. (2014). Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* *in vitro* y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1,2), 73–82. <https://doi.org/10.26807/remcb.v35i1-2.250>
- Fiori, C., Díaz, M., y González, L. (2016). Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *acromia aculeata* (Jacq.) lodd ex mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67–78. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.1.a05>

- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, 3(4), 1–17. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263>
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp.): distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. Universidad Complutense de Madrid. https://books.google.com/books/about/El_árbol_de_la_quina_Cinchona_spp.html?hl=es&id=lnMgPQAACAAJ
- George, E., Hall, M., y Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Vol. 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Großkinsky, D., y Petrášek, J. (2019). Auxins and cytokinins – the dynamic duo of growth-regulating phytohormones heading for new shores. *New Phytologist*, 221(3), 1187–1190. <https://doi.org/10.1111/nph.15556>
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., y Su, Z. H. (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Hay, C., Anderson, L., Roberts, M., y Phillipson, J. (1986). *In vitro* cultures of *Cinchona* species. *Plant Cell Reports*, 5(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF00269704>
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58–69. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&tlng=es.
- Iglesias, L., Prieto, J., y Alarcón, E. (1996). La propagación vegetativa de plantas forestales. *Ciencia Forestal En México*, 21(79), 15–41. <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/forestales/article/view/998>
- Jiménez, F., y Agramonte, D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Bioteología Vegetal*, 13(1), 3–21.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*, 15, 1–28.
- Jorgensen, P., y Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden Press*, 1182.

- Kessel, A. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, yba vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*, 29(3), 27–37.
- Larreátegui, D. (2011). *Historia del árbol de la quina en el Ecuador*. <https://es.scribd.com/doc/69693417/HISTORIA-DE-LA-QUINA>
- Lima, N. R., Moreno, J. A., Eras, V. H., Minchala, J., González, D., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169–178. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5645611>
- Litz, E. y Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. In: Embriogénesis. T. A. Thorpe ed. *in vitro* Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203.
- Madsen JE. 2002. Historia cultural de la cascarilla de Loja. En: Aguirre Z, Madsen JE, Cotton E, Balslev H (eds.) Botánica Austroecuatorial: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe: 385–399. Ediciones Abya-Yala, Quito.
- Martínez, L, y Gago, J. (2008). Micropropagación vegetal. *Rebigo*, 3, 60–53. http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo_2008_07.pdf
- Martínez, Lucy, Yépez, Á., Gavilánez, T., Gómez, R., Guerrero, M., Hidalgo, D., Barba, A., y Ortíz, B. (2018). Estructura y composición de la flora y fauna en la parroquia Sangay, Morona Santiago, Ecuador: implicaciones ambientales. *Biotechnia*, 20(3), 5–16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971088001>
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., y Gutiérrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 9(1), 17–34. <https://www.redalyc.org/pdf/629/62990103.pdf>
- Mayerni, R., Pratiwi, E. E., y Warnita. (2015). Shoot multiplication of quinine plant (*Cinchona ledgeriana* Moens) with several concentrations of kinetin on *in vitro*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 5(2), 57–61. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.5.2.479>
- Mazid, M., Ahmed, T., y Firoz, M. (2011). Cytokinins, a classical multifaceted hormone in plant system. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(4), 347–368.
- Miranda, M., y Quiroz, A. (2013). Efecto del fotoperiodo en la remoción de plomo por Lemna

- gibba L. (Lemnaceae). *Polibotánica*, 36, 147–161.
- Moreno, J., Pérez, C., Moreno, I., y Moreno, J. (2019). Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 51(1), 55–68.
- Muñoz, N. (2021). *Cinchona officinalis en la homeopatía y la fitoterapia: una investigación historiográfica* [Tesis Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/81121/35415960.2021.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Osuna, H., Osuna, A., y Fierro, A. (2016). Manual de propagación de plantas superiores. *Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco*, 91.
- Páez, T., Romero, P., y Reyes, C. (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. *Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMOP-Q*.
- Perea, M., González, T., Campos, H., Guillot, G., y Cogua, J. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez, M., Delgado, M., Hernández, C., y Armas, R. (2008). Organogénesis Indirecta a Partir De Meristemas Apicales Caulinares De La Variedad Cubana De Arroz Reforma. *Cultivos Tropicales*, 29(1), 23–28.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pinto, Y., Álvaro, E., y Álvarez, J. (2012). Aplicación de ácido alfa-naftalen acético en colinos de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(2), 213–224. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/388>
- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, P., Cordeiro, M., y Durzan, D. (2005). *Bioteología Vegetal*. INIA.
- Rahim, S., Kaviani, B., y Dehkaei, N. (2013). The effect of different concentrations of NAA

- and BAP on micropropagation of *Alstroemeria*. *Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology*, 3(5), 133–136.
- Ramon, S. (2023). *Proceso morfogénico para la inducción de estructuras de novo, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de Cinchona officinalis L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad*. [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Randel, M., Chong, B., y Pérez, N. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. *Biotecnología Vegetal*, 15(4), 195–206.
- Reed, B., y Tanprasert, P. (1995). Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1(3), 137–142.
- Reyes, J. (2015). Guía de técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas. *Vivero Agroforestal Loma Grande*, 64. <https://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2016/05/Guía-de-técnicas-métodos-y-procedimientos-de-reproducción-asexual-o-vegetativa-de-las-plantas.pdf>
- Roca, W., y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf
- Rodríguez, L., y Moreno, P. (2010). Factores y mecanismos relacionados con la dormancia en tubérculos de papa. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 189–197. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n2/v28n2a08.pdf>
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, F., y Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111–118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Rueda, J. (2020). *Procesos biotecnológicos para la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de Cinchona officinalis L., de relictos boscosos de la provincia de Loja*. [Tesis de grado, Universidad Nacional De Loja].
- Sánchez, M., y Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología*, 3(4), 1–17.

- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (1a ed.).
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. *Fondo Editorial, Universidad de Cordoba.*, 116.
- Tapia, J. (2013). *Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de Quina (Cinchona officinalis) en el cantón Loja. Jorge* [Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2482/1/106776.pdf>
- Villar, M., Marcelo, F., y Baselly, J. (2018). Evaluación de la regeneración natural de la *Cinchona officinalis* L. en la Zona de Amortiguamiento del Bosque de Protección de Pagaibamba- II Etapa. *INIA*, 1–9.
- Zevallos, P. (1989). Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Cinchona* en el Perú. *Centro de Datos Para La Conservación*, 7, 1–76.

11. Anexos

Anexo 1. Poster científico de los resultados preliminares, para la difusión a los actores interesados que asistieron a la casa abierta organizada por la Carrera de Ingeniería Forestal, de la UNL.



Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas

Correa Jaramillo Jimmy ^{1*}, Eras Guamán Víctor Hugo ^{1,2}, Yaguana Arévalo Magaly ^{1,2}, González Zaruma Darlin Ulises ^{1,2}
¹Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
²Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Proyecto de investigación Cinchona 02-DI-FARNR-2021
 *Autor para correspondencia: jimmy.v.correa@unl.edu.ec

INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., es una especie nativa de Loja (Garmendia, 2005), que entre los siglos XVIII y XIX tuvo una sobreexplotación excesiva para la obtención de la quinina. En la actualidad, dada la fragmentación de las poblaciones naturales y las bajas tasas de propagación natural y por las técnicas convencionales, han provocado que la especie se encuentre amenazada (García-Zárate et al., 2022).

En este contexto, la biotecnología constituye una técnica alternativa para la propagación de las especies forestales, mediante el uso de las técnicas de multiplicación por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Martínez et al., 2003), en donde las fitohormonas, como las auxinas y las citoquininas, intervienen en los procesos de regulación del crecimiento, diferenciación celular, respuesta al estrés y la formación de estructuras *de novo* (Leysler, 2010; Kieber y Schaller, 2014).

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas, en condiciones de fotoperiodo.
- Determinar el efecto de las citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, para la diferenciación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas.

METODOLOGÍA



Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina.

| TRATAMIENTOS | REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg L ⁻¹) | |
|--------------|--|----------|
| | ANA | KINETINA |
| T0 | 0,0 | 0,0 |
| T1 | 0,5 | 1,5 |
| T2 | 0,5 | 2,5 |
| T3 | 0,5 | 3,5 |

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto de las concentraciones de dos citoquininas.

| TRATAMIENTOS | REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg L ⁻¹) | |
|--------------|--|----------|
| | BAP | KINETINA |
| T0 | 0,0 | 0,0 |
| T1 | 1,5 | |
| T2 | 2,5 | |
| T3 | 3,5 | |
| T4 | | 1,5 |
| T5 | | 2,5 |
| T6 | | 3,5 |

RESULTADOS

Formación de estructuras organogénicas *de novo*, bajo la combinación hormonal auxina – citoquinina



Figura 2. A) Número promedio de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L. B) Brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, en la combinación hormonal auxina-citoquinina.

Formación de estructuras organogénicas *de novo*, bajo la combinación hormonal auxina-citoquinina



Figura 3. A) Porcentaje promedio de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L. B) Raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, en la combinación hormonal auxina-citoquinina.

Formación de estructuras organogénicas *de novo*, bajo la concentración hormonal de dos citoquininas.



Figura 4. A) Número promedio de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L. B) Brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, bajo la concentración hormonal de dos citoquininas.



Figura 5. A) Porcentaje promedio de raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L. B) Raíces *de novo* de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación, bajo la concentración hormonal de dos citoquininas.

CONCLUSIONES

- El tratamiento T2 (2,5 mg L⁻¹ de BAP) registró el mejor resultado en la formación de brotes *de novo*, con un número promedio de 0,65 en condiciones de fotoperiodo (16/8).
- El tratamiento T5 (2,5 mg L⁻¹ de KIN) registró el mejor resultado en la formación de raíces *de novo*, con un porcentaje promedio de 93 %, en condiciones de fotoperiodo (16/8).

BIBLIOGRAFÍA

García-Zárate, D., Marcelo-Bazán, F. E., y Dávila-Estela, L. (2022). Identificación y selección de árboles semilleros de *Cinchona officinalis* L. ("Quina") en el distrito de Queroocoto, Chota - Cajamarca. *Revista Forestal Del Perú*, 37(1), 67-77. <https://doi.org/10.21704/rfp.v37i1.1594>

Garmendia, A. (2005). El árbol de la quinina (*Cinchona* spp). Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja, 185 p.

Kieber, J., y Schaller, E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12(12), e0168. Leysler, O. (2010). The power of auxin in plants. *Plant Physiology*, 154(2), 501-505.

Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., y Gutiérrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chagüingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 9(1), 17-34. <https://www.redalyc.org/pdf/629/62990103.pdf>

Sedjo, R. (2001). Biotechnology in forestry: considering the costs and benefits. *Resources*, 145, 10-12.



ACREDITAMOS
Juntos lo logramos

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Educamos para Transformar

Anexo 2. Datos obtenidos en la formación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de la combinación hormonal auxina – citoquinina en fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad), a los 90 días de evaluación.

| Fecha de siembra: 15 de marzo del 2023 | | | | | | |
|--|-------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Fecha de la última evaluación: 13 de junio del 2023 | | | | | | |
| Tratamiento | Repetición | Contaminación (%) | Explantes fenolizados (%) | N° de brotes (Promedio) | Longitud de brotes (mm) | Longitud de raíces (%) |
| T0 | 1 | 40 | 0 | 0,30 | 1,85 | 2,08 |
| | 2 | 20 | 0 | 0,40 | 1,60 | 1,73 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,10 | 0,50 | 1,58 |
| | Total | 20 | 0 | 0,27 | 1,32 | 1,79 |
| T1 | 1 | 0 | 0 | 0,10 | 1,70 | 3,43 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,10 | 0,70 | 2,15 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,40 | 0,30 | 3,33 |
| | Total | 0 | 0 | 0,20 | 0,90 | 2,97 |
| T2 | 1 | 20 | 0 | 0,20 | 2,10 | 2,10 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,50 | 2,70 | 3,08 |
| | 3 | 20 | 0 | 0,10 | 1,90 | 1,10 |
| | Total | 13 | 0 | 0,27 | 2,23 | 2,09 |
| T3 | 1 | 0 | 0 | 0,10 | 1,20 | 1,98 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,50 | 2,17 | 2,28 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 1,20 |
| | Total | 0 | 0 | 0,20 | 1,12 | 1,82 |

Anexo 3. Datos obtenidos en la formación de estructuras organogénicas *de novo* en *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto de diferentes concentraciones hormonales de dos citoquininas en fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad), a los 90 días de evaluación.

| Fecha de siembra: 15 de marzo del 2023 | | | | | | |
|--|-------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Fecha de la última evaluación: 13 de junio del 2023 | | | | | | |
| Tratamiento | Repetición | Contaminación (%) | Explantes fenolizados (%) | N° de brotes (Promedio) | Longitud de brotes (mm) | Longitud de raíces (%) |
| T0 | 1 | 0 | 0 | 0,40 | 1,73 | 1,85 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,60 | 3,20 | 0,70 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,30 | 1,90 | 3,70 |
| | Total | 0 | 0 | 0,43 | 2,28 | 2,08 |
| T1 | 1 | 0 | 0 | 0,20 | 1,00 | 1,10 |
| | 2 | 30 | 0 | 0,40 | 1,23 | 1,40 |
| | 3 | 10 | 0 | 0,00 | 0,00 | 3,38 |
| | Total | 13 | 0 | 0,20 | 0,74 | 1,96 |
| T2 | 1 | 20 | 0 | 0,10 | 0,40 | 1,40 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,60 | 4,40 | 2,25 |
| | 3 | 20 | 0 | 1,00 | 6,23 | 2,73 |
| | Total | 13 | 0 | 0,57 | 3,68 | 2,13 |
| T3 | 1 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,68 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,50 | 3,10 | 0,90 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,90 | 5,63 | 2,70 |
| | Total | 0 | 0 | 0,47 | 2,91 | 1,43 |
| T4 | 1 | 0 | 0 | 0,30 | 1,45 | 1,03 |
| | 2 | 0 | 0 | 0,70 | 2,15 | 3,45 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,10 | 0,90 | 2,93 |
| | Total | 0 | 0 | 0,37 | 1,50 | 2,47 |
| T5 | 1 | 0 | 0 | 0,10 | 1,40 | 2,15 |
| | 2 | 20 | 0 | 0,30 | 1,80 | 3,10 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,30 | 4,20 | 3,10 |
| | Total | 7 | 0 | 0,23 | 2,47 | 2,78 |
| T6 | 1 | 0 | 0 | 0,20 | 2,50 | 2,50 |
| | 2 | 20 | 0 | 0,10 | 1,20 | 1,45 |
| | 3 | 0 | 0 | 0,30 | 2,20 | 2,95 |
| | Total | 7 | 0 | 0,20 | 1,97 | 2,30 |

Anexo 4. Visita del Director del Trabajo de Integración Curricular (TIC), Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, a los ensayos instalados en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la UNL.





unl

Universidad
Nacional
de Loja



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL
Laboratorio de Micropropagación Vegetal
Proyecto de investigación Cinchona

MANUAL TÉCNICO:
“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA DETERMINAR EL EFECTO
DE LAS AUXINAS Y CITOQUININAS, EN LA INDUCCIÓN DE
ESTRUCTURAS ORGANOGÉNICAS DE *Cinchona officinalis* L., A
PARTIR DE FORMACIONES CALLOGÉNICAS”



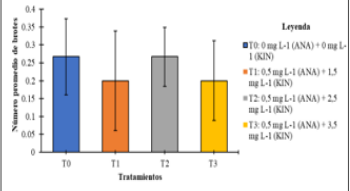
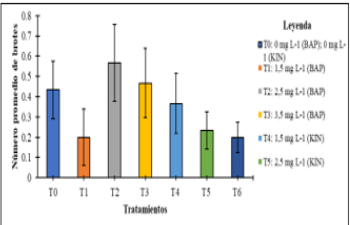


RESPONSABLES:

Jimmy Vicente Correa Jaramillo
Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc

LOJA – ECUADOR

2024

Anexo 6. Tríptico para la difusión de los resultados a los actores sociales interesados.

| | | |
|---|---|--|
| <p>1. Formaciones brotes de novo en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en combinación hormonal auxina-citoquinina, en fotoperiodo, a los 90 días de evaluación</p>  <p>Figura 1. Número promedio de brotes de novo de <i>Cinchona officinalis</i> L., en dos concentraciones de ANA y cuatro de KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.</p> <p>2. Formaciones de brotes de novo en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración hormonal de dos citoquininas</p>  <p>Figura 2. Número promedio de brotes de novo de <i>Cinchona officinalis</i> L., en cuatro concentraciones de BAP y KIN, en fotoperiodo (16/8), a los 90 días de evaluación.</p> | <p style="text-align: center;">CONCLUSIONES</p> <ul style="list-style-type: none"> La formación de brotes de novo, a partir de estructuras calogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo la concentración de la citoquinina BAP con 2,5 de mg L-1 registró el mayor número promedio de formaciones de brotes de novo, con un promedio de 0,57, en tanto que, en los tratamientos que se utilizó la combinación de auxinas – citoquininas la formación de brotes de novo fue menor (0,27). La formación de raíces de novo, a partir de estructuras calogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L., registró un alto porcentaje de formación el mismo que superó el 50 % en todos los tratamientos, siendo las diferentes concentraciones de dos citoquinas en el tratamiento T5 (2,5 de mg L-1 BAP) que con el 93 % de formación de raíces de novo registró el porcentaje más alto, a diferencia a la combinación de auxina - citoquinina el tratamiento T1 (0,5 mg L-1 ANA+ 1,5 de mg L-1 KIN) con un 87 %, registró menor porcentaje de formación de raíces de novo. | <div style="text-align: center;">  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</p> <p>FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES</p> <p>CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL</p> <p>Laboratorio de Micropropagación Vegetal</p> <p>Proyecto de Investigación Cinchona</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p style="text-align: center;">PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOQUININAS, EN LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS ORGANOGÉNICAS DE <i>Cinchona officinalis</i> L., A PARTIR DE FORMACIONES CALOGÉNICAS</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>AUTOR: Jimmy Vicente Correa Jaramillo</p> <p>DIRECTOR: Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc</p> <p>LOJA – ECUADOR</p> <p>2024</p> </div> |
|---|---|--|

INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., es una especie nativa, de la región sur del Ecuador y representa el origen histórico del árbol de la vida o la planta salvadora de la humanidad; las poblaciones naturales de *C. officinalis* están amenazadas por varios factores antrópicos y naturales.

En este contexto, la biotecnología brinda nuevas herramientas que mejoran las técnicas convencionales de la propagación de especies forestales y el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales, con fines de conservación y mejoramiento de los recursos genéticos

Objetivo general:

Contribuir a la generación de información científica, relacionada con la influencia de las auxinas y citoquininas, para la inducción de estructuras organogénicas de novo en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina, para la diferenciación de estructuras organogénicas de novo en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.
- Determinar el efecto de las citoquininas, en condiciones de fotoperiodo, para la diferenciación de estructuras organogénicas de

novo en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas.

- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

METODOLOGÍA

1. Área de estudio

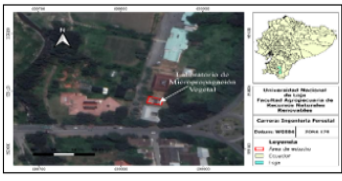


Figura 1. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UNL.

2. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina – citoquinina y de dos citoquininas, en la diferenciación de estructuras organogénicas de novo en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.

2.1. El material vegetal empleado fue en base de callos de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de cultivos preestablecidos, se sub cultivaron por un periodo de 30 días, en el medio de cultivo (MS-1962) suplementado con 3 mg L-1 de 2-4 D + 0,5 mg L-1 de BAP.

2.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo basal con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS-1962); suplementado con las vitaminas: tiamina 1,0 mg L⁻¹ y mio-inositol 100 mg L⁻¹; sacarosa 2 % y agar 0,6 %; las combinaciones auxina – citoquinina fueron el ANA y KIN en tres niveles (0,0; 0,5+1,5; 0,5+2,5; 0,5+3,5) y las concentraciones de dos citoquininas individualmente fueron BAP (0,0; 0,1,5; 2,5; 3,5) y KIN (0,0; 0,1,5; 2,5; 3,5).

2.3. Inoculación e incubación de explantes

En la cámara de flujo laminar, los callos se inocularon dos explantes en cada frasco de vidrio y se colocaron en el cuarto de incubación, bajo las condiciones de fotoperiodo, durante el periodo de evaluación de 90 días evaluación.

2.4. Variables evaluadas

Se evaluó el número de explantes contaminados, fenolizados, el número de formaciones brotes, raíces de novo y el número de días a la formación brotes, raíces de novo.

RESULTADOS

3. **Resultados para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina – citoquinina y de dos citoquininas, en la diferenciación de estructuras organogénicas de novo en *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones calogénicas, en condiciones de fotoperiodo.**

Anexo 7. Análisis de significancia del número de explantes contaminados de *Cinchona officinalis* L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas.

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | | A |
|--------------------------|--------------|----|--------|------|----------|------|--------|---|
| Variable | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | |
| Explantes contaminados | T0 | 30 | 0.20 | 0.41 | 0.00 | 2.68 | 0.0085 | |
| Explantes contaminados | T1 | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T2 | 30 | 0.13 | 0.35 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T3 | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | |

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | | B |
|--------------------------|-------------|----|--------|------|----------|------|--------|---|
| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | |
| Explantes contaminados | T0 | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.93 | 0.0628 | |
| Explantes contaminados | T1 | 30 | 0.13 | 0.35 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T2 | 30 | 0.13 | 0.35 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T3 | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T4 | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T5 | 30 | 0.07 | 0.25 | 0.00 | | | |
| Explantes contaminados | T6 | 30 | 0.07 | 0.25 | 0.00 | | | |

Anexo 8. Análisis de significancia del número de brotes de *Cinchona officinalis* L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas.

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | | A |
|--------------------------|--------------|----|--------|------|----------|------|--------|---|
| Variable | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | |
| Número de brotes de novo | T0 | 30 | 0.27 | 0.58 | 0.00 | 1.29 | 0.3986 | |
| Número de brotes de novo | T1 | 30 | 0.20 | 0.76 | 0.00 | | | |
| Número de brotes de novo | T2 | 30 | 0.27 | 0.45 | 0.00 | | | |
| Número de brotes de novo | T3 | 30 | 0.20 | 0.61 | 0.00 | | | |

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | | B |
|--------------------------|-------------|----|--------|------|----------|------|--------|---|
| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | |
| Nº de brotes | T0 | 30 | 0.43 | 0.77 | 0.00 | 2.64 | 0.5362 | |
| Nº de brotes | T1 | 30 | 0.20 | 0.76 | 0.00 | | | |
| Nº de brotes | T2 | 30 | 0.57 | 1.04 | 0.00 | | | |
| Nº de brotes | T3 | 30 | 0.47 | 0.94 | 0.00 | | | |
| Nº de brotes | T4 | 30 | 0.37 | 0.81 | 0.00 | | | |
| Nº de brotes | T5 | 30 | 0.23 | 0.50 | 0.00 | | | |
| Nº de brotes | T6 | 30 | 0.20 | 0.41 | 0.00 | | | |

Anexo 9. Análisis de significancia del número de raíces de *Cinchona officinalis* L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas.

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | |
|--------------------------|--------------|----|--------|------|----------|------|--------|
| Variable | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| N de raíces | T0 | 30 | 1.23 | 1.36 | 1.00 | 3.27 | 0.3235 |
| N de raíces | T1 | 30 | 1.80 | 1.30 | 2.00 | | |
| N de raíces | T2 | 30 | 1.50 | 1.28 | 1.00 | | |
| N de raíces | T3 | 30 | 1.40 | 1.22 | 1.00 | | |

A

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|----|--------|------|----------|-------|--------|
| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| Número de raíces | T0 | 30 | 1.73 | 1.48 | 2.00 | 14.25 | 0.0169 |
| Número de raíces | T1 | 30 | 0.93 | 1.01 | 1.00 | | |
| Número de raíces | T2 | 30 | 0.87 | 0.63 | 1.00 | | |
| Número de raíces | T3 | 30 | 1.13 | 1.11 | 1.00 | | |
| Número de raíces | T4 | 30 | 1.43 | 1.04 | 1.50 | | |
| Número de raíces | T5 | 30 | 1.80 | 1.27 | 1.50 | | |
| Número de raíces | T6 | 30 | 1.30 | 1.02 | 1.00 | | |

B

Anexo 10. Análisis de significancia de la longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas.

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | |
|--------------------------|--------------|----|--------|------|----------|------|--------|
| Variable | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| Longitud de brotes | T0 | 30 | 1.32 | 2.90 | 0.00 | 1.35 | 0.3781 |
| Longitud de brotes | T1 | 30 | 0.90 | 3.34 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T2 | 30 | 2.23 | 5.13 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T3 | 30 | 1.12 | 3.09 | 0.00 | | |

A

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|----|--------|------|----------|------|--------|
| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| Longitud de brotes | T0 | 30 | 2.28 | 3.98 | 0.00 | 2.45 | 0.5744 |
| Longitud de brotes | T1 | 30 | 0.74 | 2.58 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T2 | 30 | 3.68 | 6.69 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T3 | 30 | 2.91 | 5.44 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T4 | 30 | 1.34 | 2.79 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T5 | 30 | 2.73 | 5.92 | 0.00 | | |
| Longitud de brotes | T6 | 30 | 1.97 | 4.21 | 0.00 | | |

B

Anexo 11. Análisis de significancia de la longitud de raíces de *Cinchona officinalis* L: A) Combinación hormonal auxina - citoquinina; B) Diferentes concentraciones de dos citoquininas.

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | A |
|--------------------------|--------------|----|--------|------|----------|------|--------|
| Variable | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| Longitud de raíces | T0 | 30 | 1.79 | 2.11 | 1.88 | 3.19 | 0.3534 |
| Longitud de raíces | T1 | 30 | 2.97 | 2.96 | 2.00 | | |
| Longitud de raíces | T2 | 30 | 2.09 | 1.61 | 2.50 | | |
| Longitud de raíces | T3 | 30 | 1.82 | 1.47 | 1.75 | | |

| Prueba de Kruskal Wallis | | | | | | | B |
|--------------------------|-------------|----|--------|------|----------|-------|--------|
| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
| Longitud de raíces | T0 | 30 | 2.08 | 1.87 | 2.25 | 13.46 | 0.0315 |
| Longitud de raíces | T1 | 30 | 1.96 | 3.28 | 1.25 | | |
| Longitud de raíces | T2 | 30 | 2.13 | 1.91 | 2.25 | | |
| Longitud de raíces | T3 | 30 | 1.43 | 2.15 | 0.75 | | |
| Longitud de raíces | T4 | 30 | 2.47 | 2.99 | 1.50 | | |
| Longitud de raíces | T5 | 30 | 2.78 | 2.49 | 2.25 | | |
| Longitud de raíces | T6 | 30 | 2.30 | 1.88 | 2.00 | | |

Anexo 12. Certificación de la traducción del Abstrac



Mg. Yanina Quizhpe Espinoza
Licenciada en Ciencias de Educación mención Inglés
Magister en Traducción y mediación cultural

Celular: 0989805087
Email: yaniges@icloud.com
Loja, Ecuador 110104

Loja, 22 de febrero de 2024

Yo, Lic. Yanina Quizhpe Espinoza, con cédula de identidad 1104337553, docente del Instituto de Idiomas de la Universidad Nacional de Loja, y certificada como traductora e interprete en la Senescyt y en el Ministerio de trabajo del Ecuador con registro **MDT-3104-CCL-252640**, certifico:

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del resumen del Trabajo de Integración Curricular titulado **Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de formaciones callogénicas**, cuya autoría del estudiante Jimmy Vicente Correa Jaramillo, con cédula 1150272324 es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente

Firmado digitalmente por YANINA BELEN QUIZHPE ESPINOZA
Fecha: 2024.02.22 10:47:33 -05'00'

Mg. Yanina Quizhpe Espinoza.

Traductora freelance

Full text translator: servicios de traducción