



1859

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE BROTACIÓN
Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE
Cinchona officinalis L., PROVENIENTE DE RELICTOS
BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

**Tesis previa a la obtención del
Título de Ingeniera Forestal**

AUTORA: Daniela Katherine Paredes Jiménez.

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

LOJA - ECUADOR

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL**

CERTIFICACIÓN

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

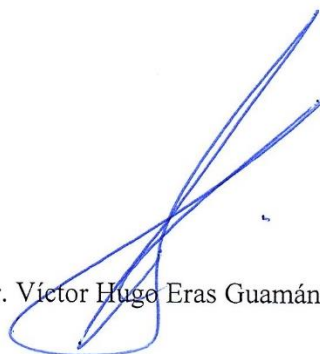
DIRECTOR DE TESIS

En mi condición de director de tesis certificó que la señorita **Daniela Katherine Paredes Jiménez**, egresada de la carrera de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de Loja, ha desarrollado el proyecto de tesis titulada: **“BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE BROTAÇÃO Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, el mismo que ha sido debidamente revisado y corregido cumpliendo con todas las normas reglamentarias vigentes y dentro del cronograma establecido.

Por tal razón, autorizo su presentación para que continúe con el proceso que corresponda.

Loja, 29 de agosto del 2018.

Atentamente,



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

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

En calidad de presidenta del Tribunal de Calificación de la Tesis titulada: “**BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE BROTAÇÃO Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA**”, de autoría de la señorita Daniela Katherine Paredes Jiménez portadora de la cedula N ° 1105827636, egresada de la Carrera de Ing. Forestal, se informa que la misma ha sido revisada he incorporadas todas las observaciones realizadas por los miembros del Tribunal Calificador.

En tal virtud, nos permitíos certificar que el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requerimientos de la Carrera de Ingeniería Forestal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto se autoriza continuar con los trámites correspondientes para la entrega de la versión final de la tesis para su sustentación.

Loja, 16 de enero del 2019.

Atentamente,



Ing. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo, Mg. Sc

PRESIDENTA



Ing. Nohemí del Carmen Jumbo Benítez, Mg. Sc

VOCAL



Ing. Alexandra del Cisne Jiménez Torres, Mg. Sc

VOCAL

AUTORIA

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

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

Autora: Daniela Katherine Paredes Jiménez

Firma: 

Número de cédula: 1105827636

Fecha: 17 de enero del 2019

CARTA DE AUTORIZACIÓN

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

Yo, Daniela Katherine Paredes Jiménez, declaro se autora de la tesis titulada “**BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE BROTAÇÃO Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA**”, como requisito para optar al grado de: INGENIERA FORESTAL, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 17 días del mes de enero del 2019, firma la autora.

Firma: _____



Autor: Daniela Katherine Paredes Jiménez

Número de Cédula: 1105827636

Dirección: Loja, La Argelia.

Correo electrónico: danikathe1993@gmail.com

Celular: 0979973518

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de Grado:

PRESIDENTE: Ing. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo, Mg. Sc

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

VOCAL: Ing. Alexandra del Cisne Jiménez Torres, Mg. Sc

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar con una etapa más en mi vida, con gratas experiencias que me han hecho crecer como estudiante y persona, a la Universidad Nacional de Loja a través de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Carrera de Ingeniería Forestal y a los docentes que inculcaron y brindaron sus conocimientos éticos y morales para ser una gran profesional.

Al Ingeniero Forestal Víctor Hugo Eras Guamán, Director de Tesis, por permitirme formar parte de su equipo y proyecto de trabajo, quien ha brindado, guiado y orientando con responsabilidad el presente trabajo de investigación.

Gracias de igual manera a al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal a la Ing. Julia Michala en especial a la Ing. Agro. Magaly Yaguana e Ing. Ruth Poma por apoyarme incondicionalmente a la distancia, por su dedicación, apoyo y tiempo para cumplir esta meta.

Así mismo, agradezco a los miembros del Tribunal Calificador Ing. Paulina Fernández, Ing. Nohemí Jumbo e Ing. Alexandra Jiménez quienes contribuyeron con el asesoramiento correspondiente brindando sus nobles y valiosas sugerencias para perfeccionar el presente trabajo de investigación.

Finalmente, doy gracias a mis padres, hermanos y fieles amigos que me han acompañado en este largo camino, por confiar siempre en mí y ser los principales motores para alcanzar mis sueños y anhelos.

Así mismo a mis compañeros de aula que compartieron junto a mí, experiencias inolvidables durante toda esta etapa de formación universitaria, gracias por la amistad, compañerismo y todo lo vivido.

Daniela Katherine

DEDICATORIA

A Dios por bendecir mi vida, llenarme de fortaleza, sabiduría y ser el forjador de mi camino. Principalmente a mi amada madre Mónica Jiménez y querida abuelita Zoila Qualán quienes han sido las guías en mi camino y el motor de cada paso que doy. Gracias por haber inculcado sus valores y hacerme crecer como la persona que soy. Asimismo, a Henry Espinoza quien ha hecho las veces de padre y ha permanecido junto a mi familia desde temprana edad. Gracias por su amor, esfuerzo, sacrificio, y dedicación para alcanzar esta meta dentro de mi formación personal y profesional.

A mis hermanos Anghela, Yaneli, Jhon y Cristian por ser mi fuente de inspiración, permitiéndome mostrar que nada es fácil pero que con sacrificio, esfuerzo y paciencia se logra cumplir lo que a veces parece ser imposible.

De manera muy especial a dos compañeros y amigos de vida: Gabriela con quien he podido contar cuando más lo he necesitado; y a mi querido Alex el cual me ha apoyado incondicionalmente motivándome a seguir adelante y cumplir con esta meta. Gracias a ambos por compartir gratos y dificultosos momentos mostrando que más que amigos son familia, ustedes hicieron de esta experiencia una de las más especiales a lo largo de estos años.

¡Con Cariño!

Daniela Katherine

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
CERTIFICACIÓN.....	II
APROBACIÓN.....	III
AUTORIA	IV
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Antecedentes históricos.....	4
2.2. Descripción de la especie <i>Cinchona officinalis</i> L.	5
2.2.1. Clasificación botánica	5
2.2.2. Descripción botánica	5
2.2.3. Reproducción.....	6
2.2.4. Ubicación y distribución	6
2.2.5. Estado de conservación	6
2.3. Métodos de propagación	7
2.3.1. Propagación sexual o por semilla.....	7
2.3.2. Propagación asexual o vegetativa.....	8
2.4. Biotecnología.....	9
2.5. Micropropagación vegetal.....	10
2.5.1. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	10

2.5.1.1.	Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras	11
2.5.1.2.	Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico	11
2.5.1.3.	Etapa 2: Inducción de brotes	12
2.5.1.4.	Etapa 3: Multiplicación de brotes.....	12
2.5.1.5.	Etapa 4: Enraizamiento y elongación.....	13
2.5.1.6.	Etapa 5: Aclimatación	14
2.5.2.	Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	15
2.5.2.1.	Material vegetal.....	15
2.5.2.2.	Medio de cultivo.....	15
2.6.	Oxidación fenólica	19
2.6.1.	Problemas causados por oxidación fenólica.....	20
2.6.2.	Control de Oxidación fenólica	20
2.7.	Estudios similares sobre brotación y enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes.....	21
3.	METODOLOGÍA.....	23
3.1.	Ubicación del Área de Estudio.....	23
3.2.	Metodología para 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.	24
3.2.1.	Obtención de material vegetal.....	24
3.2.2.	Preparación del medio de cultivo	25
3.2.3.	Siembra de explantes.....	26
3.2.4.	Diseño experimental.....	27
3.2.4.1.	Especificaciones del diseño experimental por sitio.....	28
3.2.4.2.	Hipótesis del modelo.....	28

3.2.4.3.	Análisis estadístico	29
3.2.4.4.	Parámetros evaluados	29
3.3.	Metodología para establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	29
3.3.1.	Preparación del medio de cultivo	29
3.3.2.	Siembra de explantes.....	30
3.3.3.	Diseño experimental.....	31
3.3.3.1.	Especificaciones del diseño experimental por sitio.....	32
3.3.3.2.	Hipótesis del modelo	32
3.3.3.3.	Análisis estadístico	33
3.3.3.4.	Parámetros a evaluar.....	33
3.4.	Metodología para la difusión y publicación de los resultados de la investigación a actores sociales interesados.....	33
4.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Fase de multiplicación o brotación <i>in vitro</i> de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	35
4.1.1.	Porcentaje de brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	35
4.1.2.	Número de brotes por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	38
4.1.3.	Longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	41
4.1.4.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	43
4.1.5.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	45
4.1.6.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	47
4.2.	Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	49

4.2.1.	Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	49
4.2.2.	Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L.	53
4.2.3.	Longitud de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	56
4.2.4.	Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	58
4.2.5.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	60
4.2.6.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	62
4.2.7.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	64
4.3.	Difusión de la información a actores sociales interesados.	66
5.	DISCUSIÓN	68
5.1.	Fase de multiplicación o brotación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre	68
5.2.	Establecimiento del nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	71
6.	CONCLUSIONES	75
7.	RECOMENDACIONES	77
8.	BIBIOGRAFÍA	78
9.	ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Mapa de ubicación de Laboratorio de Micropropagación de la Universidad Nacional de Loja.....	23
Figura 2. Mapa de ubicación de árboles de <i>Cinchona officinalis</i> L., en tres relictos boscosos de la provincia de Loja. Zari, 2018	24
Figura 3. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Cinchona officinalis</i> L.	25
Figura 4. Ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	26
Figura 5. Siembra de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	26
Figura 6. Identificación de frascos (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) con explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	27
Figura 7. Siembra de ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	30
Figura 8. Identificación de frascos (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) con explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L.	31
Figura 9. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Zamora Huayco.	35
Figura 10. Brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	36
Figura 11. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Uritusinga.	36
Figura 12. Brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación en cada tratamiento. Sector Uritusinga.....	37
Figura 13. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Selva Alegre.	37

Figura 14.	Brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.....	38
Figura 15.	Número de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.	39
Figura 16.	Número de brotes por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	40
Figura 17.	Número de brotes por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.	41
Figura 18.	Longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.	42
Figura 19.	Longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.	42
Figura 20.	Longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.	43
Figura 21.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	44
Figura 22.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	44
Figura 23.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	45
Figura 24.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	46
Figura 25.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	46
Figura 26.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	47
Figura 27.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	48

Figura 28.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	48
Figura 29.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	49
Figura 30.	Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Zamora Huayco.	50
Figura 31.	Enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Zamora Huayco.....	50
Figura 32.	Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Uritusinga.	51
Figura 33.	Enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Uritusinga.....	51
Figura 34.	Porcentaje de enraizamiento en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. Sector Selva Alegre.	52
Figura 35.	Enraizamiento de <i>Cinchona officinalis</i> L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.....	52
Figura 36.	Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	53
Figura 37.	Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	54
Figura 38.	Número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	55
Figura 39.	Longitud promedio de raíces en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	56
Figura 40.	Longitud promedio de raíces de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	57
Figura 41.	Longitud promedio de raíces de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	58

Figura 42.	Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.	58
Figura 43.	Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.	59
Figura 44.	Longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.	60
Figura 45.	Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	60
Figura 46.	Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	61
Figura 47.	Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	62
Figura 48.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	62
Figura 49.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	63
Figura 50.	Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	64
Figura 51.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.....	64
Figura 52.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.....	65
Figura 53.	Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Pág.
Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).	16
Cuadro 2. Ubicación de árboles de <i>Cinchona officinalis</i> L., seleccionados en tres relictos boscosos de la provincia de Loja.	25
Cuadro 3. Reguladores de crecimiento auxina-citoquinina, para la multiplicación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L.	26
Cuadro 4. Factores y concentraciones de auxinas – citoquininas para formación de brotes.	27
Cuadro 5. Efecto de auxina-citoquinina en el crecimiento y desarrollo de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L.	28
Cuadro 6. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina, para enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L.	30
Cuadro 7. Factores y concentraciones de auxina-citoquinina para formación de raíces...	31
Cuadro 8. Efecto de la interacción auxina - citoquinina, en el enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en <i>Cinchona officinalis</i> L.	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido	Pág.
Anexo 1. Matriz de variables evaluadas en fase de multiplicación o brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>Cinchona officinalis</i> L.	87
Anexo 2. Matriz de variables evaluadas en fase de enraizamiento a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	87
Anexo 3. Porcentaje de brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	87
Anexo 4. Análisis estadístico para el porcentaje de brotación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Zamora Huayco.	88
Anexo 5. Promedio de número de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.	88
Anexo 6. Análisis estadístico para el número de brotes por explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Zamora Huayco.	89
Anexo 7. Promedio de longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.	89
Anexo 8. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L sector Zamora Huayco.	90
Anexo 9. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Uritusinga.	90
Anexo 10. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	91
Anexo 11. Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	91
Anexo 12. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	92

Anexo 13. Análisis estadístico para el porcentaje de oxidación de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Uritusinga.	92
Anexo 14. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Selva Alegre.....	93
Anexo 15. Porcentaje de enraizamiento de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	93
Anexo 16. Promedio de número de raíces por explante de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.	94
Anexo 17. Promedio de longitud de raíces de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.	94
Anexo 18. Promedio de longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	95
Anexo 19. Análisis estadístico para el promedio de longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Uritusinga.	95
Anexo 20. Análisis estadístico para el promedio de longitud de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sector Selva Alegre.....	96
Anexo 21. Porcentaje de contaminación en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	96
Anexo 22. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	97
Anexo 23. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.....	97
Anexo 24. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis.....	96

“BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE BROTAÇÃO Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Cinchona officinalis* L., PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”.

RESUMEN

Cinchona officinalis L., conocida como quina o cascarilla, es endémica del valle de Loja, al Sur del Ecuador, es uno de los géneros de mayor importancia debido al alto contenido de alcaloides que contiene su corteza, el cual durante siglos ayudó a combatir el paludismo y la malaria. Desde entonces, surgió su excesiva demanda, provocando la explotación irracional de la especie y destrucción de su hábitat, razón por la cual se encuentra en peligro de extinción y en pequeños relictos boscosos. Una alternativa para contribuir a la recuperación y conservación de la especie es investigar nuevas metodologías de propagación *in vitro* de tejidos vegetales que permita multiplicar plántulas de manera más rápida y eficiente.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el marco del proyecto: “Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., proveniente de los relictos boscosos de la provincia de Loja”, y se ejecutó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, en donde se determinó el balance hormonal adecuado en las fases de multiplicación y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L. El material vegetal fue proveniente de tres relictos boscosos de la provincia de Loja: Zamora Huayco (cantón Loja), Uritusinga (cantón Catamayo) y Selva Alegre (cantón Saraguro).

Para la fase de multiplicación *in vitro* se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales provenientes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., se sembraron en el medio de cultivo basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: AIA (0,0; 0,2; 0,5 mg L⁻¹) y BAP (2,0 y 2,5 mg L⁻¹). Con esta investigación se determinó que el tratamiento

T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) fue el mejor en cuanto a porcentaje de brotación en los tres sectores Zamora Huayco con 97,78 %, Uritusinga 93,33 % y Selva Alegre alcanzando 78,89 %.

En la fase de enraizamiento *in vitro* de igual manera se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas obtenidas en la fase de multiplicación, donde se comprobó que la concentración del T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), fue el que mejor resultado presentó en cuanto al porcentaje de enraizamiento en los sectores Zamora Huayco con 46,11 %, Uritusinga 17,78 % y Selva Alegre con 26,67 % asimismo, se obtuvo que el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) manifestó el mismo porcentaje en este sector. De esta manera, se determinó que el uso de mayor concentración de citoquininas promueve la formación de brotes mientras que, al combinar altas concentraciones de auxinas estimulan la formación de raíces.

Palabras clave: *Cinchona*, *in vitro*, micropropagación, multiplicación/brotación, enraizamiento.

SUMMARY

Cinchona officinalis L., known as keno or husk, it is endemic of Loja's valley, in the south of Ecuador, is one of the most important genres due to contain high quantity of alkaloids in its bark, which for centuries helped to fight malaria and malaria. Since then an excessive demand arose causing the irrational exploitation of the species and destruction of its habitat, reason for which it is in danger of extinction and small relict forest. An alternative to contribute to the recovery and conservation of the species is to investigate new methods of *in vitro* propagation of plant tissues that allows multiply seedlings more quickly and efficiently.

This research work was developed within the framework of the project: “Biotechnological processes to initiate genetic improvement of *Cinchona officinalis* L., from the relicts wooded province of Loja” and it was carried out in the laboratory of plant Micropropagation of the National University of Loja, where the correct hormonal balance was determined in the phases of the multiplication and rooting of *Cinchona officinalis* L. The vegetable material was taken from three wooded relicts of the province of Loja: Zamora Huayco (canton Loja), Uritusinga (canton Catamayo) and Selva Alegre (canton Saraguro).

For the *in vitro* multiplication phase was used on the stem apexes and nodal segments from *in vitro* plants of *Cinchona officinalis* L., they were sown in the basal medium Murashige y Skoog (MS) supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations: AIA (0,0; 0,2 and 0,5 mg L⁻¹) and BAP (2,0 and 2,5 mg L⁻¹). With this investigation one determined that the treatment T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) was the best as for percentage of brotation in three sectors Zamora Huayco with 97,78 %, Uritusinga 93,33 % and Selva Alegre reaching 78,89 %.

In the *in vitro* rooting phase in the same way was used on the stem apexes and nodal segments of *in vitro* plants obtained in the phase of multiplication, where it was found that the concentration of the T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) was the greatest effect, obtaining in the sectors Zamora Huayco with 46,11%, Uritusinga 17,78 and Selva Alegre with 26,67% likewise, obtained that the T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) said the same percentage in this sector. In this way, it was determined that the use of higher concentration of cytokinins promotes the formation of shoots while, when combining high concentrations of auxins stimulate the formation of roots.

Key words: *Cinchona*, cascarilla, micropropagation, multiplication, rooting.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Cinchona* es nativo de los valles andinos de Sudamérica, se encuentra en las estribaciones desde Venezuela a Bolivia, siguiendo los bosques nublados andinos, la especie tiene preferencia por los lugares más escarpados y de fuerte pendiente (Anderson y Taylor, 1994; Zevallos, 1989; Camp, 1949; Acosta-Solís, 1947). Se distribuye a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes, desde los 12° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (Anderson y Taylor, 1994). En Ecuador, se encuentra distribuida en las provincias de Bolívar, Cañar, Azuay, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja (Jorgensen y León, 1999).

Cinchona officinalis L., comúnmente llamada quina o cascarilla es considerada como “Planta Nacional del Ecuador”, pues simbolizó el origen histórico del “Árbol de la vida” (Córdor *et al.*, 2009; Garmendia, 2005; Anda, 2002; Moya, 1994) debido a las propiedades en su corteza. Además, es una de las especies endémicas más representativas que se encuentra localizada en pequeñas áreas geográficas del Valle de Loja (Córdor *et al.*, 2009; Andersson y Taylor, 1994).

Esta especie ha sido de gran importancia para la economía e historia de los países en los que se encuentra, la utilización de quina y quinina de la corteza, supuso un singular aporte para la salud y la cultura universal (Garmendia, 2005; Buddenhagen *et al.*, 2004) pues, fue el único remedio eficaz contra el paludismo y la malaria (Cuvi, 2011; Córdor *et al.*, 2009; Andersson y Taylor, 1994). Actualmente, esta planta ha sido reemplazada por otros medicamentos más eficientes como la “artemisia” que es una planta indispensable en medicina china ya que posee un efecto antimalárico para la producción de fármacos (Ferreira, 2004). Pese a ello la cascarilla tiene un nuevo uso en el mercado, pues es muy utilizada en la industria de alimentos y bebidas, como las aguas tónicas de sabor amargo, el más conocido “gin tonic” que ha conquistado varios

mercados de Europa y Estados Unidos (Ulloa, 2006;). De igual manera, su madera se utiliza para postes, puntales, vigas, leña y carbón (Loján, 1992).

A partir de esto, la excesiva demanda de *Cinchona* provocó durante años la explotación irracional de las especies que comprenden este género, sumado a ello, actividades como: la deforestación, incremento demográfico, incendios forestales, ampliación de la frontera agrícola y pecuaria han ocasionado la destrucción de su hábitat, reduciendo significativamente sus poblaciones, encontrándose únicamente en lugares apartados y en pequeños relictos boscosos; provocando a su vez, una baja tasa de germinación y regeneración natural (Buddenhagen *et al.*, 2004; Anda y Madsen, 2002).

Ante lo expuesto, surge la necesidad de realizar estudios en busca de nuevas metodologías alternativas de propagación que permitan el uso de herramientas biotecnológicas, como la técnica de propagación *in vitro* de tejidos vegetales, con el fin de incidir en la recuperación, conservación y protección de la especie; así como, aportar en programas de forestación y reforestación impulsados por organismos gubernamentales y no gubernamentales, para recuperar zonas degradadas y sus ecosistemas.

Con estos antecedentes, el presente trabajo de investigación está orientado a generar información científica sobre la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., para determinar el balance hormonal adecuado en las fases de brotamiento y enraizamiento, con la finalidad de multiplicar plantas de *Cinchona* de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. Además; cabe mencionar que la investigación se desarrolló durante el periodo: julio 2017- agosto 2018, el mismo que formó parte del proyecto de investigación: “Procesos biotecnológicos para iniciar el mejoramiento genético de *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja”, que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la

Universidad Nacional de Loja. Para el desarrollo de la investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

- ✓ Aportar a la generación de información sobre el balance hormonal, que permita la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Objetivos Específicos

- ✓ Determinar el efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.
- ✓ Establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.
- ✓ Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes históricos

El género *Cinchona* conocida como cascarilla o quina fue descubierto en Ecuador en el siglo XVII. El árbol que daba la quina más apreciada en el mercado desde el descubrimiento de su poder febrífugo que ha recibido diferentes nombres como: quina de Loja, quina fina, o quina verdadera. La primera descripción científica la hizo en 1738 Charles Marie de la Condamine, y la descripción del género y la especie la realizó Linneo basándose en la publicación de La Condamine, quien le asignó el binomen de *Cinchona officinalis* L., que ha prevalecido hasta nuestros días (Buitrón, 1999).

Esta especie fue encontrada por primera vez en los bosques de Cajanuma y Uritusinga ubicados en la provincia de Loja, la misma que fue explotada hasta el siglo XIX, debido a dichas propiedades medicinales para prevenir y curar la malaria. Actualmente, la corteza de quina tiene infinidad de beneficios digestivos y depurativos en el organismo, además, se usa en la industria farmacéutica para la extracción de diversas drogas que tratan la malaria, hemorroides, calambres en los pies, como anestésico, antiséptico, astringente y febrífugo (Cifuentes, 2013).

Asimismo, debido al contenido de alcaloides en su corteza que son sustancias vegetales usadas por su acción fisiológica específica; se han conocido y estudiado los más importantes: cinchonina, cinchonidina, quinidina y quinina, éste último es el más importante antimalárico (Garmendia, 1999). Sin embargo, a partir de 1997, el taller de Etnobotánica y Botánica Económica calificó a la especie como una planta potencialmente amenazada a nivel nacional, debido a la sobreexplotación para su comercio (Buitrón, 1999; Nieto, 2000).

2.2. Descripción de la especie *Cinchona officinalis* L.

2.2.1. Clasificación botánica

Según la Unidad de Informática para la Biodiversidad del Instituto de Biología (UNIBIO) (2010); Álvarez (2014) y Missouri Botanical Garden (2015) *Cinchona officinalis* L., la clasifican de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Angiosperma

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Cinchona*

Especie: *officinalis*

Nombre Científico: *Cinchona officinalis* L.

Nombre común: Árbol de quinina, cascarilla, quina

2.2.2. Descripción botánica

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

La forma de la hoja varia de casi orbicular o lanceolada de 8 a 27 cm de largo y de 7 a 18 cm de ancho (Andersson, 1998). Las flores se encuentran en panículas terminales de 20 a 25 cm

de longitud, son hermafroditas; la corola es blanca-roja. Los frutos son capsulas de color marrón oscuro, de forma elipsoide (Garmendia, 2005).

2.2.3. Reproducción

Cinchona officinalis L., se propaga por semillas y las plantas que se obtienen por semilla tienen un desarrollo muy lento. El tipo de germinación para esta especie es epigea y el principal agente dispersante es el viento y el agente polinizador son las aves (Loján, 1992).

2.2.4. Ubicación y distribución

La especie se encuentra registrada en los países andinos como Colombia y Perú a lo largo de la cordillera oriental y central de los Andes en los bosques montanos, desde los 2 800 hasta los 3 100 msnm (Missouri Botanical Garden, 2015; McComb, 1946).

En el Ecuador se distribuye en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora Chinchipe y Loja. La especie *Cinchona officinalis* L., es una especie endémica de la Región Sur del Ecuador (RSE) específicamente del valle de Loja (Garmendia, 2005; Jorjensen y León, 1999). Actualmente, las poblaciones de *Cinchona* son pequeñas (Garmendia, 2005), encontrándose solo en lugares donde se dan condiciones específicas para la germinación y el desarrollo de las plántulas.

2.2.5. Estado de conservación

Las propiedades medicinales de *Cinchona officinalis* L., hizo que las poblaciones de la provincia de Loja fueran sobreexplotadas desde el siglo XVII hasta el siglo XIX. Sin embargo, actividades como la agricultura, ganadería y deforestación, han tenido un impacto mucho más significativo en la destrucción de su hábitat que la propia cosecha de la corteza (Madsen, 2002).

La pérdida de hábitat y la fragmentación de las pocas poblaciones remanentes colocan a la especie en un estado crítico de conservación, aunque esta especie aún no está en el listado de UICN (Espinosa y Ríos, 2017), se encuentra únicamente en lugares apartados y en pequeños relictos boscosos, además, en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración (Buddenhagen *et al.*, 2004).

2.3. Métodos de propagación

Miller (1967) indica dos tipos de propagación de plantas que se observan en la naturaleza: sexual (por semilla) y asexual (vegetativamente), en las cuales se puede lograr una diversidad de técnicas de siembra dependiendo del tipo de especie que se vaya a propagar

2.3.1. Propagación sexual o por semilla

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

Asimismo, es uno de los principales métodos de reproducción de las plantas en la naturaleza, además de ser uno de los más eficientes y más usados en la producción de plantas cultivadas. A las plantas obtenidas por semilla se les llama plántulas. La siembra de la semilla es el inicio físico de la propagación de plántulas. Esto se debe a que la semilla es el producto final de un proceso de crecimiento y desarrollo efectuado en la planta progenitora (Martínez *et al.*, 2006).

La reproducción sexual en los árboles aporta diversidad genética a la población, que favorece a los individuos forestales para su adaptación futura a condiciones ambientales cambiantes (Smith y Smith, 2001).

2.3.2. Propagación asexual o vegetativa

La reproducción asexual, consiste en la propagación empleando partes vegetativas de la planta original, es posible porque cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para generar una nueva planta, esta característica se conoce como totipotencia celular (Hartmann y Kester, 1995).

Según Chamba (2002) menciona que la reproducción asexual o vegetativa es el proceso mediante el cual se multiplica o propaga un solo individuo mediante algún proceso de gemación y ello garantiza que todos los individuos resultantes son genéticamente idénticos (clon) y se minimiza el origen de tipos recombinantes. Ello se debe a que en este proceso no participan las células reproductivas, no hay unión de gametos masculinos y femeninos, no hay reducción cromosómica o meiosis, ocurriendo sólo la mitosis, es decir la constitución genética y cualidades hereditarias son idénticas en todos los descendientes.

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

2.4. Biotecnología

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) (1992) define la biotecnología como “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”.

Algunos autores definen a la biotecnología como una tecnología que integra las ciencias naturales y la ingeniería para aplicar en organismo y células o partes de estos las potencialidades de los seres vivos y su posibilidad de modificación selectiva y programada para la obtención de productos, bienes y servicios que permiten resolver diferentes tipos de necesidades humanas. Por tanto, la biotecnología agrupa los fundamentos de un gran número de disciplinas que conjunta diversas técnicas, métodos y procesos en donde, emplean sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, desarrolla tecnologías y procesos que van desde la biología clásica (taxonomía), hasta la bioingeniería, pasando por la ingeniería genética, microbiología, bioquímica, biología celular y molecular, e inmunología, etc., (Larronda, 2014; Romero, 2008; Muñoz, 1994).

Al hablar acerca de propagación *in vitro* la rama que se involucra en la misma es la biotecnología vegetal la cual, es una extensión de la tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante, esta permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada (Suárez *et al.*, 2006).

La principal ventaja que ofrece la biotecnología vegetal en la generación de líneas o plantas mutantes es la posibilidad de selección de nuevas características *in vitro*. En el tubo de ensayo cada célula se convierte en un individuo y es por lo tanto posible, muestrear millones de ellos en un tiempo y espacio limitados (Camarena *et al.*, 2014).

2.5. Micropropagación vegetal

La micropropagación, consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente, donde se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1995).

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

Esta técnica se ha convertido en una alternativa importante dentro de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies (Hartmann y Kester, 1995).

2.5.1. Etapas de la micropropagación *in vitro*

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

2.5.1.1. Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras

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

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

2.5.1.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico

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

Durante el proceso de desinfección se debe precautelar la integridad del explante a fin de evitar la oxidación y necrosamiento del material vegetal, ya que al emplear concentraciones altas de hipoclorito de sodio afecta la viabilidad del explante. No es posible establecer un mismo

protocolo de desinfección para cualquier explante de cualquier especie, debido a que el mismo debe estar diseñado en función de varios factores (Roca y Mroginski, 1993).

2.5.1.3. Etapa 2: Inducción de brotes

En esta etapa es fundamental establecer un diseño experimental en función de las concentraciones de citoquininas y auxinas que se van a emplear durante el proceso de inducción a brotes. Una correcta concentración entre citoquininas y auxinas permite obtener una respuesta por parte del material vegetal, aunque concentraciones elevadas de citoquininas suele provocar una inhibición de la respuesta que se quiere obtener del explante (Roca y Mroginski, 1993).

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

2.5.1.4. Etapa 3: Multiplicación de brotes

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

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

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

2.5.1.5. Etapa 4: Enraizamiento y elongación

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

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o que solo posea hormonas de tipo auxinas. Algunas plantas no requieren de este paso, ya que, al tener auxinas endógenas, estas son las encargadas de inducir

una respuesta de enraizamiento del explante, hasta obtener una plántula completa, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurre de forma simultánea (Castillo, 2004).

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

2.5.1.6. Etapa 5: Aclimatación

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

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

2.5.2. Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

2.5.2.1. Material vegetal

La contaminación del material vegetal que se cultiva *in vitro* depende principalmente de la planta madre donadora, de la cual es necesario llevar a cabo un control fitosanitario y mantener las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento y desarrollo de yemas apicales y axilares, las cuales pueden ser empleadas como explantes durante la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*. De igual manera, en caso de emplear explantes cultivados en el campo, la contaminación del material vegetal es debido a la presencia de microorganismos endógenos, lo que conlleva un elevado porcentaje de aparición de bacterias u hongos (Pierik, 1990).

2.5.2.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación de sustancias químicas que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*. Castillo (2004) señala que el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

A continuación, se presenta la descripción de cada una de ellas:

a. Sales inorgánicas

Los elementos mayormente esenciales que todas las plantas requieren y son parte de los fertilizantes comunes, también forman parte de los medios de cultivo, estos son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S) calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe). Además, se encuentran los elementos menores, que de igual manera son esenciales, pero se requieren en

pequeñas cantidades, estos son: boro (B), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), cobalto (Co), zinc (Zn), cobre (Cu), cloro (Cl) y, yodo (I).

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

Soluciones	Reactivo	mg L⁻¹
Macronutrientes	Nitrato de Amonio	1650.00
	Nitrato de Potasio	1900.00
	Fosfato de Potasio (Monobásico)	170.00
	Cloruro de Calcio (Dihidrato)	440.00
	Sulfato de Magnesio (Heptahidrato)	370.00
Micronutrientes	Ácido Bórico	6.20
	Sulfato de Manganeso (Monohidrato)	15.50
	Sulfato de Zinc (Heptahidrato)	8.60
	Cloruro de Cobalto	0.025
	Molibdato de Cobalto (Dihidrato)	0.25
	Sulfato Cúprico (Pentahidrato)	0.025
Vitaminas	Tiamina-HCl	0.10
	Piridoxina-HCl	0.50
	Ácido Nicotínico	0.50
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Glicina		2.00
EDTA	EDTA	37.30
	Sulfato de Hierro (Heptahidrato)	27.80
Mio-inositol		100.00

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

b. Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, pues se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo de tejidos es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia por estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato y riboflavina (Lluna, 2006).

c. Reguladores de crecimiento

El desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos. Dentro de los factores internos se incluye las hormonas (o fitohormonas), las cuales definen como señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades. El control hormonal lo realizan auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Sin embargo, en los últimos años se han aislado una serie de sustancias que también pueden clasificarse como hormonas vegetales (Azcon-Bieto y Talón, 2000).

A continuación, se describen los reguladores de crecimiento más usados

1) Auxinas

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de sustancias que estimulan la elongación. El ácido indolacético (AIA) es la forma predominante, sin embargo, se aceptan como auxinas naturales el ácido fenil acético, ciertos cloro-indoles y el ácido indolbutílico. A su vez existen varias sustancias que causan un efecto fisiológico similar y que se han producido sistemáticamente; entre las cuales se encuentra el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) (Taiz y Zeiger, 1998).

Las auxinas son hormonas transportadas por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala, es decir, desde el punto de vista apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxinas reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de las auxinas fuera de la lámina foliar hacia la base del peciolo parece también prevenir la abscisión de las hojas (Raven *et al.*, 1999).

En el cultivo *in vitro* de tejidos se utiliza principalmente para estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta que se produce tras la aplicación al explante depende de la edad fisiológica del material vegetal, la naturaleza de las auxinas, concentración y tiempo de aplicación (Hartmann *et al.*, 1997).

2) Citoquininas

Las citoquininas proceden de la fenilúrea, son compuestos sintéticos divididos en dos grupos, las piridylureas y las thidiazolureas. En el grupo de las thidiazolureas se encuentra el thidiazuron, un compuesto con actividad de citoquinina, el cual es tan efectivo que las citoquininas naturales en la promoción del desarrollo de yemas axilares, o la diferenciación de yemas adventicias en cultivos *in vitro* (Huetteman *et al.*, 1993).

Las citoquininas regulan varios procesos del desarrollo de las plantas incluyendo división celular, proliferación de yemas axilares, senescencia foliar y floración, entre otros. Gran parte de esos procesos están afectados por otros estímulos, especialmente ambientales y hormonales. Como caso típico esta la interacción de las citoquininas con las auxinas que se utiliza para

regular la neoformación de órganos *in vitro* y controlar la dominancia apical fundamental en la industria de la micropropagación (Ascón-Bieto y Talón, 2000).

3) Giberelinas

Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990). Las giberelinas especialmente el AG3, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Rosales *et al.*, 2004).

d. Carbón activado

Es un componente que se utiliza (0,1 a 5%), incorporado al medio de cultivo, ha mostrado ser útil en el cultivo de diferentes explantes, al usarlo como sustrato para absorber metabólicos tóxicos o fenoles oxidantes en la misma (Roca y Mroginski, 1993).

2.6. Oxidación fenólica

La oxidación fenólica es un aspecto común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una herida (Preece y Compton, 1991). Pérez (1998) menciona que puede constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemas y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afección en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte, constituyendo en múltiples ocasiones una dificultad para el establecimiento de los cultivos *in vitro*.

2.6.1. Problemas causados por oxidación fenólica

Algunas plantas en especial las leñosas producen exudados de color marrón o negro, la presencia de estos compuestos se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante de la planta madre, que generalmente impiden que las células del explante sintetizen algunas proteínas impidiendo el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas en el cultivo *in vitro* (Hjarsen, 1997; Quintero *et al.*, 1993)

La presencia de oxidación fenólica puede ser producto de la combinación de procesos y condiciones de cultivos óptimos (tiempo de desinfección, eliminación de compuestos inhibidores de crecimiento y aplicación de solución antioxidante) determinados durante la estandarización del procedimiento de desinfección. (Gray y Trigiano, 2000).

2.6.2. Control de Oxidación fenólica

Existen algunas formas de controlar o prevenir la oxidación como adicionar carbón activado al medio; se suele emplear soluciones antioxidantes de ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cisteína, estos compuestos pueden impedir la oxidación fenólica. (Hjarsen T., 1997). La adición de solución antioxidante en el procedimiento de desinfección permite obtener una mayor sobrevivencia de explantes, así como una menor proporción de individuos necróticos.

George y Sherrington (1984) recomiendan mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja, como un mecanismo para disminuir la oxidación fenólica, pues las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementan con la luz; por lo cual, se sugiere emplear esta técnica para nuevos ensayos de propagación *in vitro* de explantes.

2.7. Estudios similares sobre brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes.

Chamba (2017) realizó el estudio “Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas, en la Argelia - Loja”, en donde utilizó medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), adicionando diferentes reguladores de crecimiento, tanto en la fase de brotamiento, como de enraizamiento. Para la fase de brotamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., se combinó auxinas y citoquinas en diferentes concentraciones: ANA en concentraciones de 0,5 y 1,5 mg L⁻¹ y BAP en concentraciones de 2,5; 3,0 y 3,5 mg L⁻¹). En esta fase se evaluaron variables como número de brotes por explante, longitud de brote, número de nudos y hojas por brote. La combinación hormonal 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP resultó ser la más efectiva en cuanto a la formación de brotes, número de nudos y hojas, obteniéndose resultados de 6,06 brotes por explante, con 2,92 nudos, 6,20 hojas por brote. En cuanto al tamaño de los brotes el mejor resultado se obtuvo en la combinación hormonal 1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP, dando una altura de 17,68 mm por brote.

Para la fase de enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. utilizó ANA, AIA y AIB en concentraciones de 0,1; 0,5 y 1,0 mg L⁻¹. Las variables de respuesta a evaluar fueron número de raíces, longitud de raíces, número de brotes por explante, longitud de brotes, formación de nudos y formación de hojas. La concentración hormonal 1,0 mg L⁻¹ ANA resultó ser la más efectiva para las variables número de raíces por explante y longitud de raíz, en el cual se obtuvo 5,31 raíces por explante, con una longitud de raíces de 2,45 mm; cabe señalar que las raíces conseguidas en este tratamiento corresponden a raíces adventicias, formadas a partir de organogénesis indirecta o callos. En la concentración hormonal AIB 1,0 mg L⁻¹ se observó la formación de raíces por organogénesis directa, con un promedio de enraizamiento de 0,75

raíces por explante con un tamaño de 0,74 mm. Por otro lado, para las variables de brotamiento y longitud de brotes evaluadas en la fase enraizamiento, la concentración hormonal 0,5 mg L⁻¹ ANA resultó ser la más efectiva, donde se obtuvo un promedio de 3,74 brotes por explante con una longitud de 31,29 mm. Sin embargo, para las variables de formación de nudos y hojas la concentración hormonal 0,1 mg L⁻¹ ANA resultó la más favorables, dando resultados promedio de 2,92 nudos con 6,20 hojas por brote.

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del Área de Estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra ubicado a 3 km de la Ciudad de Loja, entre las coordenadas geográficas: Latitud: 4° 1'56.18"S; Longitud: 79°12'0.07"O

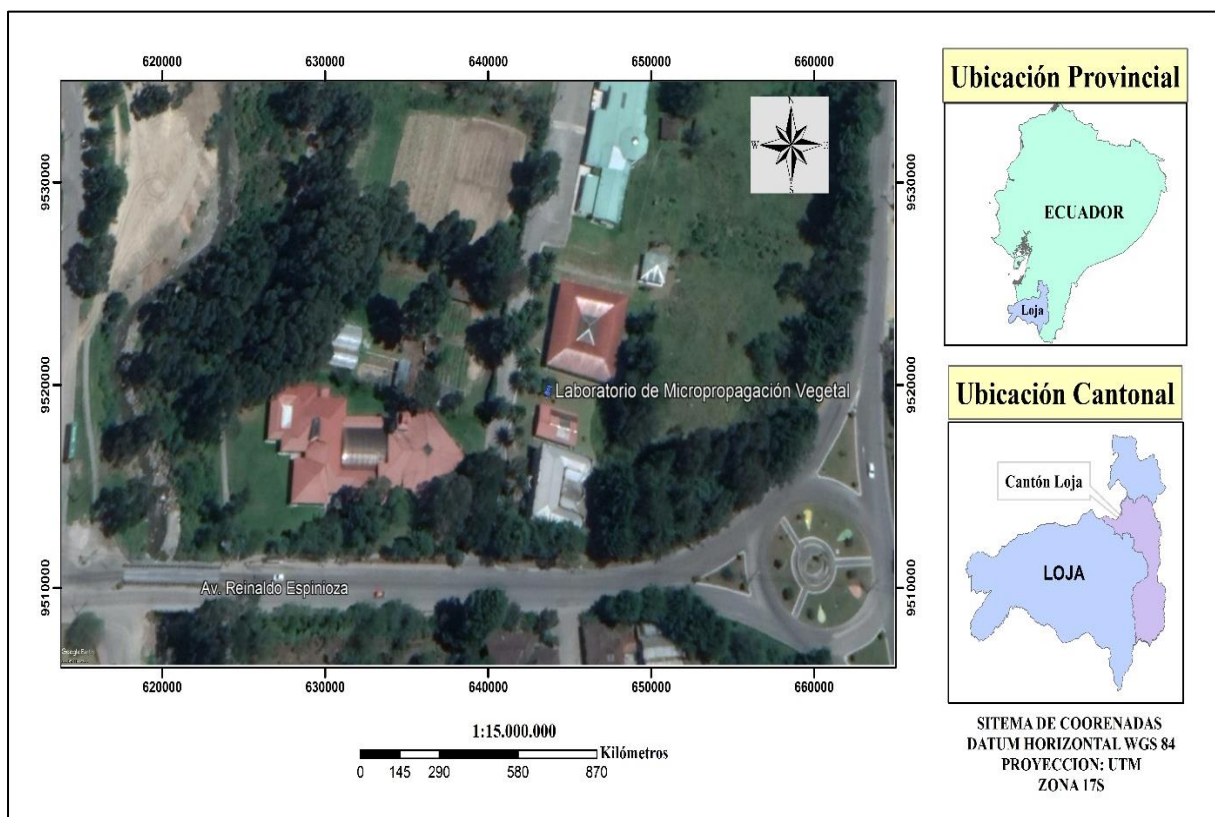


Figura 1. Mapa de ubicación de Laboratorio de Micropropagación de la Universidad Nacional de Loja.

3.2. Metodología para determinar el efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

3.2.1. Obtención de material vegetal.

Previo al establecimiento de los ensayos de multiplicación, se realizó la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., (Figura 3). Las semillas fueron colectadas de árboles seleccionados que presentan características fenotípicas sobresalientes provenientes de tres relictos boscosos en la provincia de Loja (Figura 2) (Cuadro 2). Se eligieron las semillas con mejores rasgos en cuanto a: forma, tamaño, madurez fisiológica y buenas condiciones fitosanitarias.

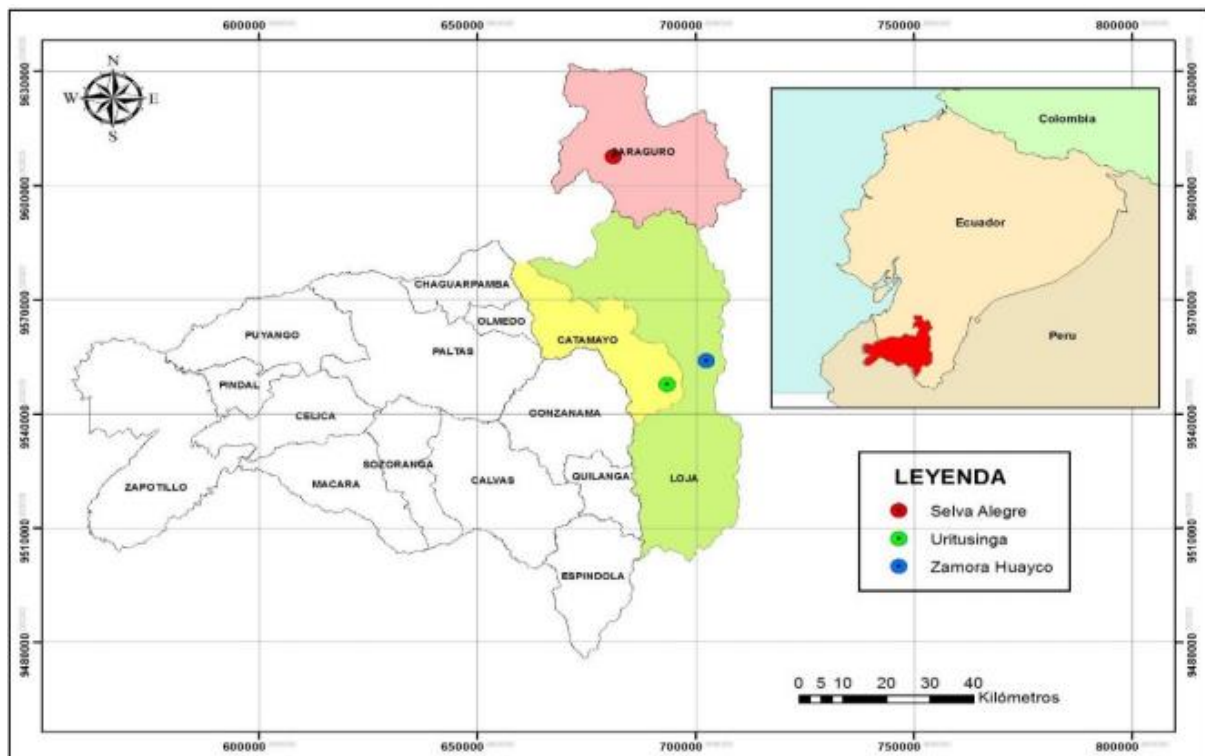


Figura 2. Mapa de ubicación de árboles de *Cinchona officinalis* L., en tres relictos boscosos de la provincia de Loja. (Zari, 2018).

Cuadro 2. Ubicación de árboles de *Cinchona officinalis* L., seleccionados en tres relictos boscosos de la provincia de Loja.

UBICACIÓN	CANTÓN	N ° DE ÁRBOL	CÓDIGO
Zamora Huayco	Loja	11	ZH-A11
Selva Alegre	Saraguro	3	SA-A3
Uritusinga	Catamayo	3	U-A3



Figura 3. Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L.

3.2.2. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo constituido por sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con vitaminas (Tiamina 1 mg L⁻¹ y Mio-inositol 100 mg L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante 0,6 %, además, se adiciono reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones (Cuadro 3). El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH)1N.

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento auxina – citoquinina, para la multiplicación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO	AUXINA	CITOQUININA
	AIA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
T1	0,0	2,0
T2	0,0	2,5
T3	0,2	2,0
T4	0,5	2,0

Fuente: Proyecto *Cinchona officinalis* (UNL), 2017-2018.

El medio de cultivo fue distribuido en frascos de vidrio a razón de 30 ml/frasco, que se esterilizaron en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos.

3.2.3. Siembra de explantes

En la cámara de flujo laminar se sembró dos explantes por frasco, para lo cual, se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales provenientes de vitroplantas con altura de 1.0 a 2.0 cm y de 1 a 2 nudos (obtenidas en fase de germinación) (Figura 4 y 5).



Figura 4. Ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

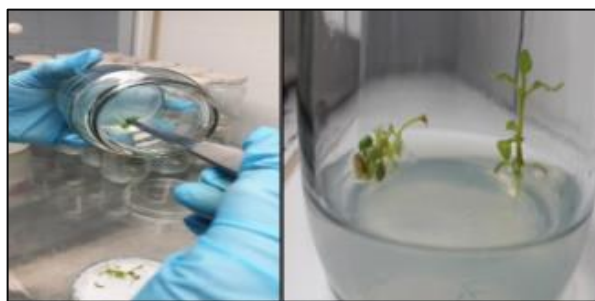


Figura 5. Siembra de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Los frascos se identificaron (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) (Figura 6) y se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de ± 23 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, por 90 días de evaluación.



Figura 6. Identificación de frascos (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) con explantes de *Cinchona officinalis* L.

3.2.4. Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos y tres repeticiones. El cuadro 4 muestra los factores (hormonas) y las concentraciones usadas, mientras que el cuadro 5 expone los tratamientos evaluados en el efecto hormonal auxina - citoquinina para el crecimiento y desarrollo de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *C. officinalis*.

Cuadro 4. Factores y concentraciones de auxinas - citoquininas para formación de brotes.

FACTORES	CONCENTRACIONES (mg L ⁻¹)
Nivel de concentración de Auxinas (AIA)	0,0 (A1)
	0,2 (A2)
	0,5 (A3)
Nivel de concentración de Citoquininas (BAP)	2,0 (C1)
	2,5 (C2)

Fuente: Proyecto *Cinchona officinalis* (UNL), 2017-2018.

Cuadro 5. Efecto de la combinación hormonal auxina-citoquinina en el crecimiento y desarrollo de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
T1	0,0 mg L ⁻¹ AIA + 2,0 mg L ⁻¹ BAP	A1C1
T2	0,0 mg L ⁻¹ AIA + 2,5 mg L ⁻¹ BAP	A1C2
T3	0,2 mg L ⁻¹ AIA + 2,0 mg L ⁻¹ BAP	A2C1
T4	0,5 mg L ⁻¹ AIA + 2,0 mg L ⁻¹ BAP	A3C1

Fuente: Laboratorio de Micropropagación Vegetal (UNL), 2017-2018.

3.2.4.1. Especificaciones del diseño experimental por sitio

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

3.2.4.2. Hipótesis del modelo.

Ho: La aplicación del balance hormonal auxina - citoquinina no estimulan el brotamiento de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

Hi: La aplicación del balance hormonal auxina - citoquinina estimulan el brotamiento de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

3.2.4.3. Análisis estadístico

Se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017) versión 2017; a través del cual se realizó el análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de Tukey al 0,05 de probabilidad, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las medias y las varianzas de los tratamientos utilizados.

3.2.4.4. Parámetros evaluados.

La evaluación se realizó a través de observación directa durante 90 días, en periodos de cinco días a partir del tercer día de haber realizado la siembra de explantes (Anexo1). Las variables evaluadas fueron:

- ✓ Porcentaje de brotación
- ✓ Número de brotes por explante
- ✓ Longitud del brote.
- ✓ Porcentaje de sobrevivencia
- ✓ Porcentaje de contaminación
- ✓ Porcentaje de oxidación fenológica

3.3. Metodología para establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

3.3.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo para la fase de enraizamiento estuvo compuesto por sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas (Tiamina 1 mg L⁻¹ y Mio - Inositol 100 ml L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante 0,6

%, carbón activado 1 g L^{-1} y reguladores de crecimiento, constituido por auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones (Cuadro 6). El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 de HCL o NaOH1N.

Cuadro 6. Concentraciones hormonales auxina - citoquinina, para enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO	AUXINA	CITOQUININA
	AIB (mg L^{-1})	BAP (mg L^{-1})
T1	1,0	0,0
T2	2,0	0,0
T3	1,0	0,5
T4	2,0	0,5

Fuente: Proyecto *Cinchona officinalis* (UNL), 2017-2018.

El medio de cultivo se distribuyó en frascos de vidrio a razón de 30 ml/frasco, y se esterilizó en autoclave a temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $1,5\text{ kg/cm}^2$ de presión, durante 20 minutos.

3.3.2. Siembra de explantes

En la cámara de flujo laminar se sembró dos explantes por frasco, para lo cual se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales obtenidos previamente en la fase de brotación de 1 a 2 cm de altura con 1 a 2 nudos (Figura 7).



Figura 7. Siembra de ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

Los frascos se identificaron (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) (Figura 8) y colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de ± 23 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, por 90 días de evaluación.



Figura 8. Identificación de frascos (tratamiento, sector, número de árbol y fecha) con explantes de *Cinchona officinalis* L.

3.3.3. Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 4 x 3, con cuatro tratamientos y tres repeticiones. En el cuadro 7 se muestran los factores (hormonas) y las concentraciones usadas en el enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *C. officinalis*, mientras que en el cuadro 8 se exponen los tratamientos evaluados.

Cuadro 7. Factores y concentraciones de auxina-citoquinina para formación de raíces.

FACTORES	CONCENTRACIONES (mg L ⁻¹)
Nivel de concentración de auxinas (AIB)	1,0 (A1)
	2,0 (A2)
Nivel de concentración de citoquininas (BAP)	0,0 (C1)
	0.5 (C2)

Fuente: Proyecto *Cinchona officinalis* (UNL), 2017-2018.

Cuadro 8. Efecto de la interacción auxina – citoquinina en el enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
T1	1,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mg L ⁻¹ BAP	A1 C1
T2	2,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mg L ⁻¹ BAP	A2 C1
T3	1,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ BAP	A1 C2
T4	2,0 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ BAP	A2 C2

Fuente: Proyecto *Cinchona officinalis* (UNL), 2017-2018.

3.3.3.1. Especificaciones del diseño experimental por sitio

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

3.3.3.2. Hipótesis del modelo

Ho: La interacción auxina - citoquinina no induce el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Hi: La interacción auxina - citoquinina induce el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

3.3.3.3. Análisis estadístico

Se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017) versión 2017; se realizó el análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de Tukey al 0,05 de probabilidad, con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas entre las medias y las varianzas de los tratamientos utilizados.

3.3.3.4. Parámetros a evaluar

La evaluación se realizó a través de observación directa durante 90 días, en periodos de cinco días a partir del tercer día de haberse realizado la siembra de explantes (Anexo 2). Las variables evaluadas fueron:

- ✓ Porcentaje de enraizamiento
- ✓ Numero de raíces por explante
- ✓ Longitud de raíces
- ✓ Longitud de brote
- ✓ Porcentaje de contaminación
- ✓ Porcentaje de sobrevivencia
- ✓ Porcentaje de oxidación fenológica

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

Para cumplir con el tercer objetivo, se llevó a cabo las siguientes actividades:

- ✓ Socialización de los resultados al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, a través de una exposición magistral.

- ✓ Elaboración de un tríptico divulgativo dirigido a los actores interesados, con los resultados de la investigación.
- ✓ Elaboración de un folleto técnico con los resultados obtenidos.
- ✓ Elaboración de un artículo científico.
- ✓ Elaboración y publicación de la tesis.

4. RESULTADOS

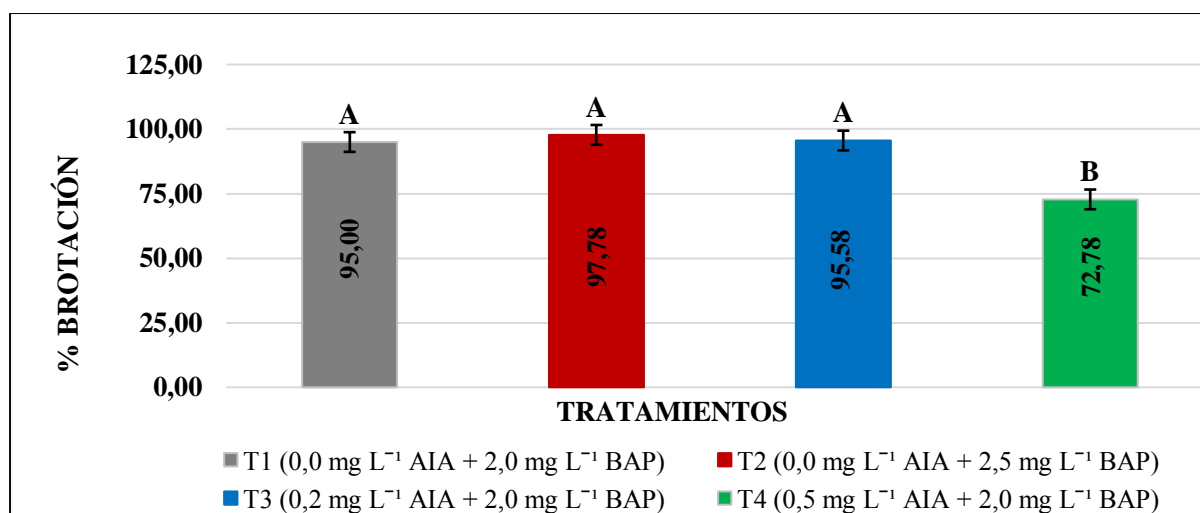
4.1. Fase de multiplicación o brotación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

4.1.1. Porcentaje de brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.1.1. Sector Zamora Huayco

De los resultados obtenidos se pudo apreciar a los 90 días de evaluación que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) presentó mayor porcentaje de brotación (97,78) mientras que, el T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) manifestó el porcentaje más bajo (72,78) (Figura 9 y 10).

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que existen diferencias significativas ($p= 0,0053^*$) entre tratamientos (Anexo 3 y 4).



Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$

Figura 9. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L. Sector Zamora Huayco.

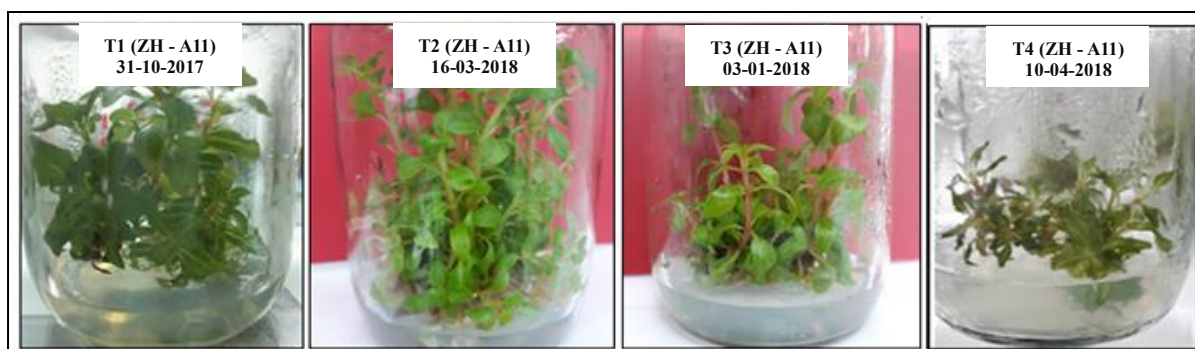
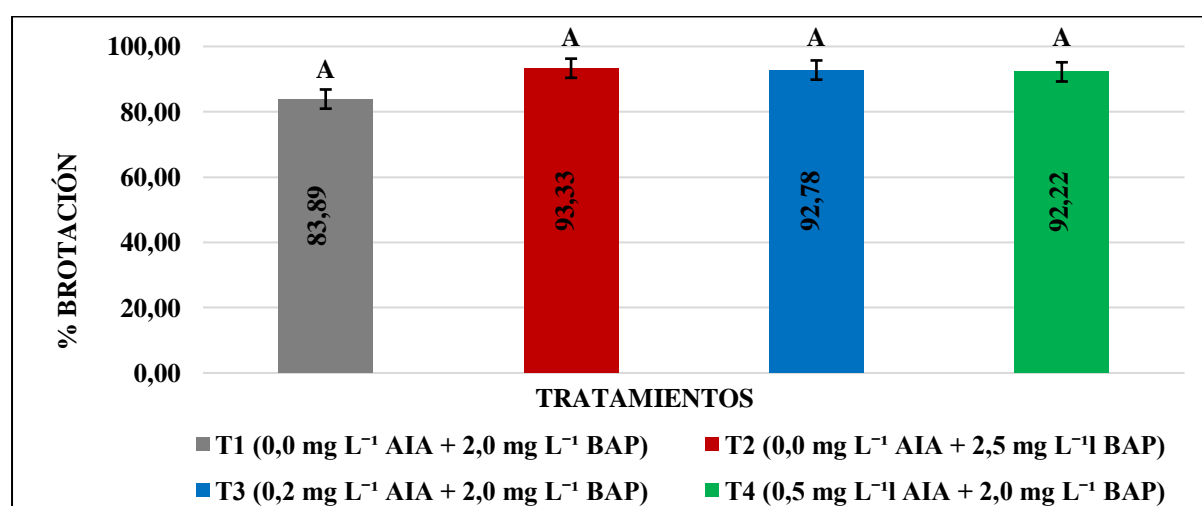


Figura 10. Brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.1.2. Sector Uritusinga

Los resultados registraron que el tratamiento T2 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ AIA + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) alcanzó mayor porcentaje de brotación (93,33) en cambio, el T1 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) indicó el porcentaje más bajo (83,89) durante la evaluación (Figura 11 y 12).

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,1814$) entre tratamientos (Anexo 3).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 11. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L. Sector Uritusinga.

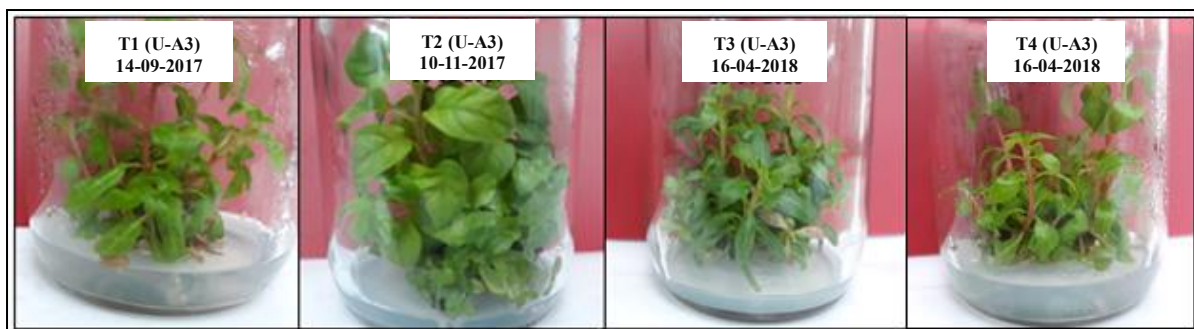
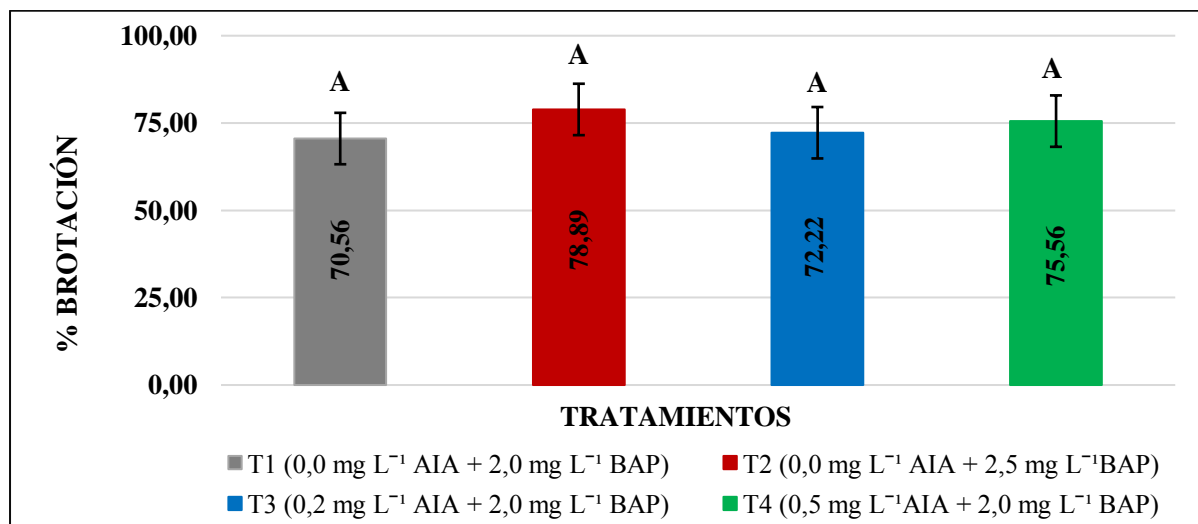


Figura 12. Brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación en cada tratamiento. Sector Uritusinga.

4.1.1.3. Sector Selva Alegre

Los resultados determinaron que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo mayor porcentaje de brotación (78,89) sin embargo, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el porcentaje más bajo (70,56) (Figura 13 y 14).

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,8420$) entre tratamientos (Anexo 3).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 13. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L. Sector Selva Alegre.

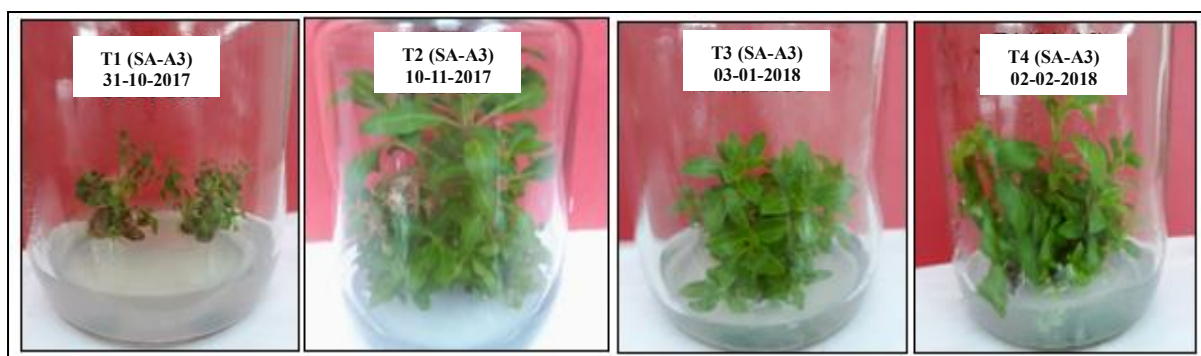


Figura 14. Brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.

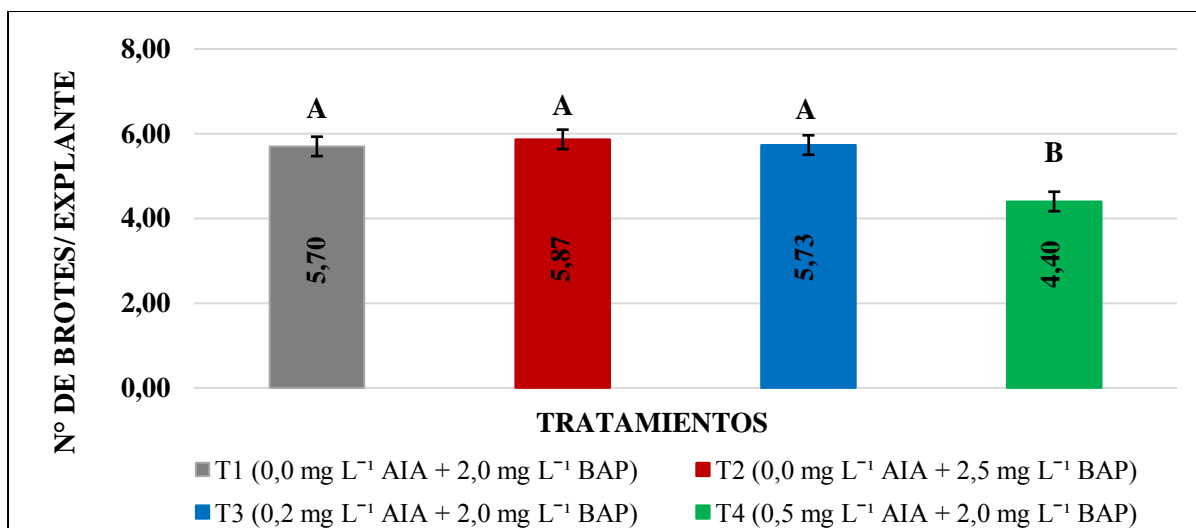
4.1.2. Número de brotes por explante de *Cinchona officinalis* L.

4.1.2.1. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco a los 90 días de evaluación, se observó que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor número de brotes (5,87) a razón de 6 brotes por explante, mientras que el T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor número (4,40) (Figura 15).

La aparición de brotes fue diferente en todos los tratamientos pues, para los tratamientos T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) se observaron a los 5 días de haber realizado la siembra, mientras que para el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) los brotes se mostraron a los 10 días y para el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) a partir de los 15 días.

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que existen diferencias significativas ($p= 0,0053^*$) entre los tratamientos (Anexo 5 y 6).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

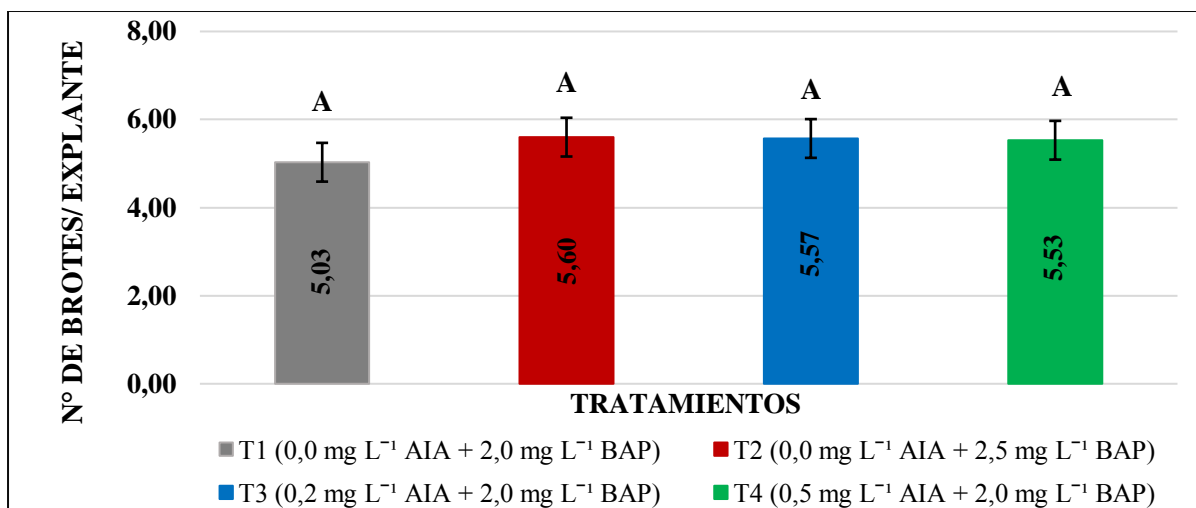
Figura 15. Número de brotes de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.2.2. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga se determinó a los 90 días de evaluación que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor número de brotes (5,60) a razón de 6 brotes por explante, en cambio, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el menor número (5,03) (Figura 16).

La aparición de brotes fue distinta en los tratamientos durante la evaluación así, para el T1 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) se visualizaron a los 10 días de haber realizado la siembra, en cambio, para los tratamientos T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) y T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) se presentaron a los 15 días.

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existen diferencias significativas ($p = 0,1227$) entre los tratamientos (Anexo 5).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

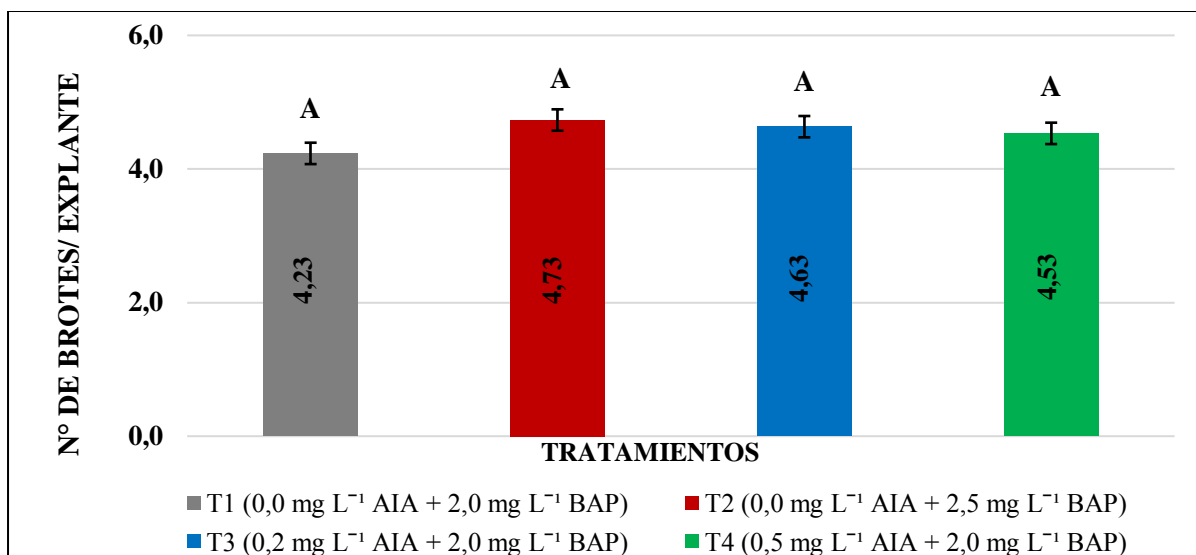
Figura 16. Número de brotes por explante de *Cinchona officinalis* L., durante 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.1.2.3. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre se registró a los 90 días de evaluación que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) indicó el mayor número de brotes (4,73) a razón de 6 brotes por explante, sin embargo, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) manifestó el menor número (4,23) (Figura 17).

La aparición de brotes no fue similar en los tratamientos ya que para los T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) y T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) se presenciaron a los 15 días de haber realizado la siembra, sin embargo, para el T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) se visualizaron a los 30 días.

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existen diferencias significativas ($p = 0,8668$) entre los tratamientos (Anexo 5).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

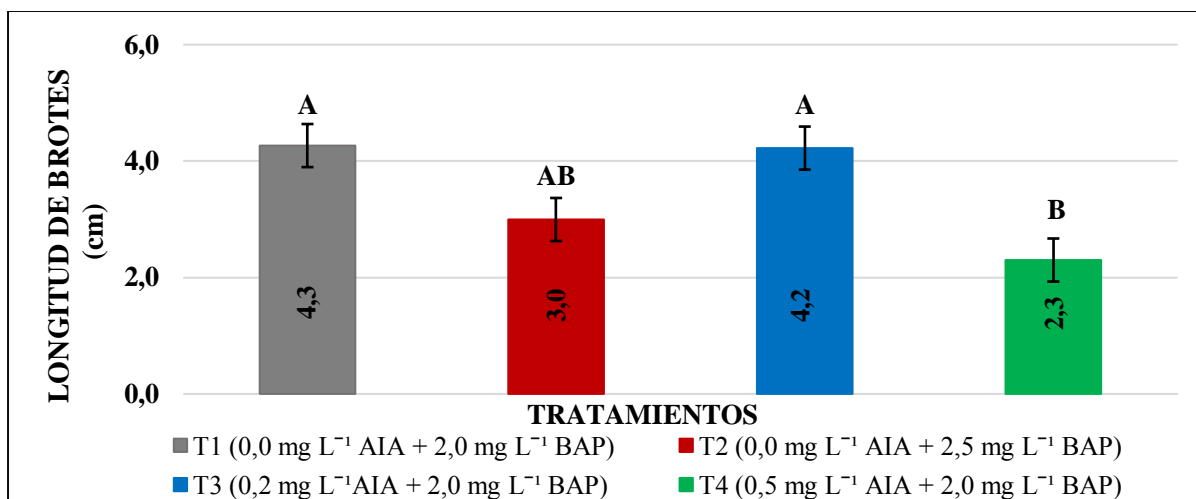
Figura 17. Número de brotes por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.1.3. Longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.3.1. Sector Zamora Huayco

A los 90 días de evaluación la longitud promedio de brotes en los explantes del sector Zamora Huayco, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor promedio (4,3 cm); mientras que el T4 mostró el menor promedio (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) (2,2 cm) (Figura 18).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que existen diferencias estadísticas significativas ($p = 0,0110^*$) entre los tratamientos (Anexo 7 y 8).



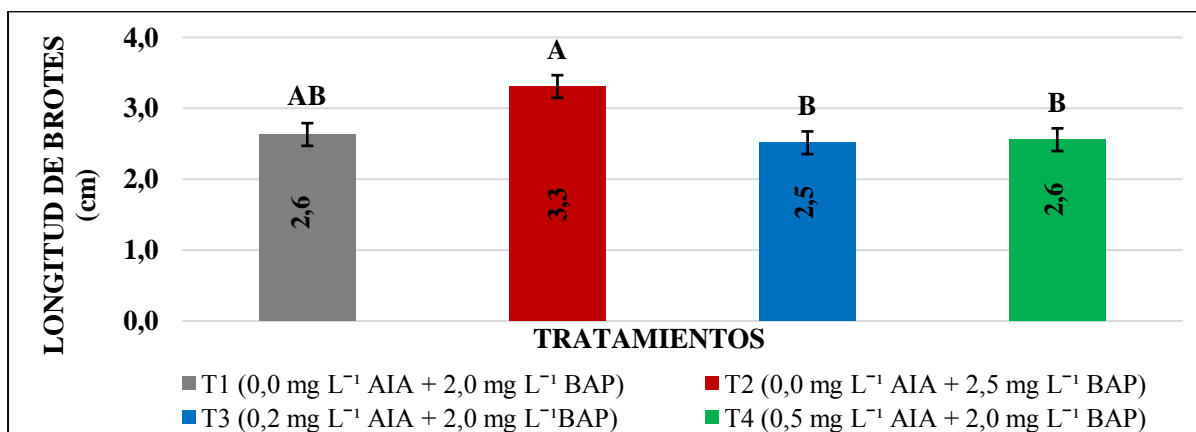
Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 18. Longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.3.2. Sector Uritusinga

A los 90 días de evaluación la longitud promedio de brotes del sector Uritusinga, el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor promedio (3,3 cm); en cambio, el T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el menor promedio (2,5 cm) (Figura 19).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5% indicó que existe diferencias estadísticas significativa ($p = 0,0257^*$) entre los tratamientos (Anexo7 y 9).



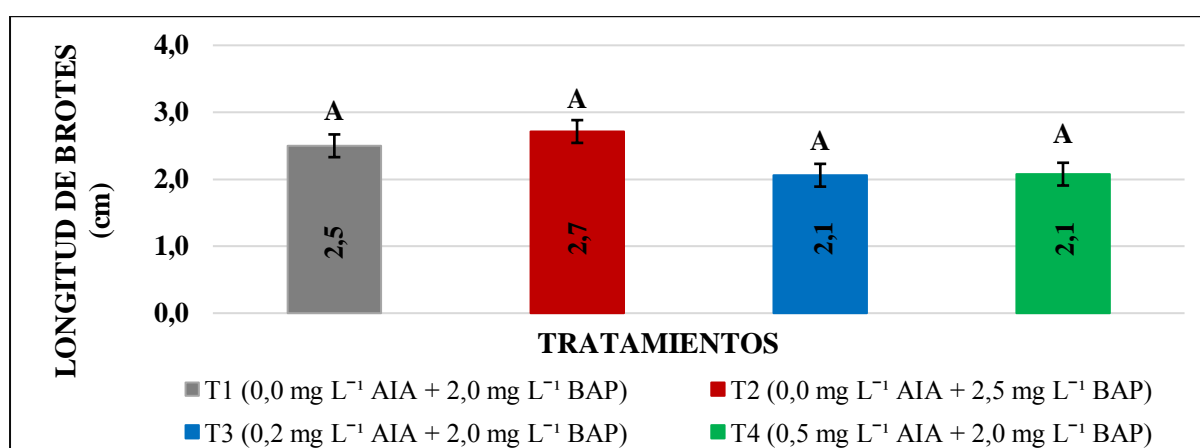
Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 19. Longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.1.3.3. Sector Selva Alegre

A los 90 días de evaluación la longitud promedio de brotes en los explantes del sector Selva Alegre, el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor promedio (2,7 cm); sin embargo, los T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) registraron el menor promedio (2,1 cm) (Figura 20).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existe diferencia estadística significativa ($p=0,0609$) entre los tratamientos (Anexo7).



Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$

Figura 20. Longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.1.4. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.4.1. Sector Zamora Huayco

A los 90 días de evaluación en el sector Zamora Huayco, el porcentaje de sobrevivencia fue superior al 93,33 % T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) en todos los tratamientos, llegando incluso al 100 % de sobrevivencia T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) (Figura 21) (Anexo10).

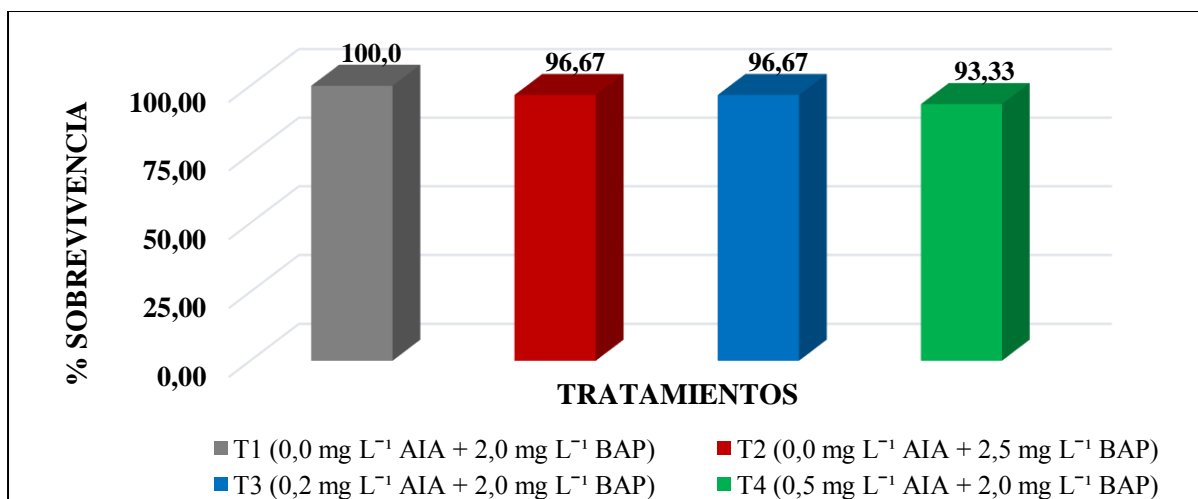


Figura 21. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.4.2. Sector Uritusinga

El sector Uritusinga a los 90 días de evaluación obtuvo un porcentaje de sobrevivencia mínimo del 90,00 % T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) mientras, que todos los demás conservaron el 100 % T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP), T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP), T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) (Figura 22) (Anexo10).

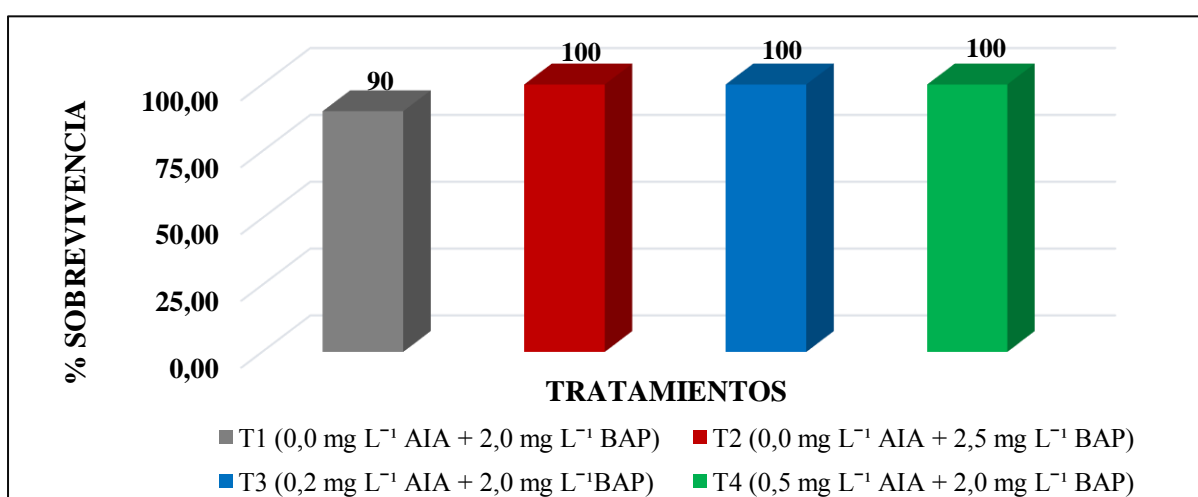


Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.1.4.3. Sector Selva Alegre

Para el sector Selva Alegre el porcentaje de sobrevivencia alcanzó valores mayores a 86,67 % T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) logrando mantenerse hasta el 100 % T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) durante el periodo de evaluación (Figura 23) (Anexo10).

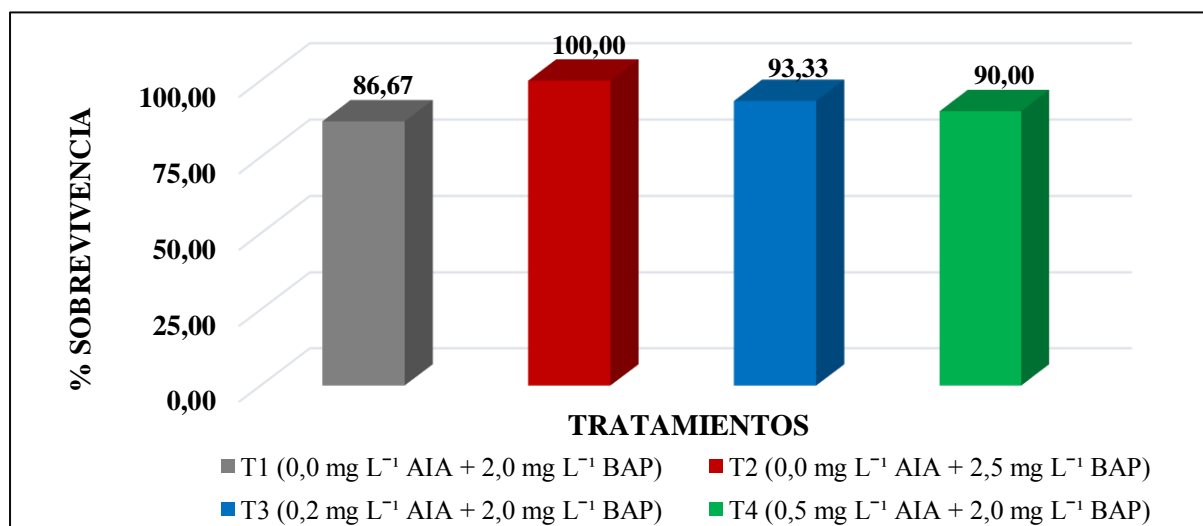


Figura 23. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.1.5. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.5.1. Sector Zamora Huayco

A los 90 días de evaluación el mayor porcentaje de contaminación que se registró en el sector Zamora Huayco fue de 13,33 % T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP). Sin embargo, en dos de los tratamientos no se presentó contaminación T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (0,2 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ AIA) (Figura 24) (Anexo11).

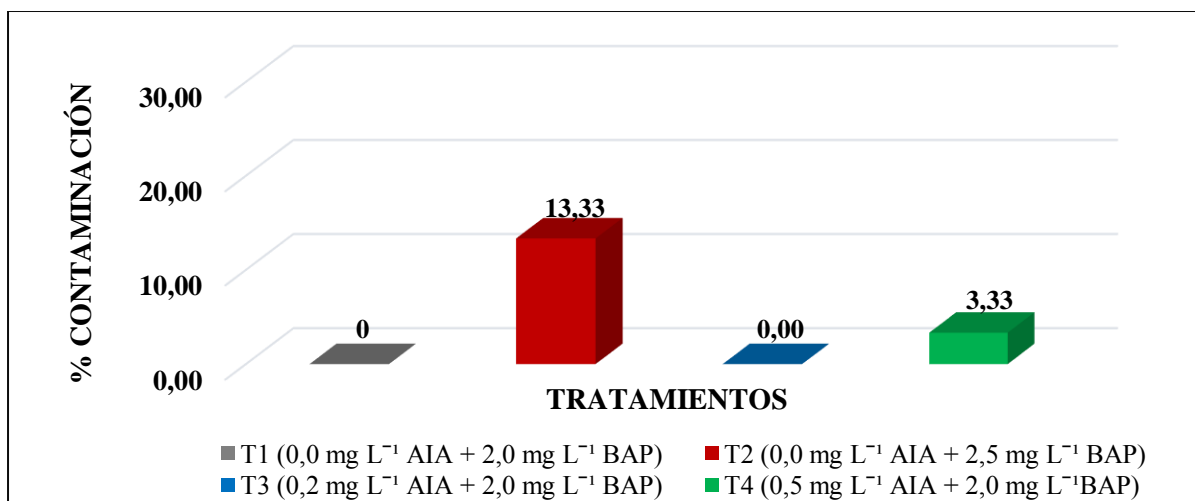


Figura 24. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.5.2. Sector Uritusinga

No se evidenció porcentaje de contaminación durante los 90 días de evaluación en ninguno de los tratamientos del sector Uritusinga (Figura 25) (Anexo11).

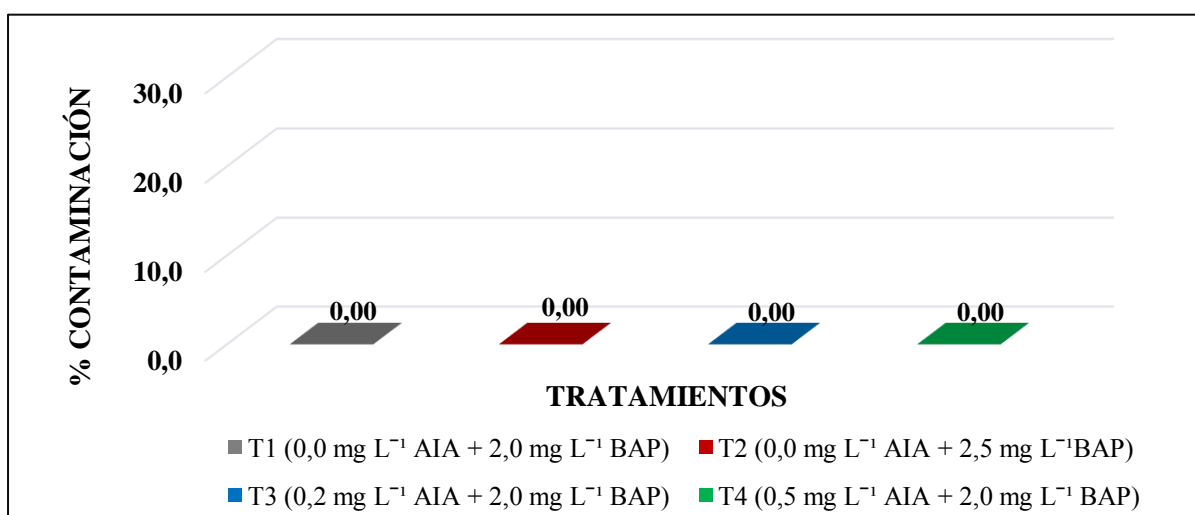


Figura 25. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.1.5.3. Sector Selva Alegre

Al culminar los 90 días de evaluación el mayor porcentaje de contaminación que se registró en el sector Selva Alegre fue de 13,33 % T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) mientras que, los demás tratamientos no presenciaron contaminación (Figura 26) (Anexo11).

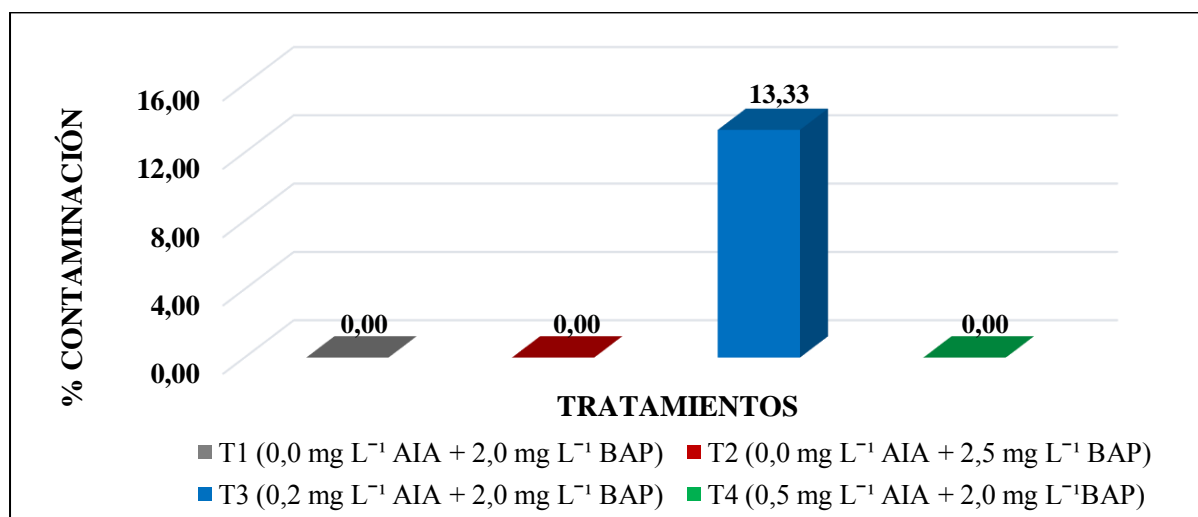


Figura 26. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.1.6. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.1.6.1. Sector Zamora Huayco.

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Zamora Huayco, a los 90 días de evaluación mostró que el T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo la menor oxidación (5,00 %) sin embargo, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó (12,22 %) siendo este el mayor valor (Figura 27) (Anexo12).

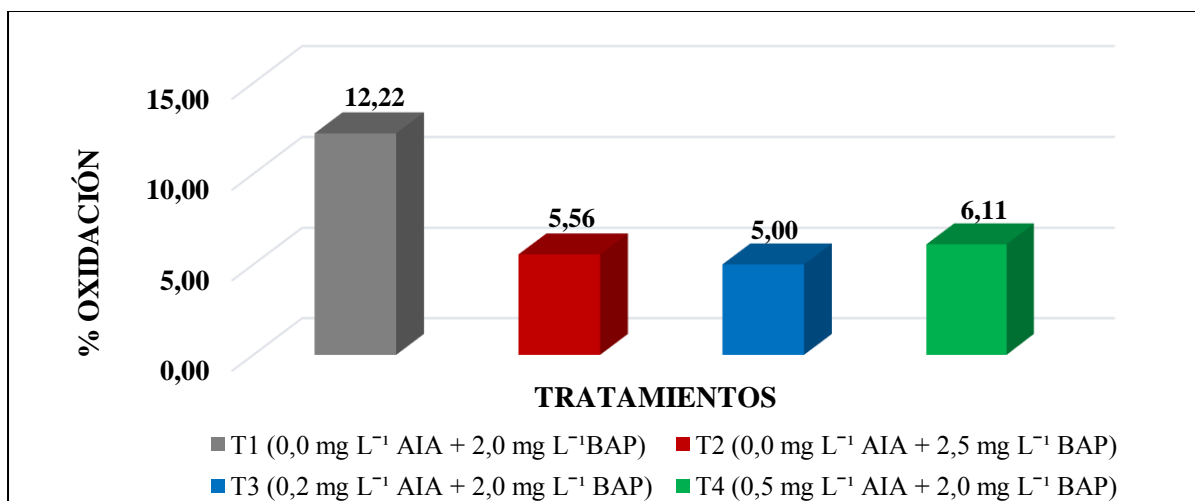


Figura 27. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.1.6.2. Sector Uritusinga

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Uritusinga, a los 90 días de evaluación registró que el T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor valor (0,00 %) por otro lado, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) mostró una oxidación de 16,11 % (Figura 28) (Anexo12 y 13).

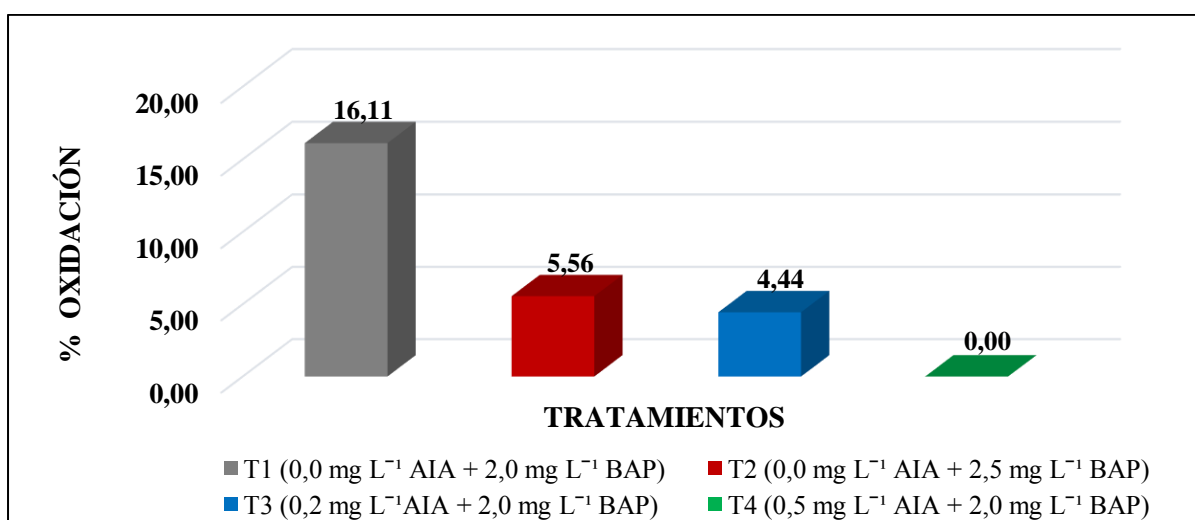


Figura 28. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.1.6.3. Sector Selva Alegre

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Selva Alegre, a los 90 días de evaluación manifestó que el T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) no presentó oxidación (0,00 %) mientras que, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó (8,33 %) (Figura 29) (Anexo12 y 14).

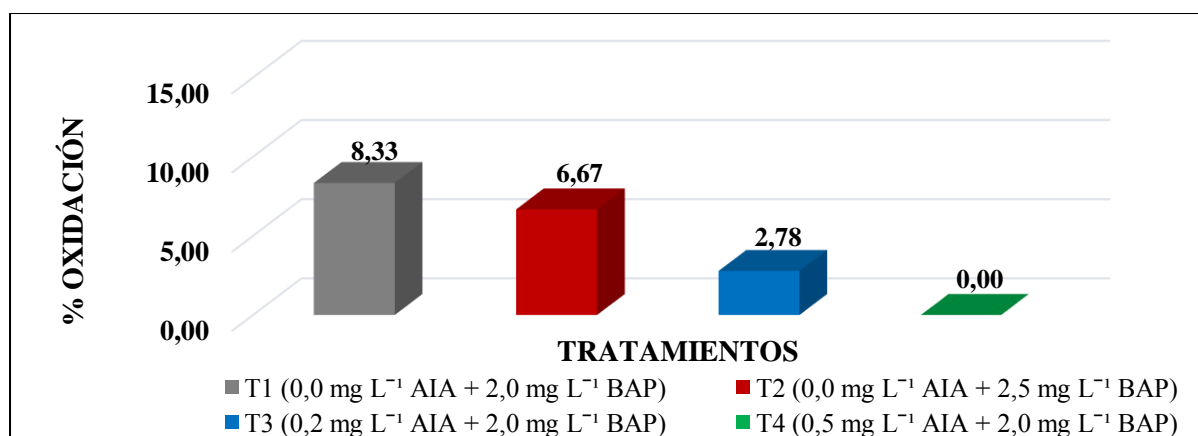


Figura 29. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

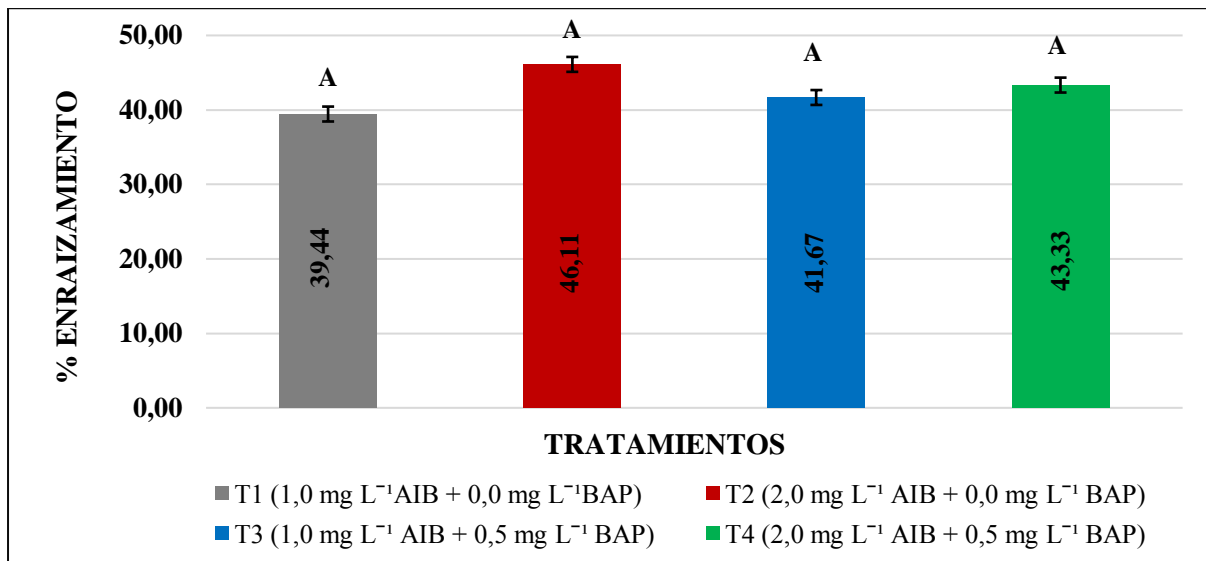
4.2. Fase de enraizamiento *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1.1. Sector Zamora Huayco

Al culminar los 90 días de evaluación, en el sector Zamora Huayco el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor porcentaje de enraizamiento (46,11); mientras que T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presentó el valor más bajo (39,44) (Figura 30 y 31).

Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 %, mostró que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,8224$) (Anexo 15).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 30. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Zamora Huayco.

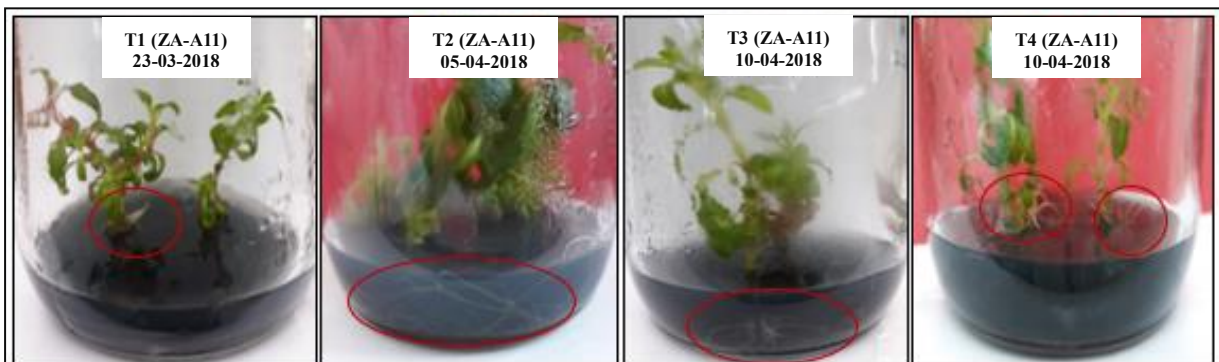


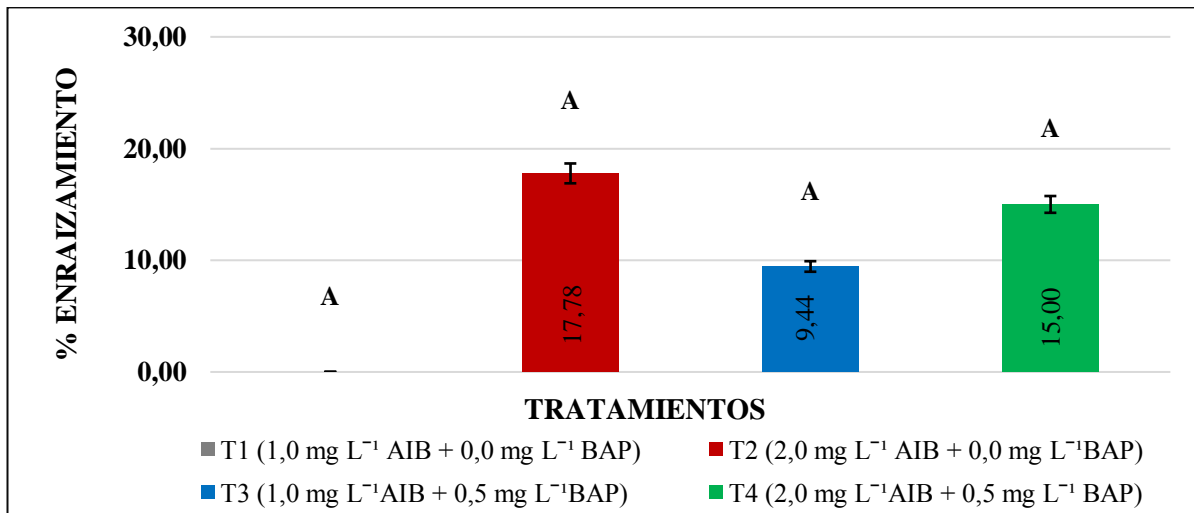
Figura 31. Enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Zamora Huayco.

4.2.1.2. Sector Uritusinga.

En el sector Uritusinga el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el mayor porcentaje de enraizamiento (17,78). Sin embargo, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) no presenció

ningún indicio de raíces, siendo este el valor más bajo (0 %) al culminar la evaluación (Figura 32 y 33).

Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 %, mostró que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,2557$) (Anexo 15).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Figura 32. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Uritusinga.

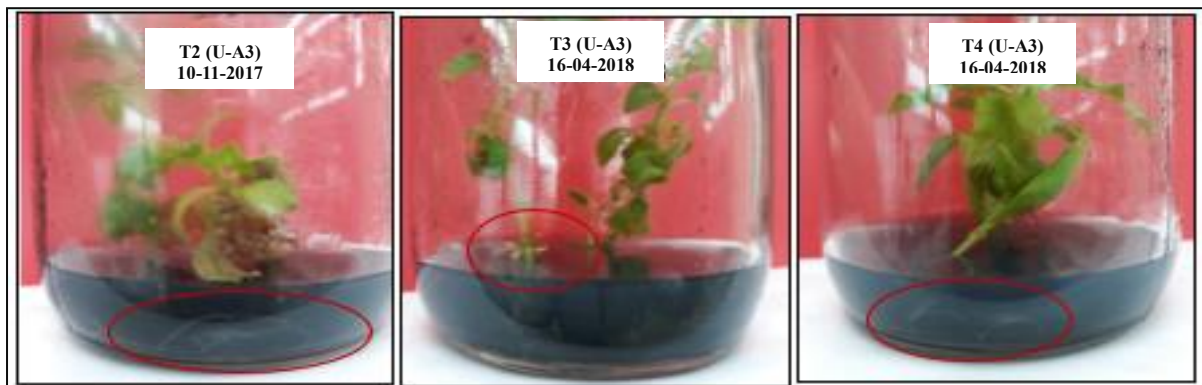


Figura 33. Enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Uritusinga.

4.2.1.3. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre el T2 (2,0 mg L⁻¹ + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ + 0,5 mg L⁻¹ BAP) determinaron el mayor porcentaje de enraizamiento (26,67) mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el valor más bajo (12,22) al culminar la evaluación (Figura 34 y 35).

Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 % mostró que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p= 0,3461$). (Anexo 15).

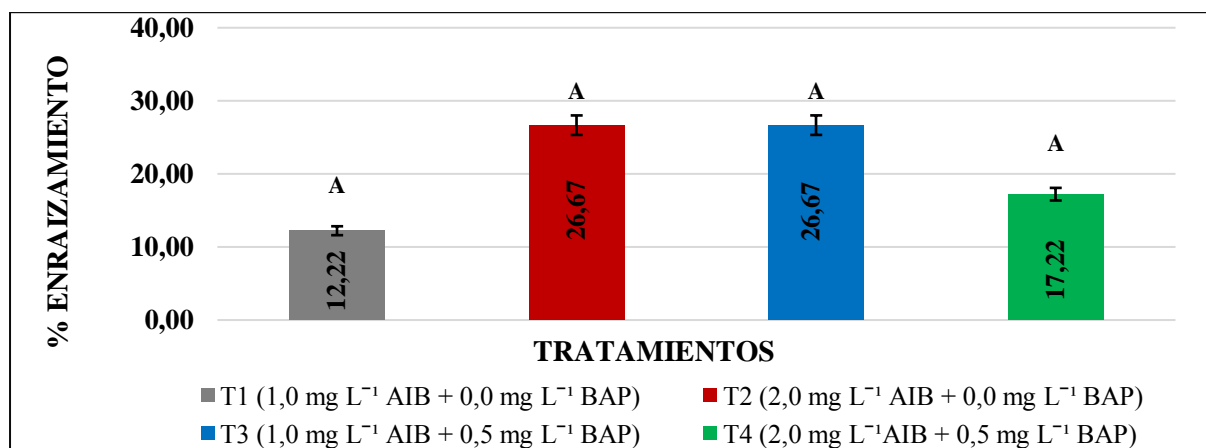


Figura 34. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L. Sector Selva Alegre.

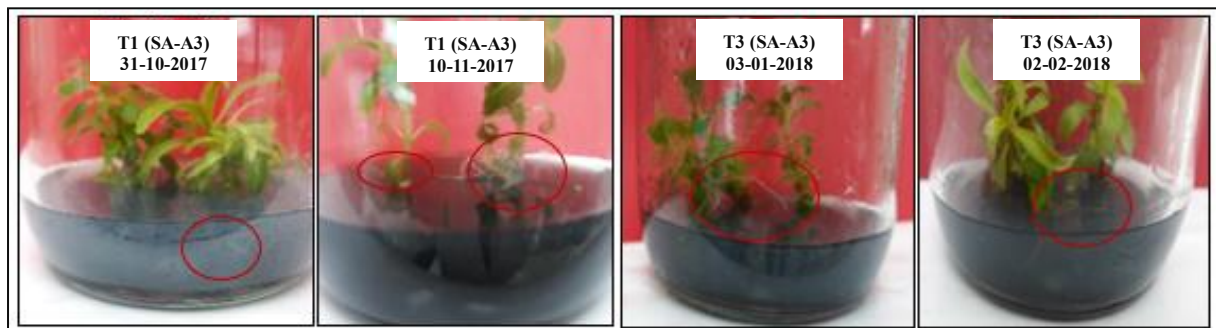


Figura 35. Enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., al finalizar los 90 días de evaluación, en cada tratamiento. Sector Selva Alegre.

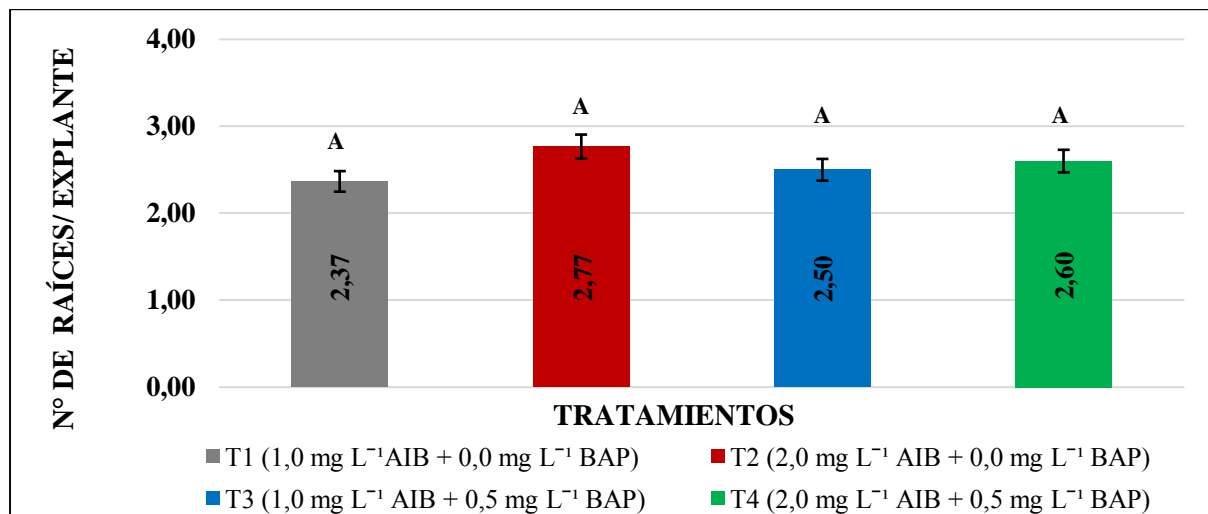
4.2.2. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L.

4.2.2.1. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco a los 90 días de evaluación, se determinó que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor número promedio de raíces (2,77) a razón de 6 raíces por explante, mientras que el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor número (2,37) (Figura 36).

Se observó indicios de raíces a los 20 días de haber realizado la siembra, en los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP), mientras que en los T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) las raíces se observaron a los 25 días.

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,8224$) entre tratamientos (Anexo 16).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

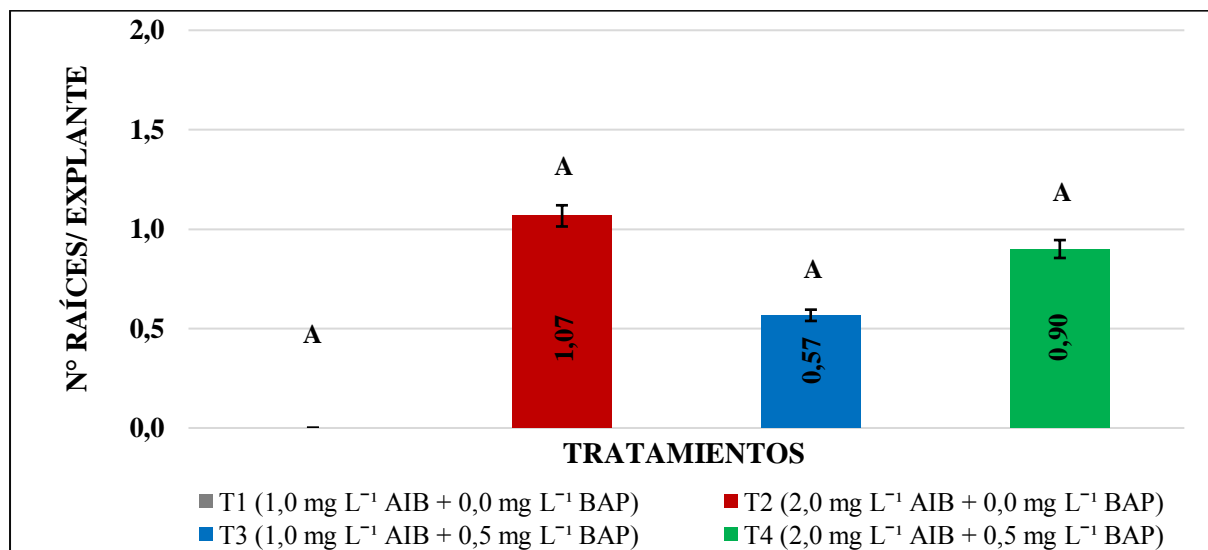
Figura 36. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.2.2. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga a los 90 días de evaluación, se determinó que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el mayor número promedio de raíces (1,07) a razón de 6 raíces por explante, en cambio, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor número (0,57) (Figura 37).

Se observó las primeras raíces a partir de los 55 días de haberse realizado la siembra en los tratamientos T2 (2,0 mg L⁻¹ + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) por el contrario, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) no registró la aparición de raíces.

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,2557$) entre tratamientos (Anexo 16).



Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$

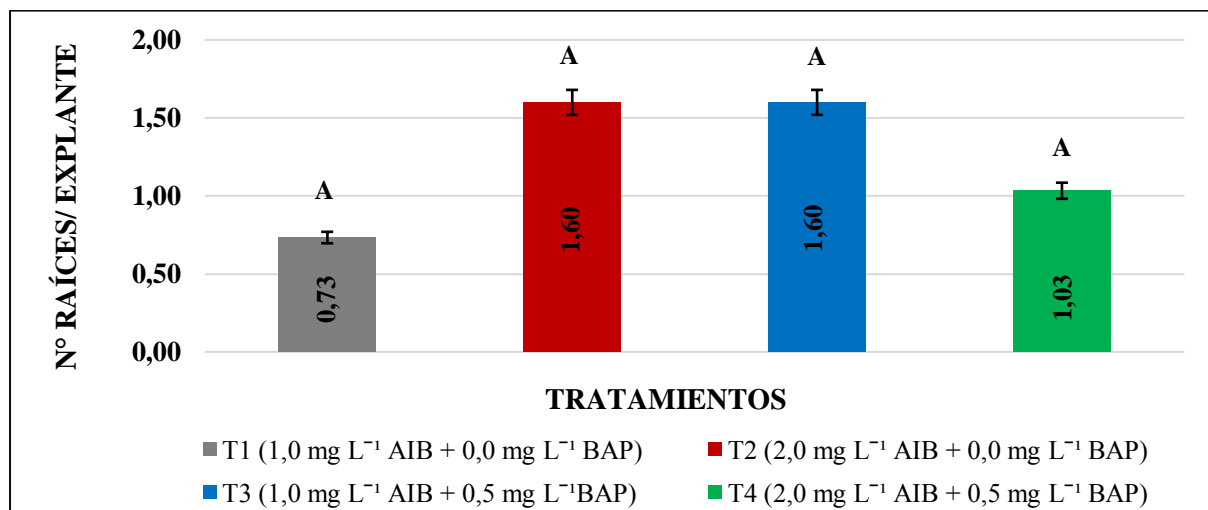
Figura 37. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.2.3. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre a los 90 días de evaluación, se determinó que los T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvieron el mayor número promedio de raíces (1,60 respectivamente) a razón de 6 raíces por explante, mientras que el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor número (0,73) (Figura 38).

Se visualizó las primeras raíces en el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) luego de 20 días de haber realizado la siembra, en el transcurso de 30 días se las apreció en el T3(1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); a los 45 días se presenció en el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 g L⁻¹ BAP) y luego de 50 días se registró en el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP).

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5 % mostró que no existe diferencias significativas ($p= 0,3461$) entre tratamientos (Anexo 16).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

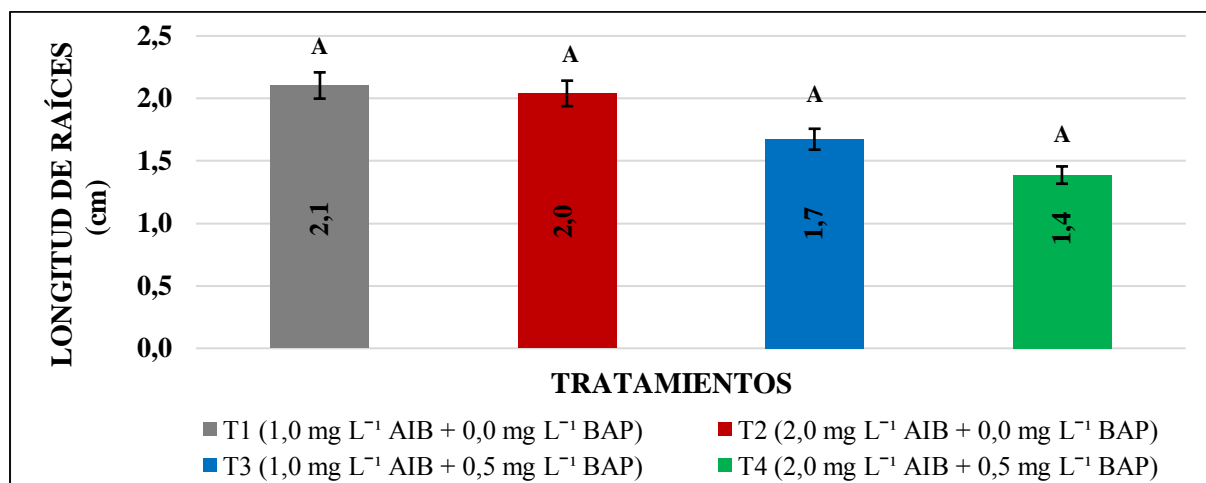
Figura 38. Número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., durante los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.2.3. Longitud de raíces en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.3.1. Sector Zamora Huayco

Luego de 90 días de evaluación la longitud promedio de las raíces en los explantes del sector Zamora Huayco indicó, que el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor promedio (2,1 cm); mientras que el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio (1,4 cm) (Figura 39).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existen diferencias estadísticas significativas ($p=0,8732$) entre los tratamientos (Anexo17).



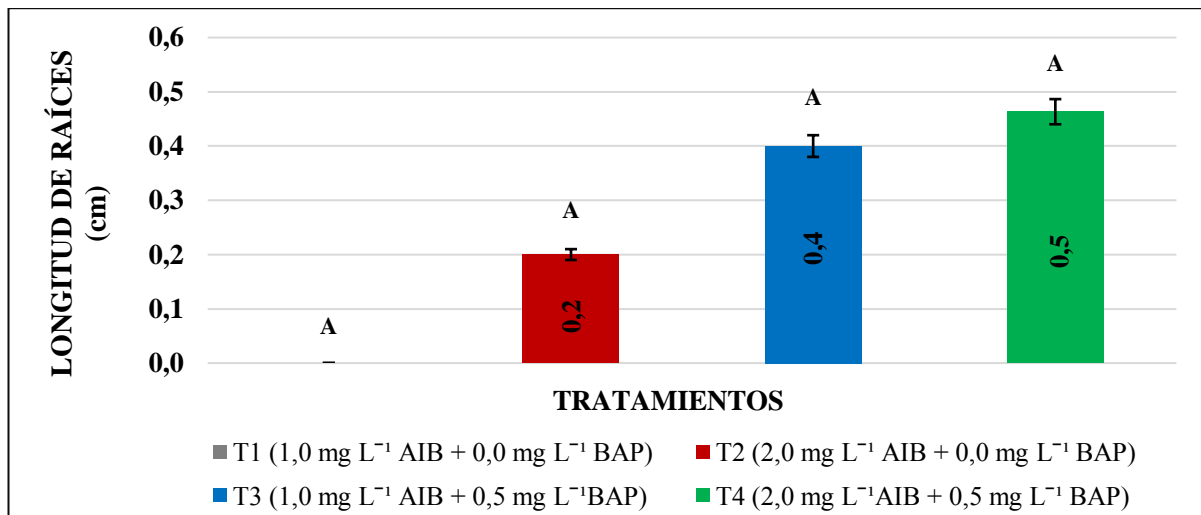
Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$

Figura 39. Longitud promedio de raíces en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.3.2. Sector Uritusinga

La longitud promedio de raíces en los explantes del sector Uritusinga registró que el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor promedio de raíces (0,5 cm); mientras que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio (0,2 cm) (Figura 40).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existen diferencias estadísticas significativas ($p= 0,8254$) entre los tratamientos (Anexo17).



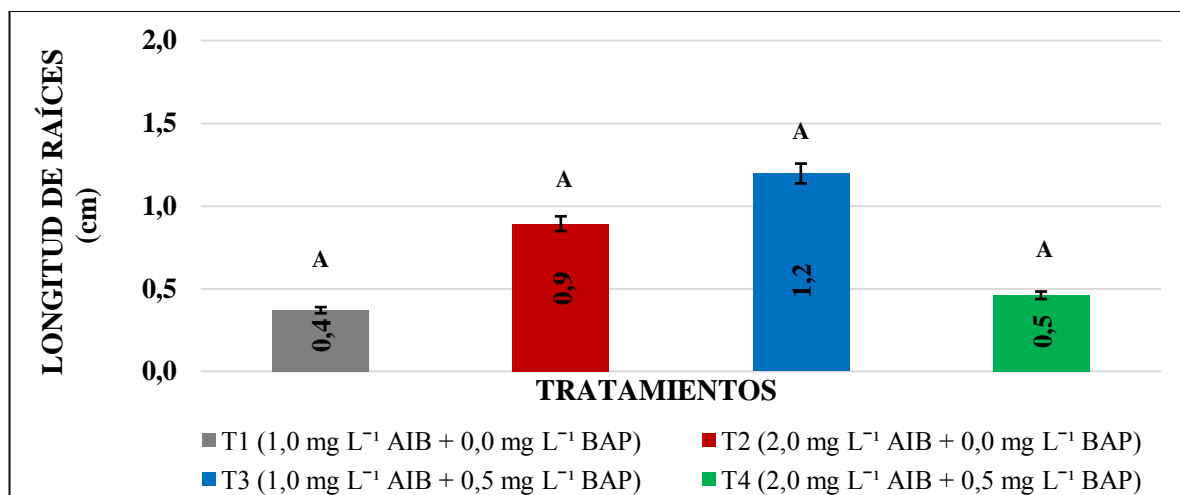
Letras distintas indican diferencias significativas $p<0,05$

Figura 40. Longitud promedio de raíces de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.3.3. Sector Selva Alegre

La longitud promedio de raíces en los explantes provenientes del sector Selva Alegre indicó que el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) presentó el mayor promedio de raíces (1,2 cm). Por otro lado, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) determinó el menor promedio (0,4 cm) (Figura 41).

El ANOVA y la prueba de Tukey de significancia al 5 % mostró que no existen diferencias estadísticas significativas ($p= 0,1992$) entre los tratamientos (Anexo 17).

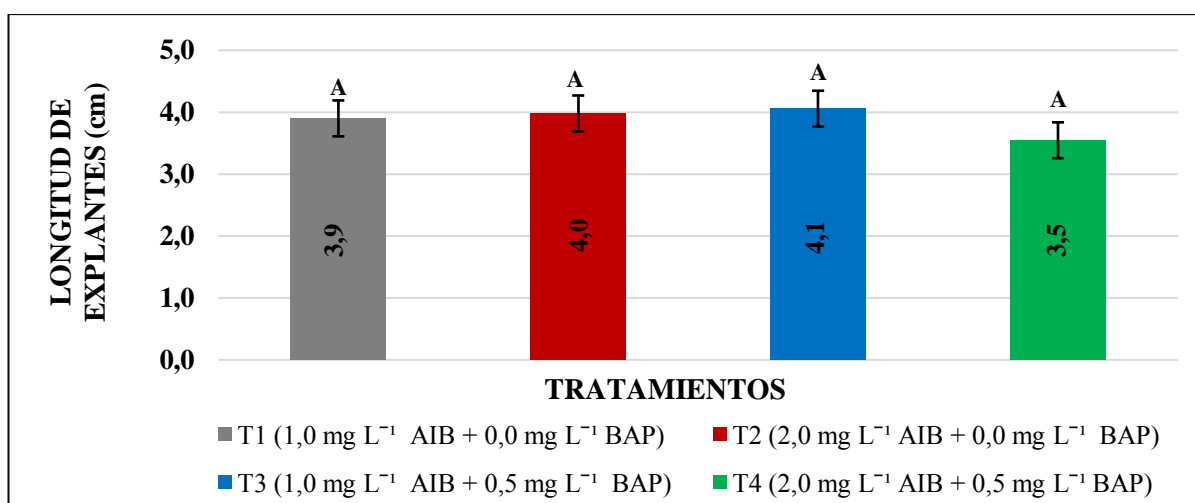


Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$
 Figura 41. Longitud promedio de raíces de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.2.4. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.4.1. Sector Zamora Huayco

Al culminar la evaluación a los 90 días el sector Zamora Huayco alcanzó la mayor longitud promedio (4,1cm) T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP). Por otra parte, el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mostró el menor promedio (3,5 cm) (Figura 42) (Anexo 18).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$
 Figura 42. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.4.2. Sector Uritusinga

El sector Uritusinga registró la mayor longitud promedio (3,7 cm) T4 (2,0 mg L⁻¹ + 0,5 mg L⁻¹ BAP). Sin embargo, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) indicó el menor promedio (2,5 cm) (Figura 43) (Anexo 18 y 19).

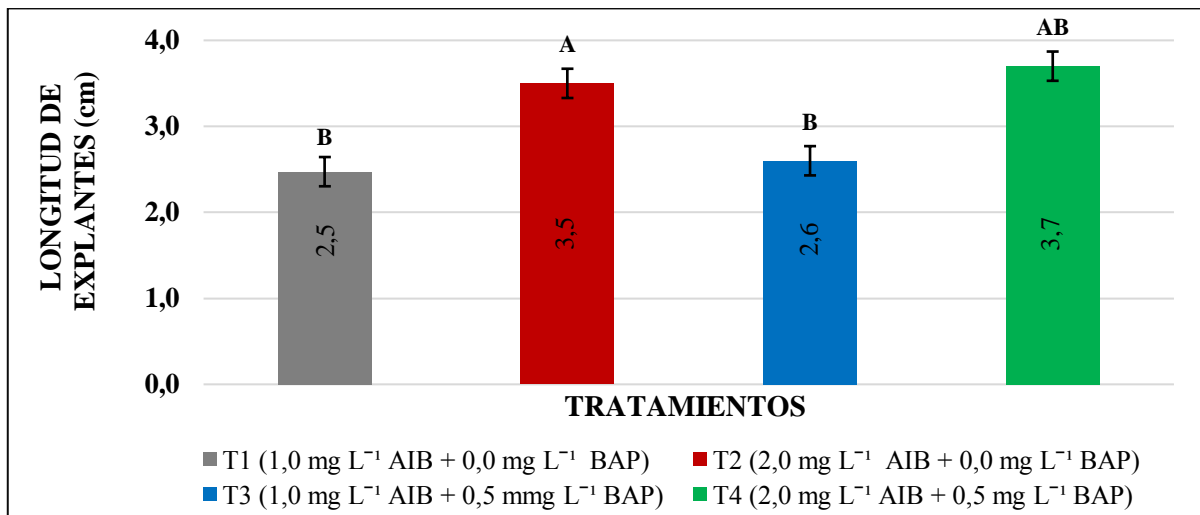


Figura 43. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.4.3. Sector Selva Alegre

El sector Selva Alegre presentó la mayor longitud promedio (3,2 cm) en los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) mientras que, el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) determinó el menor promedio (2,4 cm) (Figura 44) (Anexo 18 y 20).

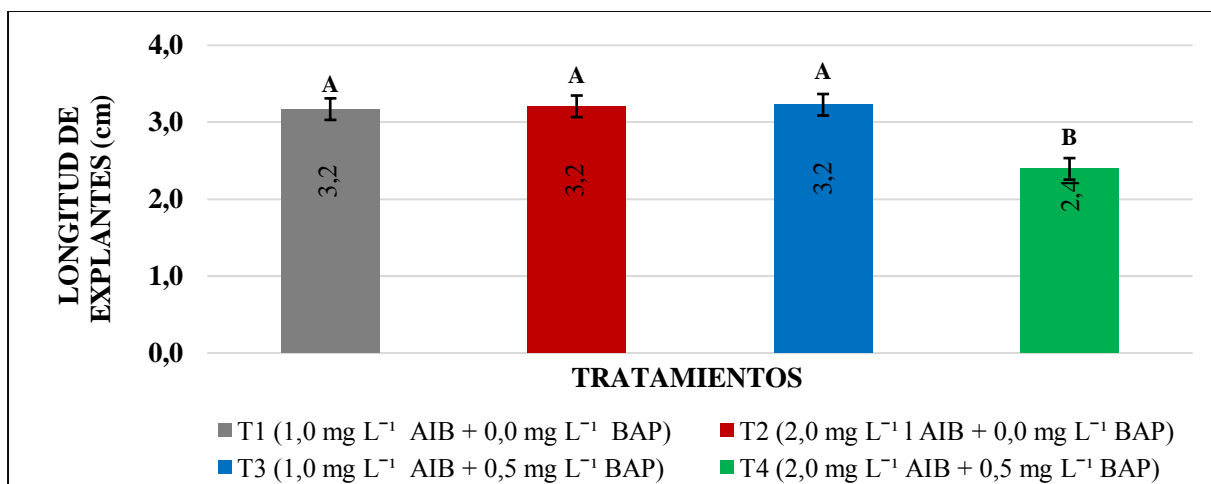


Figura 44. Longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.2.5. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.5.1. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP no presentaron contaminación). Sin embargo, la contaminación del T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 13,33 % (Figura 45) (Anexo 21).

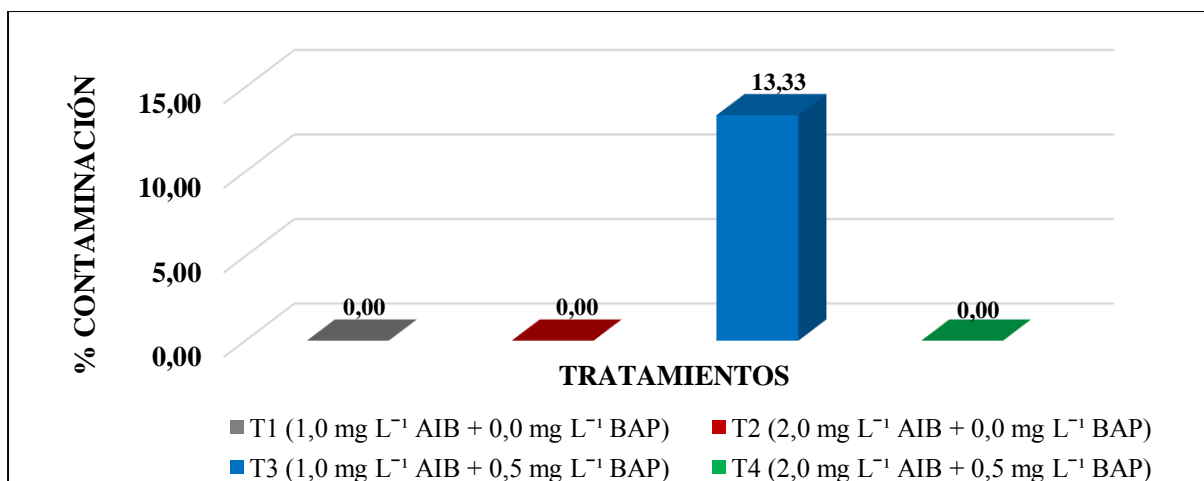


Figura 45. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.5.2. Sector Uritusinga

En el sector Uritusinga tres tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP no obtuvieron contaminación). Mientras que, la contaminación del T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue de 6,67 % (Figura 46) (Anexo 21).

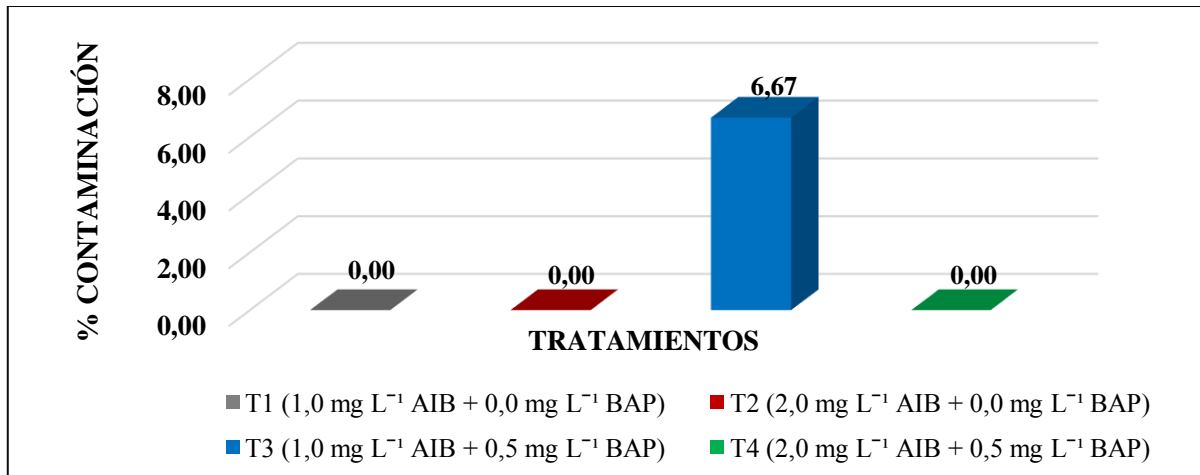


Figura 46. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.5.3. Selva Alegre

En el sector Selva Alegre los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) no presenciaron de contaminación. En cambio, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) fue contaminado 6,67 % (Figura 47) (Anexo 21).

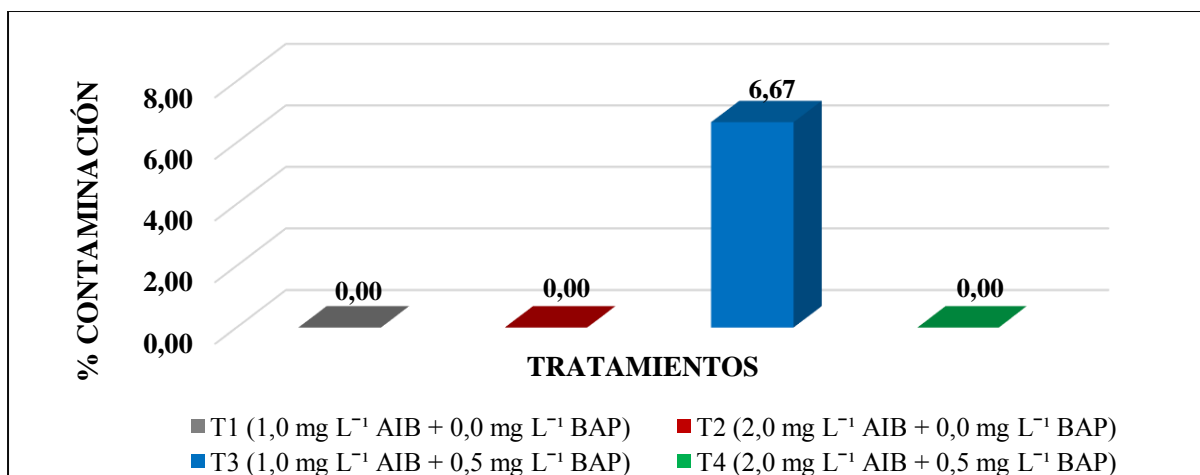


Figura 47. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.2.6. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.6.1. Sector Zamora Huayco

En el sector Zamora Huayco el porcentaje de sobrevivencia fue superior al 86,67 % T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) manteniendo el 100 % T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) (Figura 48) (Anexo 22).

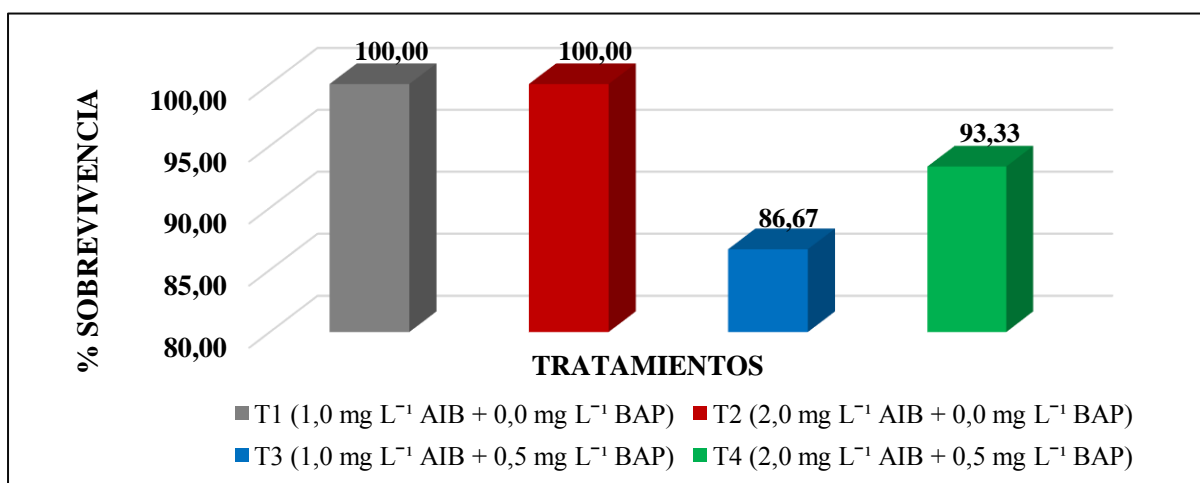


Figura 48. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.6.2. Sector Uritusinga.

En el sector Uritusinga el porcentaje de sobrevivencia fue superior al 93,33 % T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP), conservando el 100 % los T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (Figura 49) (Anexo 22).

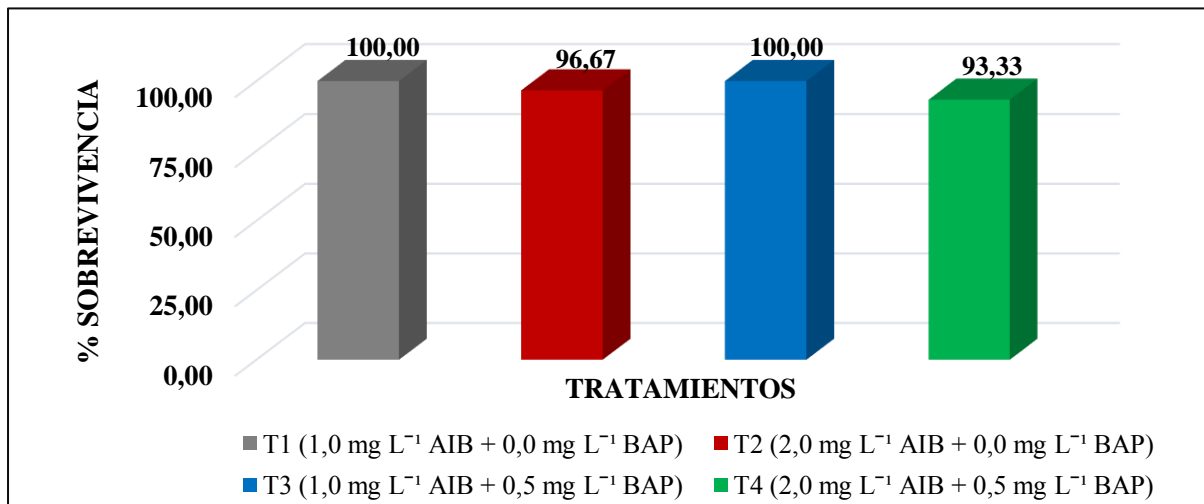


Figura 49. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.6.3. Sector Selva Alegre

En el sector Selva Alegre el porcentaje de sobrevivencia registro el valor mínimo de 96,67% T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) y T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP); y 100% de sobrevivencia en el caso del T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) (Figura 50) (Anexo 22).

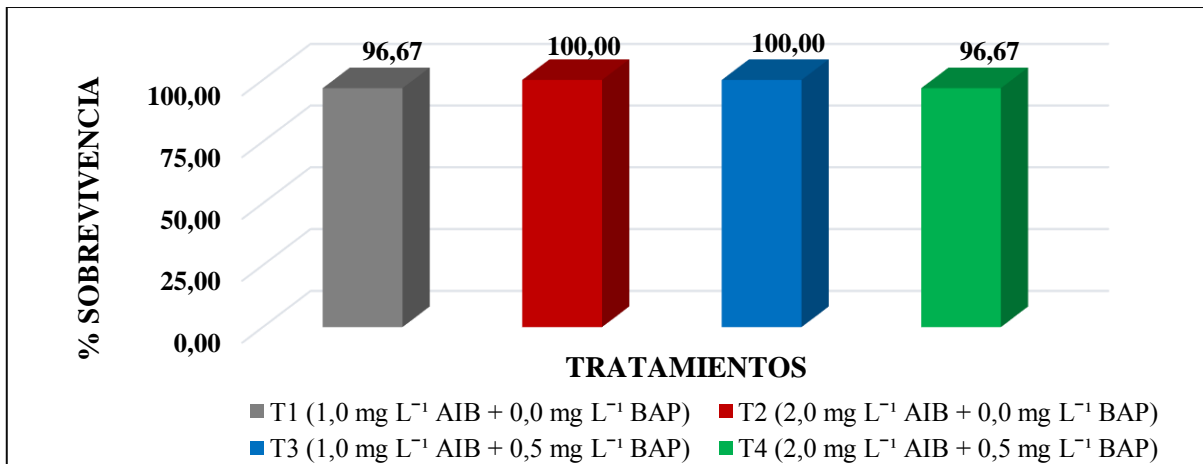


Figura 50. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.2.7. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L.

4.2.7.1. Sector Zamora Huayco.

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Zamora Huayco a los 90 días de evaluación mostró que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo la menor oxidación (0,56 %) sin embargo, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó (10,57 %) siendo este el mayor valor (Figura 51) (Anexo 23).

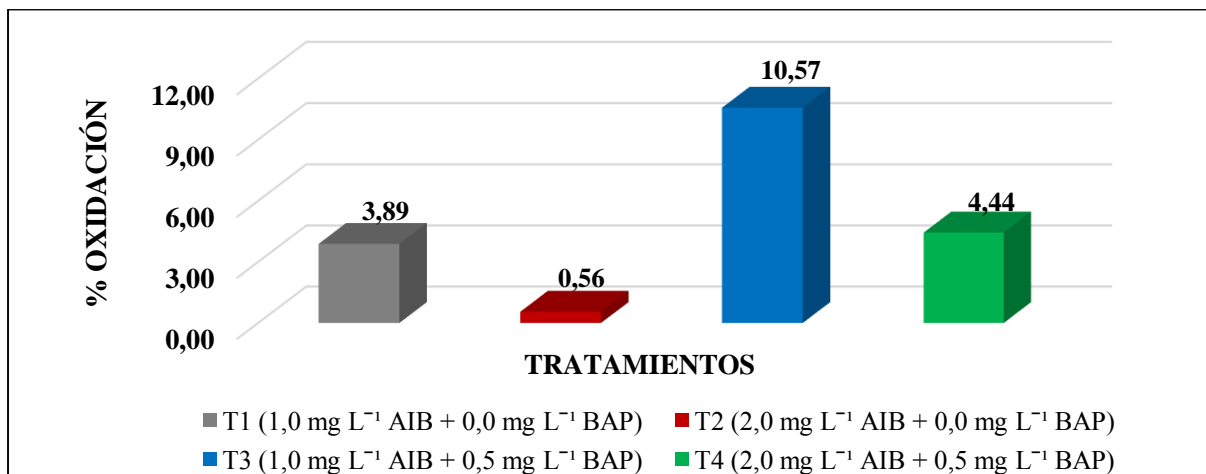


Figura 51. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Zamora Huayco.

4.2.7.2. Sector Uritusinga

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Uritusinga a los 90 días de evaluación registró que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el menor valor (2,22 %) por otro lado, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró una oxidación de 4,44 % (Figura 52) (Anexo 23).

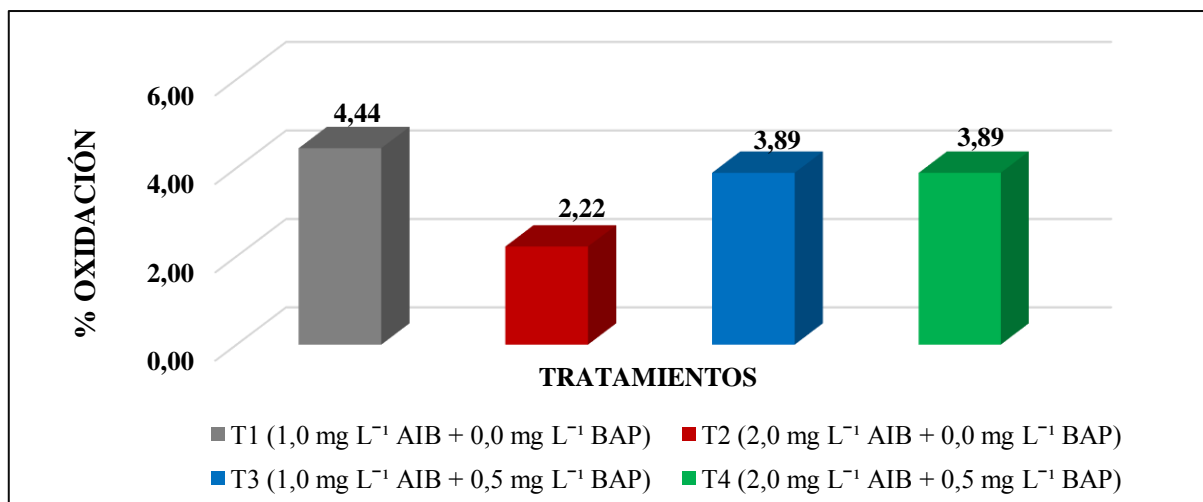


Figura 52. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Uritusinga.

4.2.7.3. Sector Selva Alegre

El porcentaje de oxidación fenólica en los explantes provenientes del sector Selva Alegre a los 90 días de evaluación mostró que el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo una oxidación de 2,78 % mientras que, el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó (3,89%) (Figura 53) (Anexo 23).

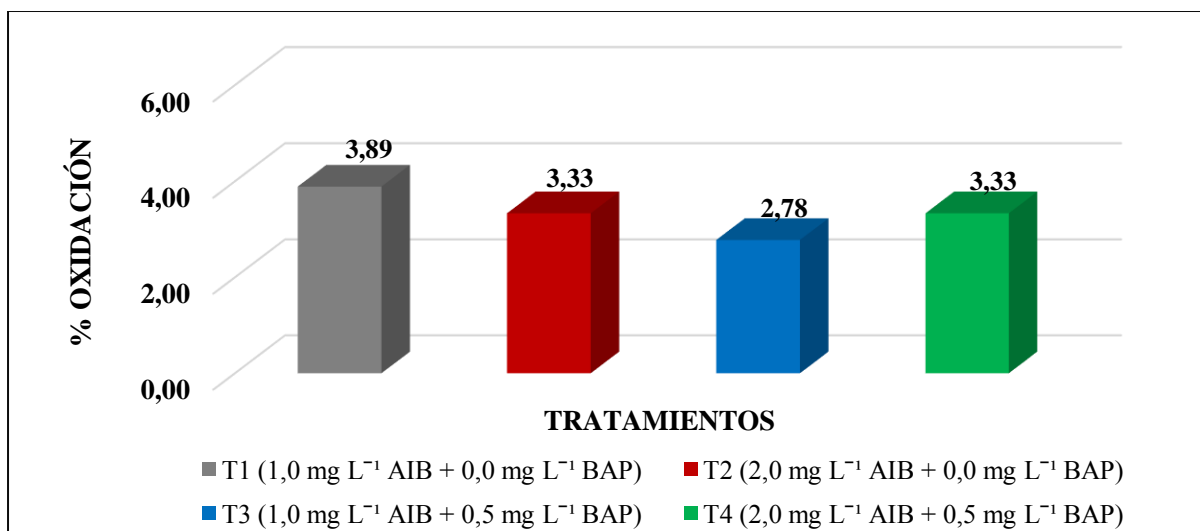


Figura 53. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *Cinchona officinalis* L., a los 90 días de evaluación. Sector Selva Alegre.

4.3. Difusión de la información a actores sociales interesados.

La socialización de los resultados del proyecto de tesis se realizó al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en el cual se manifestó los resultados obtenidos durante la elaboración del mismo, se aportó con algunas recomendaciones para futuras investigaciones para la micropropagación de la especie (Figura 54).

Además, se elaboró un tríptico divulgativo para dar a conocer los resultados de la investigación (Anexo 24).

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



Figura 54. Difusión de resultados de tesis al equipo técnico y docente del Laboratorio de Micropropagación Vegetal - UNL.

5. DISCUSIÓN

5.1. Fase de multiplicación o brotación *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L. provenientes de los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre

En los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre, el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor porcentaje de brotación (97,78; 93,33 y 78,89 respectivamente) y mayor número de brotes por explante (5,87; 5,60 y 4,73), demostrando que esta concentración actúa de manera positiva al obtener la mayor cantidad de brotes en los diferentes sectores. Los resultados se asemejan a los obtenidos por Chamba (2017), quien manifestó que al suplementar el medio con 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP resultó ser la combinación más efectiva en cuanto a la formación de brotes, obteniendo resultados de 6,06 brotes por explante en promedio.

Estudios realizados por Lima *et al.* (2016) muestran que aplicando auxinas (ANA) y citoquininas (BAP) para la inducción de brotes en *Cinchona officinalis* L, con una concentración de 0,2 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP obtuvo los mejores resultados con un número promedio de 4,73 brotes. Pérez (1998) menciona que los reguladores de crecimiento especialmente el BAP, son necesarios para la proliferación y elongación de brotes pues, una pequeña cantidad de citocinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento para inducir el crecimiento y desarrollo *in vitro* de brotes y yemas. Por tal razón, más del 85 % de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen algún suplemento de citoquinina.

En cuanto a la longitud promedio de brotes, el sector Zamora Huayco alcanzó el mayor promedio (4,3 cm) con el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP). Sin embargo, los sectores Uritusinga y Selva Alegre muestran que el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvieron

los promedios más altos (3,3 y 2,7 cm), estos resultados determinan que, para obtener una mejor longitud de brote se necesita una mayor cantidad de citoquinina. Así, Chamba (2017) demostró que la concentración hormonal más efectiva para alcanzar mejores resultados en esta variable fue 1,5 mg L⁻¹ ANA + 3,0 mg L⁻¹ BAP, obteniendo 1,71 cm; resultados que se asemejan con los logrados por Lima *et al.* (2016), quien al utilizar (0,2 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP) consiguió un valor de 0,83 cm de altura, durante su periodo de evaluación. De este modo, se confirma que el efecto de la concentración auxinas y citoquininas regula el crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales y de los cultivos de órganos (Endress, 1994; Pérez *et al.*, 1999; Thangadurai, 2007; George *et al.*, 2008). Además, el éxito del crecimiento, desarrollo y respuesta morfogénica puede variar por la estructura genética y tipo de explante, el ambiente circundante y la composición del medio de cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013; Endress, 1994).

La sobrevivencia de explantes en los tratamientos T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 Mg L⁻¹ BAP), T3 (0,2 mg/l AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (0,5 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzaron un porcentaje satisfactorio del 100% en el sector Uritusinga, resultados similares se dieron en los sectores Zamora Huayco T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) y Selva Alegre T2. Sin embargo, se presenció mortalidad de algunos explantes en los tratamientos (T1: 90%; T4: 93,33 y T1: 86,67 % respectivamente para cada sector), estos resultados muestran que trabajar con vitroplantas y bajo condiciones de asepsia obtienen mínima pérdida de material vegetal y máxima rentabilidad de sobrevivencia. Corroborando lo dicho por Bhojwani y Dantu (2013); George *et al.* (2008); Pérez *et al.* (1999) quienes hacen referencia que el éxito de esta etapa depende de la correcta elección del explante, el procedimiento adecuado de esterilización y la prevención de cualquier reacción de hipersensibilidad de los explantes, generalmente el establecimiento de los tejidos es muy bajo debido a los problemas de adaptación pero esta etapa

se considera satisfactoria si un número adecuado de explantes han sobrevivido sin contaminación y continúan creciendo.

El porcentaje de contaminación en los tratamientos del sector Uritusinga fue de 0,0 %, mínimo con el T3 (3,33%) en el sector Selva Alegre, mientras que los explantes de los tratamientos T4 y T2 presentaron un porcentaje de 3,33 y 13,33 % para el sector Zamora Huayco. Esto se debe a las condiciones de asepsia al que fue sometido el material vegetal, sin embargo, ciertos explantes se vieron afectados por agentes externos (hongos y bacterias) perjudicando la supervivencia de los mismos. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Lima *et al.* (2016) quien utilizó vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., para la evaluación de brotamiento, en cuyo ensayo obtuvo una contaminación de 6,67 % con (0,2 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP) determinando que el causante de las mismas era ocasionado por el ataque de hongos y bacterias.

George (1993) indica que la contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, ya que produce cuantiosas pérdidas de material vegetal. Esta puede originarse por microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos); o por microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio, de los cuales; los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras (Leifert *et al.*, 1994), denominados "vitropatógenos".

En cuanto al porcentaje de oxidación fenólica el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,0 mg L⁻¹ BAP) mostró indicios de despigmentación y ennegrecimiento tanto en los brotes como en el medio de cultivo en los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre sin embargo, los valores más elevados fueron de 16,11; 12,22 y 8,33 % respectivamente. En el transcurso de la evaluación se evidenció que la pérdida de material vegetal se dio a medida que el nivel de oxidación

aumentó, llegando al punto de provocar su muerte. Hernández y González (2010) indican que el fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas, afectando el crecimiento del explante perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir.

5.2. Establecimiento del nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Las auxinas contribuyen a la elongación celular, es decir en la iniciación y crecimiento de raíces en condiciones *in vitro*, su aplicación en la fase de enraizamiento es de probada conveniencia, aunque existen especies que producen un buen sistema radicular en ausencia de estas (Suárez *et al.*, 2006). Además, los sistemas de enraizamiento como etapa final en un proceso de micropropagación permiten obtener plántulas en óptimas condiciones para su trasplante y aclimatación (Zurita *et al.*, 2014)

La interacción de diferentes concentraciones hormonales auxinas (AIB) y citoquininas (BAP) en explantes provenientes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., tuvo un efecto poco satisfactorio al no obtener un porcentaje de enraizamiento elevado. Sin embargo, en el sector Zamora Huayco el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo un porcentaje intermedio con 46,11%, a razón de haber alcanzado 2,77 raíces promedio, siendo este el más sobresaliente. En el sector Uritusinga de igual manera el T2 mostró la presencia de raíces, aunque en porcentajes más bajos (17,78 %) puesto que obtuvo 1,07 raíces, y en el sector Selva Alegre el T2 y T3 presenciaron igual valor con 26,67 %, esto al haber presentado 1,60 raíces.

Estos resultados se corroboran al estudio realizado por Chamba (2017) en donde, aplicó la concentración hormonal AIB (1,0 mg L⁻¹) y observó la formación de raíces por organogénesis

directa, con un promedio de enraizamiento de 0,75 raíces por explante. Asimismo, en *Cedrela odorata*, con la interacción (ANA 0,05 mg L⁻¹ + AIA 0,05 mg L⁻¹) obtuvieron un promedio de 6,9 raíces formadas por explante. Igualmente, Conde (2015) evidenció en *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., que la concentración (1,5 mg L⁻¹ AIA) permitió la formación del mayor número de raíces/explante con 23,90. De esta manera, se determinó que es importante la utilización de mayores concentraciones de la hormona auxina para el crecimiento y desarrollo de raíces (Castillo *et al.*, 2011).

En el caso de longitud promedio de raíces, el sector Zamora Huayco alcanzó el mayor promedio (2,1 cm) con el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP). Sin embargo, los sectores Selva Alegre y Uritusinga mostraron una longitud promedio de 1,23 cm con el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) y 0,47 cm con el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) respectivamente, estos resultados determinan que, para obtener una mejor longitud de raíces, es necesario una mayor cantidad de auxinas. Así, Chamba (2017) con la concentración (AIB 1,0 mg/l) obtuvo un tamaño promedio de 7,4 cm. De igual manera, Conde (2015) en *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., con la concentración (1,5 mg L⁻¹ AIA) obtuvo una longitud promedio de 2,41 cm, siendo esta la más alta.

Al hablar sobre el porcentaje de contaminación, los tratamientos T1 (1,0 mg L⁻¹ de AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP), T3 (1,0 mg L⁻¹ de AIB + 0,5 mg L⁻¹) y T4 (2,0 mg L⁻¹ de AIB + 0,5 mg L⁻¹ de BAP) de los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre obtuvieron 0,0 %. Sin embargo, los explantes del T2 (2,0 mg L⁻¹ de AIB + 0,0 mg L⁻¹ de BAP) se vieron afectados en los tres sectores con 13,33 % para Zamora Huayco y 6,67 % para los sectores restantes. Estos resultados evidencian que las condiciones de asepsia al que se sometido el material vegetal tuvo una respuesta positiva al obtener una mínima contaminación y que el porcentaje

afectado fue atacado por agentes patógenos externos. Chamba (2017) en su investigación demostró que, la concentración (0,1 mg L⁻¹ ANA) obtuvo el mayor valor de contaminación (20,83 %) frente a las a las concentraciones (0,5 mg L⁻¹ AIB) y (0,1 mg L⁻¹ AIB), que no presentaron ningún ataque por hongos y bacterias. Lo cual corrobora Guerrero y Ramírez (2000) quienes aseguran que, la contaminación *in vitro*, puede estar asociada por la disminución del pH durante la esterilización del medio, favoreciendo de esta manera al desarrollo de hongos y al ataque de bacterias, también aducen que esto se debe a la influencia de las bajas concentraciones de hipoclorito de sodio y la mala manipulación del operador.

La sobrevivencia de explantes en esta fase, muestra que el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) presenció mínima pérdida de explantes en el sector Zamora Huayco obteniendo un porcentaje de 86,87 %; por otro lado, el sector Uritusinga obtuvo 93,33 % con el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP), y se evidenció con los tratamientos T1 y T4 un porcentaje mínimo de 96,67% en el sector Selva Alegre, estos resultados muestran que trabajar con vitroplantas y bajo condiciones de asepsia obtuvieron mínima pérdida de material vegetal y máxima rentabilidad de sobrevivencia. Según Thomas y Ravindra (1997) anuncian que para mantener la sobrevivencia del material vegetal deben considerar ciertos factores respecto al tipo de explante: grado de desarrollo, incidencia de luz, longitud y grosor del ápice, daños en el explante, número de pecíolos en contacto con el medio de cultivo y edad fisiológica adecuada para la toma de material (ápices semi maduros).

Al finalizar la evaluación, se presenció un bajo porcentaje de oxidación fenólica en los explantes de *Cinchona officinalis*, siendo el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ BAP) el más afectado con 10,57 % en el sector Zamora Huayco; mientras que con el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB + 0,0 mg L⁻¹ BAP) los sectores Uritusinga y Selva Alegre obtuvieron porcentajes de (4,44 y 3,89 % respectivamente). La despigmentación que se presentó no fue significativa debido a las

condiciones de asepsia a las que fueron sometidos los explantes así, como por la utilización de carbón activado que se aplicó al medio de cultivo, también, se observó que mientras menos oxidación se presente en los explantes existirá mayor sobrevivencia. Pues Azofeifa (2007) manifiesta que se puede evitar un problema y obtener bajo porcentaje de oxidación con el uso de antioxidantes como el carbón activado. Gray y Trigiano (2000) indican que la presencia de esta variable puede ser producto de la combinación de procesos y condiciones de cultivos óptimos (tiempo de desinfección, eliminación de compuestos inhibidores de crecimiento y aplicación de solución antioxidante) determinados durante la estandarización del procedimiento de desinfección.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Para la fase de brotación el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) se considera la mejor concentración en la multiplicación *in vitro* pues, consiguió resultados positivos y viables en los tres sectores; siendo Zamora Huayco el que mayor porcentaje alcanzó con 97,78 %; en Uritusinga con 93,33% y en el caso de Selva Alegre con un valor intermedio de 78,88 %.
- ✓ Con respecto a la longitud de brotes, el T1 (0,0 mg L⁻¹ AIA y 2,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó el mayor promedio con 4,27 cm en el sector Zamora Huayco; en relación al T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA y 2,5 mg L⁻¹ BAP) que alcanzó 3,3 y 2,7 cm en los sectores Uritusinga y Selva Alegre.
- ✓ Para la fase de enraizamiento *in vitro* el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) alcanzó los porcentajes más elevados en los tres sectores, sin embargo, se obtuvo resultados intermedios en el sector Zamora Huayco con 46,11 %; valores más bajos en Uritusinga con 17,78 % y Selva Alegre con 26,67 % e igual valor con el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,5 mg L⁻¹ BAP).
- ✓ En cuanto a la longitud de raíces el T1 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo 2,1 cm en el sector Zamora Huayco, el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP) alcanzó 1,2 cm en Selva Alegre, a diferencia de Uritusinga que registró 0,5 cm en el T4 (2,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP).
- ✓ El porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos utilizados fue alto (100 %), pese a ello, se registró valores de 93,33; 86,67; y 90,00 % en la fase de multiplicación; y, de 86,67; 93,33 y 96,67 %, en la fase de enraizamiento, en los sectores Zamora Huayco, Selva Alegre y Uritusinga, respectivamente.
- ✓ El porcentaje de contaminación fue bajo (0,0 %); sin embargo, en la fase de multiplicación se presentó un porcentaje de 13,33 % en el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA+ 2,5 mg L⁻¹ BAP) sector Zamora Huayco; y en el T3 (0,2 mg L⁻¹ AIA+ 2,0 mg L⁻¹ BAP) sector Selva Alegre; así

mismo, en la fase de enraizamiento se registró el mismo porcentaje en el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB y 0,5 mg L⁻¹ BAP) sector Zamora Huayco.

- ✓ El porcentaje de oxidación fenólica fue mínimo (0,0 %); sin embargo, en la fase de multiplicación alcanzó el 12,22 % y en la de enraizamiento el 10,57 % de oxidación fenólica.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ En la fase de brotación o multiplicación de explantes de *Cinchona officinalis* L, se debe combinar concentraciones que contengan mayores dosis de citoquininas (BAP) que auxinas (AIA) para un mejor resultado, pues para esta fase se obtuvo alta viabilidad con el uso de mayor concentración Citoquinina.
- ✓ En la fase de enraizamiento de explantes de *Cinchona officinalis* L, se debe combinar nuevas concentraciones de auxinas y citoquininas para inducir el crecimiento y desarrollo de raíces, pues para esta fase se obtuvo poca viabilidad con el uso de las concentraciones establecidas.
- ✓ Considerar que las fuentes semilleras para la obtención de material vegetal de *Cinchona officinalis* L., se encuentre en un óptimo desarrollo fenológico, con el fin de obtener un elevado porcentaje de germinación y lograr multiplicar de manera eficaz la especie.
- ✓ Aprovechar las vitroplantas obtenidas en la fase de laboratorio para establecer las mismas a un nuevo proyecto de investigación que involucre la fase de campo determinando así, si *Cinchona Officinalis* se adapta a las condiciones externas para su desarrollo fisiológico.
- ✓ Realizar estudios de propagación *in vitro* con diferentes especies maderables que tengan alto valor económico, ecológico y que presenten baja regeneración natural o se encuentren en peligro de extinción.

8. BIBIOGRAFÍA

Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas del Ecuador*. Editorial del Ecuador, Quito.

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

Anda A. (2002). *La Cascarilla*. Ed. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja – Ecuador.

Anderson, L. y Taylor, C. (1994). “*Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae*”. En: Harling G, Andersson, L. (Eds), *Flora of Ecuador* no 50. Council for Nordic Publications in Botany. Museo Botánica. Dinamarca. Pag. 114.

Andersson, L. (1998). *A revision of the genus Cinchona officinalis (Rubiaceae-Cinchonae)*. *Memories of the New York Botanical Garden*, Vol. 80, pp. 1-75.

Azcón – Bieto, J y Talón, M. (2001). *Fundamentos de Fisiología Vegetal Mc Graw – Hill Interamericana*. España 522p.

Azofeifa, A. (2007). *Desarrollo de metodologías para la caracterización de materiales promisorios de jocote (Spondias purpurea L) por medio de marcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas in vitro*. Tesis Mag. Sc., Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. 134 p

Bhojwani, S y Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer.

Buddenhagen, C., Renteria, J., Gardener, M., Wilkinson, S., Soria, M., Yanez, P., Tye, A., Valle, R. (2004). *Control of a highly invasive tree Cinchona, in Galápagos*. *Weed Technonolgy* 18: 1194-1202p.

- Buitrón, X. (1999). *Ecuador; Uso y Comercio de Plantas Medicinales*. Cambridge. TRAFFIC International.
- Camarena, F., Chura, J., y Blas, R. (2014). *Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas*. Lima - Perú: UNALM/AGROBANCO. Recuperado de http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/pdf_cpc/MEJORAMIENTO_GENETICO_Y_BIOTECNOLOGICO_DE_PLANTAS.pdf
- Camp, W. (1949). “*Cinchona at high altitudes in Ecuador*”. Brittonian Volumene 6.
- Castillo A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.
- Castillo, M; Machida, H; Cortés, C; García, F. (2011). *Multiplicación y conservación in vitro de cedro rojo (Cedrela odorata. L.) a partir de meristemos*. (INIFAP), 2CENID-COMEF (INIFAP) VI Reunión Nacional de Innovación Forestal León, Guanajuato. 9p.
- Chamba J. (2002). *Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la provincia de Loja*. (Tesis Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja – Ecuador. Pág. 90.
- Chamba L. (2017). *Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de Cinchona officinalis L., a partir de vitroplantas, en la Argelia- Loja*. (Tesis Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja – Ecuador.
- Charles Marie de la Condamine. (1738). “*Sur l’arbre de Quinquina*”, *Memoires del Academie des Sciences*. 226-243.

- Cifuentes, C. (2013). *Estudio de la Composición Química del Tónico Amargo de la Corteza de Quina Roja (Cinchona pubescens)*. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico farmacéutico. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo Facultad de Ciencias: Escuela de Bioquímica y Farmacia. 101p.
- Conde, V. (2015). *Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de hualtaco Loxopterygium huasango Spruce ex engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja*. (Tesis Ingeniero Forestal). Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja-EC. 125 p.
- Cóndor C., Bras E., Loayza O y Reyna K. (2009). *Estudio Químico De Los Tallos De Cinchona pubescens Vahl*. RevSocQuím Perú. 75 (1).
- Convenio sobre la Diversidad Biológica. (1992). Recuperado de <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf> crecimiento sobre la regeneración in vitro de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.).
- Cruz, M., y Irigoyen, J. (2005). *Guía técnica de semilleros y viveros*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=1CYOAQAIAAJ&pg=PR2&dq=propagacion+sexual&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=propagacion%20sexual&f=false
- Cuvi, N (2011), *Ciencia e imperialismo en América Latina: La Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas*. Saarbrücken: Editorial Académica Española.
- Cuvi, N. (2009). *Ciencia e imperialismo en América Latina: La Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas (1940-1945)*. Universidad Autónoma de Barcelona Departamento de Filosofía, Barcelona. 168p.

- Di Rienzo, J., Casanoves, F; González, L., Tablada, E., Díaz, M; Robledo, C., y Balzarini, M. (2017). *Estadística para las Ciencias Agropecuarias*. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Grupo InfoStat.
- Endress, R. (1994). *Plant Cell Biotechnology*. Germany: Springer-Publishing Company.
- Espinosa, C. I., y Ríos, G. (2017). *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.
- Espinoza, C. (2004). *Revista ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas, patrones de crecimiento de Cinchona officinalis in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micro propagadas y de semillas*. Volumen XXXV - N° 1 y 2. EC. 82 pág.
- Ferrira, J. (2004). *Artemisia annua L.: The hope against Malaria and Cancer*. USDA-ARS, AFSRC. Mountain State University, Beckey.
- Garmendia, A. (1999). *El árbol de la quina (Cinchona spp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp.), distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. Loja, Ecuador: Editorial Universidad Técnica Particular de Loja.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 5. Part 1. 2. Ed. Exegetics Ltd. 1993. 130 – 143p.
- George, E; Hall, M y De Klerk G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volumen 1. The Backgroud. Tercera edición. Netherlands: Springer.
- George, E. y Sherrington, P. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Ltd. 709p.

- Gray, J. y Trigiano, N. (2000). *Plant tissue, culture concepts and Laboratory Exercises*. United States of America. Recuperado de <http://pages.towson.edu/jsaunder/Saunders%20Publications/60.Use%20of%20protoplasts%20for%20plant%20improvement.pdf>
- Guerrero, C. y Ramírez, A. (2000). *Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of Quercus robur L. in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 48(309). 951-962pp.
- Hartmann, H. y Kester, E. (1995). *Propagación de plantas. Principios y Prácticas*. 4a. ed. México. D.F. Continental. 760 p.
- Hartmann, H., D.E. Kester, ft., Davies y Geneve, R. (1997). *Plant propagation principles and practices*. 6ª ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). *Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes*. *Cultivos Tropicales*. Volumen 31, N°4. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba.
- Hjarsen T. (1997). *The effects of plantations in the Andes*. Tropical Forest Update.
- Huetteman, C. A y Preece, C.A. (1993). *Thiadiuron: a potent cytokinin for Woody plant tissue culture*. *Plant Cell, Tissue and Orga culture*.
- Jorgensen, P y León, M. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: 1- 1182 p.
- Larronda, A. (2014). *La biotecnología se pone a punto y compite con la oferta mundial*. Recuperado de <https://www.promexico.mx/documentos/sectores/presentacion-biotecnologia.pdf>

- Leifert, C; Morris, C; Waites, W. (1994). *Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences. Vol. 13p. 139-183p.
- Lima R., Moreno J., Eras V., Michala J., González D., Yaguana M. y Valarezo C. (2016). *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de semillas*. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572018000200002
- Lluna, R. (2006). *Hormonas vegetales; crecimiento y desarrollo de la planta*. Recuperado de http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh196_2/22_27.pdf.
- Loján, L. (1992). *El verdor de los Andes*. Proyecto de Desarrollo Forestal Participativo en los Andes. Quito, Ecuador.
- Loján, L. (1992). *El verdor de los Andes: Árboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal alto andino*. FAO. Proyecto de desarrollo forestal participativo en los Andes. Quito, Ecuador.
- Madsen, J. (2002). *Historia cultural de la cascarilla de Loja*. En Z Aguirre M., J.E. Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds), *Botánica austro ecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*. Ediciones Abya Yala, Quito-Ecuador.
- Martínez, M; Pacheco, J. (2006). *Protocolo para la micropropagación de Furcraea microphylla Baker*. *Agronomía Colombiana* 24(2): 207-213pp.
- McComb, A. (1946). *Cinchona Officinalis in the Colombian Andes*. *Journal of Forestry*. Volum 44 (2). 92-97pp.

- Miller, V.E. (1967). *Fisiología Vegetal*. Traducida por Francisco de la Torre. México.
- Missouri Botanical Garden, (2015). *Trópicos*. Org. Recuperado de <http://www.Trópicos.Org./Name/27900157>.
- Moya, A. (1994). *Augey Crisis de la Cascarilla en la Audiencia de Quito, Siglo XVIII*. FLACSO, sede Ecuador. Recuperado de <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/44227.pdf>
- Muñoz, E. (1994). *Una visión de la Biotecnología: Principios políticos y problemas*. Madrid (España): Ed. Fondo Investigación Sanitaria.
- Murashige, T. y Skoog. (1962). *A revised médium gor rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia Plantarum*. 15: 473- 497. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis68.pdf>
- Nieto, M. (2000). *Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo*. ICAH. 184-232p.
- Pérez M., Ramírez M., Núñez P., y Ochoa A. (1999). *Physiological Responses of Capparis spinosa L. to Drought*. *Journal Plant Physiology*, 136,341-348.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. 391 p.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. (L.M. S, Ayerbe, Trad.). España: Mundi-Prensa.
- Preece, J y Compton, M. (1991). *Problems with explant exudation in micropropagation*, p.168–189. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- Quintero I., Polo J., Jarma A., Espitia A. (1993). *In vitro* rooting of *Dioscoreas sp.* Revista Colombiana de Biotecnología. Colombia.
- Raven, P.H., R.F., Evert y S.E., Eichhorn. (1999). *Biology of plants*. 6ª ed. W.H. Freeman and Company Worth Publishers. New York. U.S.A .944P.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura*. Fundamentos y Aplicaciones, Colombia: CIAT.
- Romero, G. (2008). *Biotecnología: generalidades, riesgos y beneficios*. Recuperado de <https://www2.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/GloriaRomero.pdf>
- Rosales, F; Pérez, G; Santizo, M. (2004). *Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración in vitro de tres genotipos de ajo (Allium sativum L.)*.
- Smith T; y Smith R. (2001). *Ecología*. Sexta edición. Recuperado de http://www.geografiafisica.org/sem_2016_02/geo131/fuentes/SMITH-Ecologia.PDF
- Suárez, I; Jarma, A. y Ávila, M. (2006). *Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*. Departamento de Ingeniería Agronómica y desarrollo Rural. Montería. Córdoba.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. 2ª ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts. U.S.A.
- Thangadurai, D. (2007). *Dictionary of Biotechnology*. India: Oxford Book Company.
- Thomas, P; Ravindra, M. (1997). *Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant*

survival and axenic culture establishment. Journal of Horticultural Science 72: 713-722.

Ulloa, C. (2006). *Aromas y sabores andinos*. En: M. Moraes R., B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev (Eds.), *Botánica económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 319.

Unidad de Informática para la Biodiversidad del Instituto de Biología (UNIBIO). (2010). *Instituto de biología "Cinchona officinalis L." Colecciones Biológicas*. Universidad Nacional Autónoma de México. IBUNAM: MEXU: PV450760". Consultado el 13 de abril del 2015. Recuperado de <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV450760>.

Zari J. (2018). *Evaluación de la Germinación de Semillas y Potencial Reproductivo de Cinchona officinalis L., Provenientes de Relictos Boscosos de la Provincia de Loja*". (Título Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.

Zevallos, P. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y estatus del género Cinchona en Perú*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú. 75p.

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

9. ANEXOS

Anexo 1. Matriz de variables evaluadas en fase de multiplicación o brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

Lugar de procedencia de semillas:								Código:								N° Día de evaluación		
Fecha de siembra:								Fecha de evaluación:								Tratamiento		
Repetición	Longitud de explantes (cm)			Número de brotes por explante		N° de brotes oxidados		Explantes contaminados		Explantes muertos		Pomedio N° de brotes	% de brotación	% de sobrevivencia	% de enraizamiento	% de contaminación	% de oxidación	Promedio longitud brotes /cm)
	n	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2							
1	1																	
	n																	
Promedio																		

Anexo 2. Matriz de variables evaluadas en fase de enraizamiento a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

Lugar de procedencia de semillas:								Código:								N° Día de evaluación				
Fecha de siembra:								Fecha de evaluación:								Tratamiento				
Repetición	Longitud de explantes (cm)			Numero de raíces		Longitud de raíces		N° de brotes oxidados		Explantes contaminados		Explantes muertos		Pomedio N° de raíces	% de sobrevivencia	% de enraizamiento	% de contaminación	% de oxidación	Promedio longitud raíces	Promedio longitud brotes
	n	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2							
1	1																			
	n																			
Promedio																				

Anexo 3. Porcentaje de brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% DE BROTAÇÃO		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	95,00 ± 3,82 A	83,89 ± 2,94 A	70,56 ± 7,36 A
T2	97,78 ± 3,82 A	93,33 ± 2,94 A	78,89 ± 7,36 A
T3	95,56 ± 3,82 A	92,78 ± 2,94 A	77,22 ± 7,36 A
T4	72,78 ± 3,82 B	92,22 ± 2,94 A	75,56 ± 7,36 A
p valor	p = 0,0053*	p = 0,1814	p = 0,8420

Anexo 4. Análisis estadístico para el porcentaje de brotación en explantes de *Cinchona officinalis* L., sector Zamora Huayco.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
% de brotación	12	0,78	0,70	7,33	
Fuente de variación	SC	GI	CM	F	P-valor
Modelo	1238,06	3	412,69	9,43	0,0053
Tratamiento	1238,06	3	412,69	9,43	0,0053
Error	350,06	8	12,38		
Total	1588,12	11	43,76		
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 43,7569	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T2	97,78	3		3,82 A	
T3	95,56	3		3,82 A	
T1	95,00	3		3,82 A	
T4	72,78	3		3,82 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 5. Promedio de número de brotes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	N° DE BROTES		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	5,70 ± 0,23 A	5,03 ± 0,16 A	4,23 ± 0,44 A
T2	5,87 ± 0,23 A	5,60 ± 0,16 A	4,73 ± 0,44 A
T3	5,73 ± 0,23 A	5,57 ± 0,16 A	4,63 ± 0,44 A
T4	4,40 ± 0,23 B	5,53 ± 0,16 A	4,53 ± 0,44 A
p valor	p = 0,0053*	p = 0,1227	p = 0,8668

Anexo 6. Análisis estadístico para el número de brotes por explantes de *Cinchona officinalis* L., sector Zamora Huayco.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
N° de brotes	12	0,78	0,70	7,33	
Fuente de variación	SC	GI	CM	F	P-valor
Modelo	1238,06	3	412,69	9,43	0,0053
Tratamiento	1238,06	3	412,69	9,43	0,0053
Error	350,06	8	12,38		
Total	1588,12	11	43,76		
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 43,7569	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T2	5,87	3		0,23 A	
T3	5,73	3		0,23 A	
T1	5,70	3		0,23 A	
T4	4,40	3		0,23 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 7. Promedio de longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

PROM. LONG BROTOS			
TRATAMIENTOS	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	4,3 ± 0,37 A	2,6 ± 0,16 AB	2,5 ± 0,17 A
T2	3,0 ± 0,37 AB	3,3 ± 0,16 A	2,7 ± 0,17 A
T3	4,2 ± 0,37 A	2,5 ± 0,16 B	2,1 ± 0,17 A
T4	2,3 ± 0,37 B	2,6 ± 0,16 B	2,1 ± 0,17 A
p valor	p = 0,0110*	p = 0,0257*	p = 0,0609

Anexo 8. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., sector Zamora Huayco.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
Longitud de brotes	12	0,73	0,63	18,79	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	9,13	3	3,04	7,35	0,0110
Tratamiento	9,13	3	3,04	7,35	0,0110
Error	3,31	8	0,41		
Total	12,44	11			
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 43,7569	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T1	4,3	3		0,37 A	
T3	4,2	3		0,37 A	
T2	3,0	3		0,37 AB	
T4	2,3	3		0,37 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 9. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., sector Uritusinga.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
Long brotes	12	0,67	0,54	10,28	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	1,30	3	0,43	5,36	0,0257
Tratamiento	1,30	3	0,43	5,36	0,0257
Error	0,65	8	0,08		
Total	1,95	11			
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 0,080	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T2	3,3	3		0,16 A	
T1	2,6	3		0,16 A B	
T4	2,6	3		0,16 B	
T3	2,5	3		0,16 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 10. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% SOBREVIVENCIA		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	100,00 ± 2,89 A	Sd	86,67 ± 4,71 A
T2	96,67 ± 2,89 AB	Sd	100,00 ± 4,71 A
T3	96,67 ± 2,89 A	Sd	93,33 ± 4,71 A
T4	93,33 ± 2,89 B	Sd	90,00 ± 4,71 A
p valor	p = 0,4872	Sd	p = 0,2970

Anexo 11. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% CONTAMINACIÓN		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	0,00 ± 3,73 A	Sd	0,00 ± 3,33 A
T2	13,33 ± 3,73 A	sd	0,00 ± 3,33 A
T3	0,00 ± 3,73 A	sd	13,33 ± 3,33 A
T4	3,33 ± 3,73 A	sd	0,00 ± 3,33 A
p valor	p = 0,1039	sd	p = 0,4411

Anexo 12. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% OXIDACIÓN		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	12,22 ± 2,55 A	16,11 ± 1,27 A	8,33 ± 1,69 A
T2	5,56 ± 2,55 A	5,56 ± 1,27 B	6,67 ± 1,69 AB
T3	5,00 ± 2,55 A	4,44 ± 1,27 B	2,78 ± 1,69 AB
T4	6,11 ± 2,55 A	0,00 ± 1,27 B	0,00 ± 1,69 B
p valor	p = 0,2352	p = 0,0001*	p = 0,0310*

Anexo 13. Análisis estadístico para el porcentaje de oxidación de brotes de *Cinchona officinalis* L., sector Uritusinga.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
% oxidación	12	0,91	0,88	33,81	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	419,16	3	139,72	28,68	0,0001
Tratamiento	419,16	3	139,72	28,68	0,0001
Error	38,97	8	4,87		
Total	458,12	11			
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 8,5713	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T1	16,11	3		1,27 A	
T2	5,56	3		1,27 B	
T3	4,44	3		1,27 B	
T4	0,00	3		1,27 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 14. Análisis estadístico para el promedio de longitud de brotes de *Cinchona officinalis* L., sector Selva Alegre.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
% oxidación	12	0,65	0,52	65,88	
F.V.	SC	gl	CM	F	P-valor
Modelo	127,79	3	42,60	4,97	0,0310
Tratamiento	127,79	3	42,60	4,97	0,0310
Error	68,57	8	8,57		
Total	196,36	11			
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 8,5713	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T1	8,33	3		1,69 A	
T2	6,67	3		1,69 AB	
T3	2,78	3		1,69 AB	
T4	0,00	3		1,69 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 15. Porcentaje de enraizamiento de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

% ENRAIZAMIENTO			
TRATAMIENTOS	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	39,44 ± 10,78 A	0,00 ± 4,99 A	12,22 ± 9,99 A
T2	46,11 ± 10,78 A	17,78 ± 4,99 A	26,67 ± 9,99 A
T3	41,67 ± 10,78 A	9,44 ± 4,99 A	26,67 ± 9,99 A
T4	43,33 ± 10,78 A	15,00 ± 4,99 A	17,22 ± 9,99 A
p valor	p = 0,8224	p = 0,2557	p = 0,3461

Anexo 16. Promedio de número de raíces por explante de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	N° DE RAÍCES		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	2,37 ± 0,65 A	0,00 ± 0,30 A	0,73 ± 0,60 A
T2	2,77 ± 0,65 A	1,07 ± 0,30 A	1,60 ± 0,60 A
T3	2,50 ± 0,65 A	0,57 ± 0,30 A	1,60 ± 0,60 A
T4	2,60 ± 0,65 A	0,90 ± 0,30 A	1,03 ± 0,60 A
p valor	p = 0,8224	p = 0,2557	p = 0,3461

Anexo 17. Promedio de longitud de raíces de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	PROM. LONG DE RAÍCES		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	2,10 ± 0,71 A	0,00 ± 0,15 A	0,4 ± 0,45 A
T2	2,0 ± 0,71 A	0,2 ± 0,15 A	0,9 ± 0,45 A
T3	1,7 ± 0,71 A	0,4 ± 0,15 A	1,2 ± 0,45 A
T4	1,4 ± 0,71 A	0,5 ± 0,15 A	0,5 ± 0,45 A
p valor	p = 0,8732	p = 0,8254	p = 0,1992

Anexo 18. Promedio de longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	PROM. LONG BROTES		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	3,9 ± 0,29 A	2,5 ± 0,17 B	3,2 ± 0,14 A
T2	4,0 ± 0,29 A	3,5 ± 0,17 A	3,2 ± 0,14 A
T3	4,1 ± 0,29 A	2,6 ± 0,17 B	3,2 ± 0,14 A
T4	3,5 ± 0,29 A	3,7 ± 0,17 AB	2,4 ± 0,14 B
p valor	p = 0,3237	p = 0,0271*	p = 0,0117*

Anexo 19. Análisis estadístico para el promedio de longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., sector Uritusinga.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
Promedio longitud de explantes	12	0,72	0,62	10,22	
F.V.	SC	gl	CM	F	P-valor
Modelo	1,76	3	0,59	7,02	0,0125
Auxina	0,24	1	0,24	2,89	0,1276
Citoquinina	0,91	1	0,91	10,89	0,0109
Auxina*Citoquinina	0,61	1	0,61	7,29	0,0271
Error	0,67	8	0,08		
Total	2,42	11			
TEST: TUKEY ALFA=0,05					
Error: 42,75	gl:8				
Tratamiento	Medias	N		EE	
T3	2,6	3		0,17 B	
T4	3,7	3		0,17 AB	
T2	3,5	3		0,17 A	
T1	2,5	3		0,17 B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 20. Análisis estadístico para el promedio de longitud de explantes de *Cinchona officinalis* L., sector Selva Alegre.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA						
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV		
Promedio de longitud de explantes	12	0,76	0,68	7,97		
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor	
Modelo	1,49	3	0,50	8,63	0,0069	
Auxina	0,44	1	0,44	7,67	0,0243	
Citoquinina	0,44	1	0,44	7,67	0,0243	
Auxina*Citoquinina	0,61	1	0,61	10,57	0,0117	
Error	350,06	8	0,06			
Total	1588,12	11				
TEST: TUKEY ALFA=0,05						
Error: 43,7569	gl:8					
Tratamiento	Medias	N	EE			
T2	3,2	3	0,14 A			
T3	3,2	3	0,14 A			
T1	3,2	3	0,14 A			
T4	2,4	3	0,14 B			
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

Anexo 21. Porcentaje de contaminación en explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% CONTAMINACIÓN		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A
T2	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A
T3	13,33 ± 3,33 A	6,67 ± 3,33 A	6,67 ± 3,33 A
T4	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A	0,00 ± 3,33 A
p valor	p = 0,0805	p = 0,3466	p = 0,3466

Anexo 22. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% SOBREVIVENCIA		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	100,00 ± 4,71 A	100,00 ± 3,73 A	96,67 ± 2,36 A
T2	100,00 ± 4,71 A	96,67 ± 3,73 A	100,00 ± 2,36 A
T3	86,67 ± 4,71 A	100,00 ± 3,73 A	100,00 ± 2,36 A
T4	93,33 ± 4,71 A	93,33 ± 3,73 A	96,67 ± 2,36 A
p valor	p = 0,4996	p = 0,6666	p = 0,1950

Anexo 23. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de *Cinchona officinalis* L., sectores: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre.

TRATAMIENTOS	% OXIDACIÓN		
	Zamora Huayco	Uritusinga	Selva Alegre
T1	3,89 ± 2,01 A	4,45 ± 1,11 A	3,89 ± 1,04 A
T2	0,56 ± 2,01 A	2,22 ± 1,11 A	3,33 ± 1,04 A
T3	10,57 ± 2,01 A	3,89 ± 1,11 A	2,78 ± 1,04 A
T4	4,44 ± 2,01 A	3,89 ± 1,11 A	3,33 ± 1,04 A
p valor	p = 0,5065	p = 0,3457	p = 0,6066

RESULTADOS

1. Efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

En los sectores Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre, el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el mayor porcentaje de brotación (97,78; 93,33 y 78,89 respectivamente) y mayor número de brotes por explante (5,87; 5,60 y 4,73), demostrando que esta concentración actúa de manera positiva al obtener la mayor cantidad de brotes en los diferentes sectores.

Según el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey al 5% mostró que existen diferencias significativas ($p=0,0053^*$) entre el T4 respecto a los demás tratamientos en el sector Zamora Huayco, mientras que el sector Uritusinga mostró que no existe diferencias significativas ($p=0,1814$) entre tratamientos al igual que el sector Selva Alegre ($p=0,8420$).



Figura 1. Porcentaje de brotación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

2. Establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

La interacción de diferentes concentraciones hormonales auxinas (AIB)-citoquininas (BAP) en explantes provenientes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.,

tuvo un efecto poco satisfactorio al no obtener un porcentaje de enraizamiento elevado. Sin embargo, en el sector Zamora Huayco el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) obtuvo el porcentaje más sobresaliente con 46,11%, a razón de haber alcanzado 2,77 raíces promedio. En los sectores Uritusinga y Selva Alegre de igual manera el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) mostró la presencia de raíces, aunque en porcentajes más bajos (17,78 y 25,00 respectivamente), esto al haber alcanzado 1,07 y 1,50 raíces. Los datos sometidos al análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey al 5 %, mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,8224$) en el sector Z Huayco, al igual que el sector Uritusinga ($p=0,2557$) y el sector Selva Alegre ($p=0,3461$).



Figura 2. Porcentaje de enraizamiento en explantes de *Cinchona officinalis* L.

CONCLUSIONES

- En la fase de brotación el T2 (0,0 mg L⁻¹ AIA + 2,5 mg L⁻¹ BAP) se considera la mejor concentración pues consiguió resultados positivos y viables en los tres sectores; así Zamora Huayco alcanzó un 97,78 %; Uritusinga 99,33% y en el caso de Selva Alegre un valor intermedio de 78,88 %.

- En la fase de enraizamiento el T2 (2,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,0 mg L⁻¹ BAP) fue el más eficiente en los tres sectores, sin embargo, los resultados en Zamora Huayco son 46,11 % y valores más bajos en Uritusinga con 17,78 %; Selva Alegre con 26,67 % e igual valor con el T3 (1,0 mg L⁻¹ AIB+ 0,5 mg L⁻¹ BAP).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE
RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN
VEGETAL

"BALANCE HORMONAL PARA LA FASE DE
BROTACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE
EXPLANTES DE *Cinchona officinalis* L.,
PROVENIENTE DE RELICTOS BOSCOSOS DE
LA PROVINCIA DE LOJA",



RESPONSABLE: Edga, Daniela K. Parédes Jiménez
DIRECTOR: Ing. For. Victor Hugo Eras Guamán Mg.Sc.

Loja - Ecuador
2018

INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., comúnmente llamada quina o cascarilla ha sido de gran importancia para la economía e historia de los países en los que se encuentra ya que, la corteza de algunas de las especies del género *Cinchona* fue el único remedio eficaz contra el paludismo y la malaria, esto provocó durante años la explotación irracional de las especies, sumado a ello, actividades como: la deforestación, incremento demográfico, incendios forestales, etc., han ocasionado la destrucción de su hábitat reduciendo significativamente sus poblaciones, encontrándose únicamente en lugares apartados y en pequeños relictos boscosos.

Ante lo expuesto, surge la necesidad de realizar estudios en busca de nuevas metodologías de propagación que permitan el uso de herramientas biotecnológicas, como la técnica de propagación *in vitro* de tejidos vegetales, con el fin de incidir en la recuperación, conservación y protección de la especie, así como, aportar en programas de forestación y reforestación, para recuperar zonas degradadas y sus ecosistemas.

OBJETIVOS

General

Aportar a la generación de información sobre el balance hormonal, que permita la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L.

Específicos

- Determinar el efecto del balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.
- Establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio.

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

2. Metodología para determinar el balance hormonal auxina - citoquinina en diferentes concentraciones en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L.

Previo al establecimiento de los ensayos de multiplicación, se realizó la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., colectadas de árboles seleccionados que presentan características fenotípicas y genotípicas sobresalientes provenientes de tres relictos boscosos: Zamora Huayco, Uritusinga y Selva Alegre de la provincia de Loja.

El medio de cultivo estuvo constituido por sales minerales de Murashige y Skoog, suplementado con vitaminas (Tiamina 1mg L⁻¹ y Mio-inositol 100 mg L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante 0,6 %.

En la cámara de flujo laminar se sembró dos explantes por frasco, para lo cual, se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales provenientes de vitoplantillas con altura de 1,0 a 2,0 cm y de 1 a 2 nudos (obtenidas en fase de germinación).

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

Cuadro 1. Concentraciones hormonales auxinas-citoquininas para la multiplicación a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	AIA	BAP
T1	0,0	2,0
T2	0,0	2,5
T3	0,2	2,0
T4	0,5	2,0

Se evaluó el % de brotación; número de brotes; longitud del brote; % de sobrevivencia; % de contaminación y % de oxidación fenólica.

3. Metodología para para establecer el nivel adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir el enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

El medio de cultivo para la fase de enraizamiento estuvo compuesto por sales minerales de Murashige y Skoog, suplementado con vitaminas (Tiamina 1mg/l y Mio - Inositol 100 ml L⁻¹), sacarosa como fuente de carbohidratos al 2 %, agar como agente gelificante 0,6 %, carbón activado 1g L⁻¹ y reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5,8 ± 02 de HCL o NaOH1N.

En la cámara de flujo laminar se sembró dos explantes por frasco, para lo cual se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales obtenidos previamente en la fase de brotación de 1,0 a 2 cm de altura con 1 a 2 nudos.

Se probaron cuatro tratamientos con AIB (ácido indolbutírico) y BAP (Benzilaminopurina) en diferentes concentraciones como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Concentraciones hormonales auxinas-citoquininas para enraizamiento de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales en *Cinchona officinalis* L.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	AIB	BAP
T1	1,0	0,0
T2	2,0	0,0
T3	1,0	0,5
T4	2,0	0,5

Se evaluó el % de enraizamiento; número de raíces por explante; longitud de la raíz; longitud del brote; % de sobrevivencia; % de contaminación y % de oxidación.