



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO*, A
PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE
VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE
RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE
LOJA”**

Tesis de grado, previo a la
obtención del título de
INGENIERA FORESTAL

Autora:

Katty María Lima Suquilanda

Director:

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán Mg Sc.

Loja – Ecuador
2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

Que en calidad de director de la tesis titulada **“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO*, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal Katty María Lima Suquilanda, portadora de la cédula N° 1105916942, ha sido **Dirigida, Revisada Y Concluida** dentro del cronograma aprobado; por tal razón autorizo su presentación y publicación.

Loja, 18 de agosto de 2020

Atentamente,



**VICTOR HUGO
ERAS GUAMÁN**

Ing. Victor Hugo Eras Guamán Mg. Sc
DIRECTOR DE TESIS

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

Ing. Zhofre Huberto Aguirre Mendoza Ph.D

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL CALIFICADOR DE LA TESIS

CERTIFICA:

En calidad de presidente del Tribunal de Calificación de la Tesis titulada **“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS DE NOVO, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal Katty María Lima Suquilanda, portadora de la cédula N° 1105916942, se informa que la misma ha sido revisada e incorporadas todas las observaciones realizadas por el Tribunal Calificador, y luego de su revisión se ha procedido a la respectiva calificación. Por lo tanto, autorizamos la versión final de la tesis y la entrega oficial para la sustentación pública.

Loja, 13 de noviembre de 2020

Atentamente.,



Firmado digitalmente por:
ZHOFRE HUBERTO
AGUIRRE MENDOZA

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

PRESIDENTE



Firmado digitalmente por:
ALEXANDRA DEL
CISNE JIMENEZ
TORRES

.....
Ing. Alexandra del Cisne Jiménez Torres Mg. Sc

VOCAL



Firmado digitalmente por:
NARCISA DE
JESUS URGILES
GOMEZ

.....
Ing. Narcisca de Jesús Urgiles Gómez Ph.D

VOCAL

AUTORÍA

Yo, Katty María Lima Suquilanda 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 acepo y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Katty María Lima Suquilanda



firmado electrónicamente por:
KATTY MARIA
LIMA
SUQUILANDA

Firma:

Cédula: 1105916942

Fecha: Loja 16 de noviembre del 2020

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

Yo, Katty María Lima Suquilanda, declaro ser autora de la tesis titulada **“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO*, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”** como requisito para optar al grado de Ingeniera Forestal, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los dieciséis días del mes de noviembre de dos mil veinte, firma la autora.



Firma: **KATTY MARIA
LIMA
SUQUILANDA**

Autora: Katty María Lima Suquilanda

Número de cédula: 1105916942

Dirección: Loja, Av. Isidro Ayora

Teléfono: 2600037

Celular: 0969709877

Correo electrónico: kmlimas@unl.edu.ec

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de grado: Ing. Zhofre Humberto Aguirre Mendoza PhD	Presidente
Ing. Alexandra del Cisne Jiménez Torres Mg. Sc	Vocal
Ing. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez PhD	Vocal

AGRADECIMIENTO

“Todos los sueños pueden hacerse realidad si tienes el coraje de perseguirlos”
Walt Disney

Quiero expresar mis sentimientos de gratitud a todos quienes participaron de forma directa e indirectamente, he hicieron posible la culminación del presente trabajo de investigación:

A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería Forestal y a todo su personal docente por haber compartido sus conocimientos, valores y confianza.

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación, y a su Equipo Técnico: Ing. Magaly Yaguana, Ing. Ruth Poma e Ing. José Moreno quienes me orientaron y brindaron su apoyo desinteresado en el transcurso de la investigación.

Al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc., Director de mi Tesis, quien me dio la oportunidad de formar parte del proyecto, así como también por brindarme su tiempo y su apoyo incondicional en todo el proceso, desde el inicio hasta la culminación de la Tesis.

A los Señores Miembros del Tribunal, Ing. Zhofre Aguirre, Ing. Narcisa Urgiles e Ing. Alexandra Jiménez por su tiempo y dedicación en la revisión de mi tesis y por sus valiosas sugerencias que hicieron mejorar mi trabajo de investigación.

A mi padre, mi madre y mis hermanos quienes supieron apoyarme incondicionalmente, estuvieron conmigo en todo momento, me motivaron a continuar y cumplir mis sueños, y que a través de sus consejos me enseñaron a nunca rendirme.

Finalmente, a todos mis compañeros de la Universidad que durante estos cinco años de carrera supieron brindarme su apoyo, respeto, paciencia y amistad, con quienes tuve la dicha de compartir grandes momentos de aprendizaje, diversión y formar lindas amistades.

A todos ustedes gracias infinitas...

DEDICATORIA

A Dios por brindarme salud y fuerza para cumplir mi más anhelada meta profesional y por poner en mi camino grandes seres humanos quienes han sido mi apoyo e inspiración.

*A mi padre **Telmo Lima** y mi madre **María Suquilanda** por ser mis mejores ejemplos a seguir; por su esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional en cada meta que me eh planteado, por enseñarme que todos los sueños se hacen realidad con esfuerzo y dedicación, por sus consejos y palabras de aliento para nunca rendirme y salir adelante a pesar de las dificultades, por su trabajo y sacrificio para ayudarme siempre en todo momento, esta meta cumplida es por y para ustedes.*

A mis hermanos y hermanas que siempre estuvieron pendientes de mi para apoyarme física, emocional y económicamente para cumplir mi meta, por todas sus muestras de cariño y amor incondicional y por ser mi motivación e inspiración.

A todos mis sobrinos y sobrinas por compartir grandes momentos de travesuras y que con cada ocurrencia siempre me hacen sonreír y me alegran la vida. Mi mayor inspiración.

A todos mis familiares y amigos, principalmente a Yadira, Rous, Franklin y Klever por su apoyo en este largo camino para culminar mi formación profesional. A ti Johanna Rueda, que empezaste siendo mi compañera y la tesis nos convirtió en grandes amigas. A Miguel por su amor y apoyo en todo momento.

¡Con cariño y amor!

Katty Lima S

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN	ii
APROBACIÓN	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
RESUMEN	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Antecedentes Históricos de <i>Cinchona officinalis</i> L	5
2.2. Descripción del género <i>Cinchona</i>	6
2.3. Descripción Taxonómica de <i>Cinchona officinalis</i> L	6
2.4. Descripción Botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L	7
2.5. Ubicación geográfica y distribución de <i>Cinchona officinalis</i> L	7
2.6. Usos de <i>Cinchona officinalis</i> L	8
2.7. Métodos de propagación de plantas <i>in vivo</i>	8
2.7.1. Propagación sexual	8
2.7.2. Propagación asexual	8
2.8. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	9
2.8.1. Factores que intervienen en el Cultivo de Tejidos	9
2.8.1.1. El inculo o explante	9

2.8.1.2.	Factores físicos	9
2.9.	Medio de cultivo	10
2.9.1.	Compuestos inorgánicos	10
2.9.1.1.	Agua	10
2.9.1.2.	Sales Minerales	10
2.9.2.	Compuestos orgánicos	11
2.9.2.1.	Carbohidratos	11
2.9.2.2.	Vitaminas	11
2.9.2.3.	Hormonas o Reguladores de crecimiento	12
2.10.	Métodos de propagación de plantas “ <i>in vitro</i> ”	14
2.10.1.	Calogénesis <i>in vitro</i>	14
2.10.2.	Organogénesis	16
2.10.2.1.	Organogénesis directa	17
2.10.2.2.	Organogénesis indirecta.....	18
2.11.	Estudios similares	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1.	Ubicación del área de estudio	20
3.2.	Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina en la inducción de estructuras <i>de novo</i>	20
3.2.1.	Obtención del material vegetal <i>in vitro</i>	20
3.2.1.1.	Fase de inducción de callos	21
3.2.1.2.	Selección de callos	22
3.2.2.	Fase de inducción de estructuras <i>de novo</i>	22
3.2.2.1.	Preparación del medio de cultivo sólido	22
3.2.2.2.	Inoculación <i>in vitro</i> de callos	23

3.2.3.	Diseño experimental para la formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	24
3.2.3.1.	Especificaciones del Diseño experimental	24
3.2.4.	Hipótesis del modelo	25
3.2.5.	Análisis estadístico de datos, correspondientes a la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	25
3.3.	Metodología para evaluar el efecto de la hormonal de una citoquinina BAP en la inducción de estructuras <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L	26
3.3.1.	Selección de callos	26
3.3.2.	Preparación del medio de cultivo sólido	26
3.3.3.	Inoculación <i>in vitro</i> de callos	27
3.3.4.	Diseño experimental para la formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	27
3.3.4.1	Especificaciones del Diseño experimental	27
3.3.5.	Hipótesis del modelo	28
3.3.6.	Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	29
3.4.	Metodología para la difusión de resultados a actores sociales interesados	29
4.	RESULTADOS	30
4.1.	Determinación del efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina para la inducción de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	30
4.1.1.	Número de días para la formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>C. officinalis</i> L	30

4.1.2.	Porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>C. officinalis</i> L	31
4.1.3.	Número de brotes <i>de novo</i> por callo de <i>C. officinalis</i> L	31
4.1.4.	Altura de brotes <i>de novo</i> de <i>C. officinalis</i> L	33
4.1.5.	Número y longitud de raíces <i>de novo</i> por callo de <i>Cinchona officinalis</i> L	34
4.1.6.	Porcentaje de contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	34
4.1.7.	Porcentaje de fenolización de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	35
4.2.	Determinación del efecto de la Citoquinina, benzil amino purina (BAP) para la inducción de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	36
4.2.1.	Número de días para la formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>C. officinalis</i> L	36
4.2.2.	Porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	37
4.2.3.	Número de brotes <i>de novo</i> por callo de <i>Cinchona officinalis</i> L	38
4.2.4.	Altura de brotes <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	39
4.2.5.	Número y longitud de raíces <i>de novo</i> por callo de <i>Cinchona officinalis</i> L	40
4.2.6.	Porcentaje de contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	40
4.2.7.	Porcentaje de fenolización de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	41
4.3.	Difusión de resultados generados a actores interesados	42

5.	DISCUSIÓN	43
5.1.	Efecto del mejor balance hormonal Auxina – Citoquinina para la inducción de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	43
5.2.	Efecto de una Citoquinina, benzil amino purina (BAP) para la inducción de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	46
6.	CONCLUSIONES	49
7.	RECOMENDACIONES	50
8	BIBLIOGRAFÍA	51
9	ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG.
Tabla 1. Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos	9
Tabla 2. Composición química del MC de Murashige y Skoog-MS (1962)	10
Tabla 3. Descripción de los Tratamientos para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	23
Tabla 4. Concentraciones para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	24
Tabla 5. Especificaciones del diseño experimental	25
Tabla 6. Descripción de los Tratamientos para evaluar el efecto de una citoquinina en la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	26
Tabla 7. Concentraciones para evaluar el efecto de la citoquinina en la fase de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L	27
Tabla 8. Especificaciones del diseño experimental	28

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
Figura 1. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.....	20
Figura 2. Obtención del Material Vegetal. a) Selección de vitroplantas. b) Soluciones madre MS y reguladores de crecimiento para el medio de cultivo. c) Preparación medio	21
Figura 3. Inducción de callos. a) Disección de material vegetal. b) Inoculación de explantes. c) Cuarto de luces (frascos cubiertos con cartulina)	22
Figura 4. Callos seleccionados para formación de estructuras <i>de novo</i>	22
Figura 5. Medio de cultivo. a) Sales minerales y reguladores de crecimiento. b) Preparación del medio. c) Medición de pH en el medio de cultivo. d) Esterilización de frascos (autoclave)	23
Figura 6. Inoculación <i>in vitro</i> de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L (Fase 1)	24
Figura 7. Inoculación <i>in vitro</i> de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L (Fase 2)	27
Figura 8. Número de días a la formación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	30
Figura 9. Porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	31
Figura 10. Número de estructuras <i>de novo</i> (sin estructura definida), a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	32
Figura 11. Estructuras <i>de novo</i> (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	33
Figura 12. Altura de estructuras <i>de novo</i> (sin estructura definida), a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	34
Figura 13. Contaminación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	35
Figura 14. Fenolización de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	36

Figura 15.	Número de días a la formación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	37
Figura 16.	Porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	38
Figura 17.	Número de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	39
Figura 18.	Estructuras <i>de novo</i> (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	39
Figura 19.	Altura de brotes <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	40
Figura 20.	Contaminación de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	41
Figura 21.	Fenolización de estructuras <i>de novo</i> , a partir de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	42
Figura 22.	Difusión de resultados a actores sociales interesados	42

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁG.
Anexo 1. Hoja de registro en la toma de datos para la variable: N° de días a la formación de estructuras <i>de novo</i>	58
Anexo 2. Resultados obtenidos del ensayo sobre el porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación	58
Anexo 3. Resultados obtenidos del ensayo sobre el porcentaje de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	58
Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo sobre el número de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	59
Anexo 5. Resultados obtenidos del ensayo sobre el número de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	59
Anexo 6. Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	59
Anexo 7. Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	60
Anexo 8. Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	60
Anexo 9. Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	60

Anexo 10.	Resultados obtenidos del ensayo sobre la fenolización de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	61
Anexo 11.	Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	61
Anexo 12.	Resultados obtenidos del ensayo sobre % de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	61
Anexo 13.	Resultados obtenidos del ensayo sobre % de formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	62
Anexo 14.	Resultados obtenidos del ensayo sobre número de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	62
Anexo 15.	Resultados obtenidos del ensayo sobre número de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	62
Anexo 16.	Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	63
Anexo 17	Resultados obtenidos del ensayo sobre altura de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	63
Anexo 18.	Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	63
Anexo 19.	Resultados obtenidos del ensayo sobre contaminación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	64

Anexo 20.	Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)	64
Anexo 21.	Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con BAP durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)	64
Anexo 22.	Inoculación <i>in vitro</i> de explantes para la formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L	65
Anexo 23.	Formación de callos de <i>Cinchona officinalis</i> L a los 35 días, después de la inoculación <i>in vitro</i>	65
Anexo 24.	Formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, en la combinación hormonal AIA/KIN a los 25 días, después de la inoculación <i>in vitro</i> de callos	65
Anexo 25.	Formación de estructuras <i>de novo</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L, con una citoquinina BAP a los 25 días, después de la inoculación <i>in vitro</i> de callos	65
Anexo 26	Tríptico	66
Anexo 27	Folleto técnico de resultados	68

**INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO*, A
PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE
VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE
RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA
DE LOJA**

RESUMEN

Cinchona officinalis L., es una especie nativa del Valle de Loja, se encuentra desde los 2300 a los 3100 m s.n.m, se desarrolla en suelos de origen aluvial y coluvial, en climas cálidos y húmedos, con precipitaciones abundantes y nubosidad. Además, es un recurso forestal de gran interés por sus múltiples beneficios medicinales y ecológicos, y fue catalogada como la Planta Nacional del Ecuador. Mediante las técnicas de cultivo *in vitro* de callos y posteriormente la inducción de estructuras *de novo* se puede generar nuevas plantas, debido a la totipotencia celular que poseen los callos.

La investigación se desarrolló en un periodo de seis meses, desde noviembre 2019 a abril 2020. El material vegetal inicial fue proveniente del germoplasma de vitroplantas de *C. officinalis* L. El medio de cultivo para la inducción de callos se preparó en base a las sales minerales del medio MS, suplementado con $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ 2,4D+ $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN.

Para la inducción de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, se seleccionó las mejores estructuras callogénicas, para lo cual se realizaron dos ensayos. En el primer ensayo se evaluó el efecto de AIA-KIN, el medio de cultivo sólido se preparó en base a las sales minerales de MS y en combinaciones de AIA: $0,2 \text{ mg/l}^{-1}$; $0,4 \text{ mg/l}^{-1}$ y $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ y la KIN en $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$; 2 mg/l^{-1} ; 3 mg/l^{-1} . En el segundo ensayo se evaluó el efecto del BAP, para lo cual, el medio de cultivo se realizó en base a las sales minerales de la solución nutritiva del MS y con BAP en concentraciones de 1 mg/l^{-1} ; $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ y 2 mg/l^{-1} ; el diseño experimental utilizado fue completamente al azar.

Se observó que, el mayor porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, en la combinación AIA-KIN fue del 17,77%, en el T1 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA+ $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) con un promedio de 15 estructuras *de novo*/callo y una altura de 2,87 mm. En tratamientos que tuvieron únicamente BAP en concentraciones de $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$; $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ y 2 mg/l^{-1} se observó porcentajes de formación de estructuras *de novo* inferiores al 2%. El porcentaje de contaminación más alto (6,67%) se presentó en los tratamientos T0 (sin hormonas), T3 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN), T5 ($0,4 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) y T6 ($0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN). Finalmente, el mayor porcentaje de fenolización de los explantes se evidenció en los tratamientos T1 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) con un 16.7% y T3 ($2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP) con un 13,33%.

Las combinaciones hormonales AIA – KIN no ejercieron un efecto significativo sobre la cantidad y calidad de las estructuras *de novo* y con el uso de una sola citoquinina BAP se

evidenció que a medida que se incrementó la concentración de BAP, el porcentaje de formación de estructuras *de novo* fue menor.

Palabras claves: *Cinchona officinalis*, quinina, cascarilla, organogénesis, callos, estructuras *de novo*, reguladores de crecimiento, inducción.

ABSTRAC

Cinchona officinalis L., is a native species of the Loja Valley, it is found from 2300 to 3100 m s.n.m., it develops in soils of alluvial and colluvial origin, in warm and humid climates, with abundant rainfall and cloudiness. In addition, it is a forest resource of great interest because of its multiple medicinal and ecological benefits, and it was catalogued as the National Plant of Ecuador. Through the techniques of in vitro callus cultivation and later the induction of de novo structures, new plants can be generated, due to the cellular totipotence that calluses possess.

The research was developed over a period of six months, from November 2019 to April 2020. The initial vegetal material was from the germplasm of *C. officinalis* L. vitroplants. The culture medium for callus induction was prepared based on the mineral salts of the MS medium, supplemented with 3.0 mg/l-1 2.4D+ 0.5 mg/l-1 KIN.

For the induction of de novo structures of *C. officinalis* L, the best callogenic structures were selected, for which two trials were carried out. In the first trial, the effect of AIA-KIN was evaluated. The solid culture medium was prepared based on MS mineral salts and in combinations of AIA: 0.2 mg/l-1; 0.4 mg/l-1 and 0.6 mg/l-1 and KIN in 1.0 mg/l-1; 2 mg/l-1; 3 mg/l-1. In the second trial, the effect of BAP was evaluated. The culture medium was based on the mineral salts of the nutritive solution of MS and with BAP in concentrations of 1 mg/l-1; 1.5 mg/l-1 and 2 mg/l-1; the experimental design used was completely random.

It was observed that, the highest percentage of de novo structure formation of *C. officinalis* L, in the combination AIA-KIN was 17.77%, in T1 (0.0 mg/l-1 AIA+1.0 mg/l-1 KIN) with an average of 15 de novo/callos structures and a height of 2.87 mm. In treatments that had only BAP in concentrations of 1.0 mg/l-1; 1.5 mg/l-1 and 2 mg/l-1, percentages of de novo structure formation lower than 2% were observed. The highest percentage of contamination (6.67%) occurred in the treatments T0 (without hormones), T3 (0.0 mg/l-1 AIA + 3.0 mg/l-1 KIN), T5 (0.4 mg/l-1 AIA + 2.0 mg/l-1 KIN) and T6 (0.6 mg/l-1 AIA + 3.0 mg/l-1 KIN). Finally, the highest percentage of phenolization of explants was evidenced in T1 treatments (0.0 mg/l-1 AIA + 1.0 mg/l-1 KIN) with 16.7% and T3 (2.0 mg/l-1 BAP) with 13.33%.

The AIA-KIN hormonal combinations did not exert a significant effect on the quantity and quality of the de novo structures and with the use of a single BAP cytokinin it was

evidenced that as the BAP concentration increased, the percentage of formation of BAP structures novo was less.

Keywords: *Cinchona officinalis*, quinine, cascarilla, organogenesis, callus, de novo structures, growth regulators, induction.

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es considerado como uno de los 17 países megadiversos del mundo, debido a que contiene una exuberante diversidad biológica y en una superficie muy reducida, que representa el 0,2 % del planeta (Aguirre y Aguirre, 2017). En el sur del Ecuador, se encuentra ubicada la provincia de Loja, la cual, según lo señala el mismo autor, contiene gran diversidad de plantas y animales; ello, como resultado de la influencia de varios factores que en conjunto generan hábitats y micro hábitats, que crean condiciones favorables para el desarrollo óptimo de numerosas especies; tales factores son los diferentes pisos altitudinales, la depresión de Huancabamba, la geomorfología de la zona, la ubicación geográfica y las cuatro cuencas hidrográficas que allí se originan.

Dentro de la gran diversidad de especies vegetales de la provincia de Loja, destacan las especies pertenecientes al género *Cinchona*; entre estas especies, *Cinchona officinalis* L., conocida como cascarilla roja, cinchona o quina, ha sido la más representativa, ya que en el pasado tuvo una gran importancia para la economía del país, especialmente por sus múltiples propiedades medicinales. Actualmente sus poblaciones se encuentran reducidas a causa de la sobreexplotación que tuvo la especie, para el aprovechamiento de la corteza por su alto contenido de quinina (Conde, 2016; Cancho, 2017).

La importancia medicinal que tuvo la cascarilla fue cuando se utilizó para curar las fiebres intermitentes ocasionadas por el paludismo o malaria, que es una enfermedad infecciosa causada por la picadura de un mosquito. Según datos históricos mencionan que la Condesa de Chinchón sufrió de fiebres intermitentes, la misma que al tomar un brebaje conocido comúnmente como cascarilla, polvo de Loja o polvo de los jesuitas se alivió rápidamente. En varios estudios realizados se encontró que en la corteza de cascarilla contiene componentes activos para curar el paludismo, debido a la presencia de alcaloides en su corteza (Jiménez, 2019).

La utilización de la corteza, para la extracción de la quinina, generó un aporte significativo para la salud y la cultura a nivel mundial (Garmendia, 2005). La corteza de la cascarilla contiene más de 20 alcaloides, de los cuales, cuatro son los más utilizados para el tratamiento del paludismo; estos alcaloides son: quinina, quinidina, cinconina y cinconidina (Larreátegui y Lafuente, 2013; Comisión Nacional contra la Biopiratería, 2018). Además, contiene taninos, que le dan propiedades astringentes; ácidos orgánicos

y otros compuestos terpénicos, que le dan su sabor característico amargo (Larreátegui y Lafuente, 2013).

La cascarilla, es una especie nativa del Valle de Loja, y se distribuye en las estribaciones de los Andes (FAO y MAE, 2015). Su rango altitudinal oscila desde los 2 300 a los 3 100 m s.n.m. (Espinosa y Ríos, 2014). Según datos proporcionados por Zevallos (1989) y Padilla (2017), el género *Cinchona* se desarrolla en climas cálidos y húmedos, con precipitaciones abundantes y nubosidad presente casi todo el año; en zonas de topografía generalmente ondulada y empinada; y en suelos de origen aluvial y coluvial.

La explotación irracional que ha tenido la especie es la consecuencia no solo de la demanda excesiva que tuvo en la provincia de Loja, a partir del siglo XVII al XIX (Buitrón, 1999), sino también de otros factores que, aunados a su baja capacidad de regeneración natural, contribuyeron a la reducción de sus poblaciones en la región, tales como el incremento demográfico, la ampliación de la frontera agrícola (agricultura y ganadería), la tala ilegal, la deforestación, los incendios forestales periódicos, el desconocimiento de sus propiedades (Anda, 2002; Tapia, 2013). Por otro lado, aproximadamente el 70 % de los Bosques Interandinos del Ecuador han desaparecido, lo que ha provocado a que las especies del género *Cinchona* hayan perdido alrededor del 60 % de sus áreas de distribución potencial (Espinosa y Ríos, 2014).

Es por ello que, se requiere realizar investigaciones que permitan aplicar nuevas técnicas alternativas de propagación de la especie, como sería la propagación *in vitro*, mediante técnicas biotecnológicas para la inducción de callos y estructuras *de novo*. Estas técnicas de propagación, tal como lo señala Espinosa y Ríos (2014) facilitan la obtención de nuevas plantas, con las mismas características genéticas y fenotípicas de los árboles plus, con lo cual se puede tener mayor cantidad de individuos por unidad de superficie y en el menor tiempo; además, las plantas pueden ser utilizadas en actividades de reforestación para recuperar los ecosistemas nativos degradados.

Por lo tanto, la propagación *in vitro*, mediante inducción de callos y la subsiguiente formación de estructuras *de novo*, se convierte en una excelente alternativa, para la propagación de la especie y por ende de gran apoyo al sector forestal. En este contexto, Jiménez y Agramonte (2013) señalan, que la micropropagación permite mantener el equilibrio del ecosistema forestal y, por ende, también del ambiente, debido a que contribuye a la conservación de la biodiversidad genética y a la producción de plantas.

En cuanto al cultivo de callos, Correia y Canhoto (2010) indican que esta técnica constituye una alternativa eficaz para la propagación de plantas; los callos pueden ser utilizados para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento genético de las especies vegetales. La inducción de estructuras *de novo* también es una técnica importante, que permite generar una nueva planta, a partir de brotes adventicios o asexuales que se obtienen de una célula callogénica producto de la totipotencia celular (Aguilera, 2012).

Con los antecedentes antes señalados, se ejecutó esta investigación, la cual forma parte del proyecto marco de investigación titulado: “Procesos morfogénicos utilizando técnicas biotecnológicas, para la mejora genética de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja”; que se realiza en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja, a través de la Dirección de Investigación.

Con la presente investigación se pretende generar información acerca del balance hormonal para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *C. officinalis* L., provenientes de árboles codificados seleccionados en relictos boscosos de la provincia de Loja, por el proyecto marco de investigación cinchona y de esta manera obtener material vegetal, para continuar con la investigación científica de la especie a nivel de propagación *in vitro* y para contribuir a la mejora genética de la especie y a generar nuevas plántulas, para apoyar a los planes de regeneración e inserción de la cascarilla en su hábitat natural, con lo cual se contribuirá a la conservación de esta especie emblemática para el país y de manera particular para la región sur y la provincia de Loja, y, por ende, al desarrollo del sector forestal. La presente investigación se desarrolló desde noviembre de 2019 a abril de 2020, en la cual se persiguieron los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Contribuir a la generación de información sobre el balance hormonal para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

- Evaluar el efecto de una Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.

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

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes Históricos de *Cinchona officinalis* L

La cascarilla es considerada como una especie de vital importancia, principalmente desde el punto de vista medicinal, debido a que la corteza, posee grandes propiedades medicinales; además, la especie tuvo gran demanda en el mercado, generó ingresos económicos al país, y se consideró como el principal producto forestal del Ecuador en aquella época. Estas características, le dan el origen histórico, y por ende se denominó como el “Árbol de la Vida” o “Planta Salvadora de la Humanidad” y como uno de los árboles más bellos de los bosques subandinos del Ecuador (Acosta, 1989). La provincia de Loja, fue la primera en adquirir fama, ya que fue la principal fuente de *Cinchona* (Madsen, 2002), atribuyéndose su origen y principal centro de producción al nudo de Cajanuma (Buitrón, 1999).

Durante la segunda mitad del siglo XVII se realizaron estudios botánicos de especies y variedades de quina, donde se incluyó el género biológico *Cinchona*, debido a la leyenda de que curó a la condesa Ana de Chinchón, esposa del virrey del Perú. A mediados del siglo XVIII, el naturalista sueco Carlos Linneo, hizo su clasificación científica. Algunos consideran a la corteza de cascarilla como “la más importante planta medicinal de ultramar”, que habría sido descubierta a comienzos del siglo XVII en el Virreinato del Perú, Corregimiento de Loja, cerca del pueblo de Malacatos, que actualmente es Ecuador (Cuvi y Acosta, 2005).

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

La cascarilla tuvo gran importancia para la provincia de Loja, debido a diversos acontecimientos relacionados con el tratamiento del paludismo; fue de gran apoyo para el sector productivo y económico del país a través de las exportaciones de cascarilla a Europa; la cascarilla de Loja fue utilizada para curar las fiebres intermitentes ocasionadas por el paludismo, aportando de esta manera a la medicina mundial. Con muestras

colectadas de la cascarilla en Loja, el reconocido botánico Carlos Linneo fue quien describió la especie. Además, la cascarilla tuvo un gran significado para los lojanos, principalmente para la cultura musical, debido a que la madera se la utilizó en la fabricación de instrumentos musicales como guitarras (Tapia, 2013).

2.2. Descripción del género *Cinchona*

Las especies del género *Cinchona*, tienen su origen en los Andes de Sudamérica, su descubrimiento, y taxonomía se considera confuso (Nieto, 2001). 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 (Andersson y Taylor, 1994). *Cinchona* es un género de plantas fanerógamas, pertenece a la familia RUBIACEAE y es nativo de los valles andinos de Sudamérica (Buitrón, 1999).

El género *Cinchona*, lo constituyen las especies llamadas comúnmente cascarillas o quininas, con más de cuarenta especies e híbridos naturales (Anderson, 1999). De estas en Ecuador se encuentran doce especies y cuatro híbridos (Ulloa y Jorgensen, 2000). *Cinchona officinalis*, es una especie nativa (MAE y FAO, 2015) y se encuentra distribuida en el Valle de Loja, en el sur del Ecuador (Andersson y Taylor, 1994; Anderson, 1999; Garmendia, 2005).

Estos árboles de quina o cascarilla en estado natural, constituyen pocas veces bosques por sí mismos, generalmente forman grupos dispersos en medio del bosque, llamados manchas. En Ecuador se encuentran más de la mitad de todas las especies del género *Cinchona*, principalmente en provincias como Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Garmendia, 2005).

2.3. Descripción Taxonómica de *Cinchona officinalis* L

Según Zevallos (1989), la descripción botánica de *Cinchona* es:

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Rubiales

FAMILIA: RUBIACEAE

GÉNERO: *Cinchona*

ESPECIE: *officinalis*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Cinchona officinalis* L.

2.4. Descripción Botánica de *Cinchona officinalis* L

Cinchona officinalis es un árbol que puede llegar a medir hasta 25m de altura, generalmente presenta ramificaciones desde la mitad del tronco (Torres, 2017; Mahecha et al, 2004), la ramificación es de forma simpodial; su copa es globosa irregular y densa (Andersson y Taylor, 1994; Andersson, 1999; Galeano y Galeano, 2009). Sus raíces principales son muy desarrolladas, y en ocasiones pueden sobresalir de la superficie del suelo (Torres, 2017).

La forma del tronco es variable, puede ser recto o torcido, posee un diámetro variable (30 a 40cm) de acuerdo a factores como la edad, la especie y la localidad. La corteza es generalmente gruesa, todas las cortezas presentan una superficie interior lisa, blanca y sabor amargo. La corteza externa es de color marrón oscuro, un poco fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. (Garmendia, 2005; Torres, 2017)

Hojas coriáceas con grandes nervios de 1,8, a 2,7 cm de largo, de color verde oscuro; algunas son pubescentes y otras lisas; simples, opuestas y recusadas; de forma elíptica-ovalada; pecioladas; hojas de 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho (Andersson, 1999; Garmendia, 2005).

Las flores se agrupan en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, la corola es gamopétala, de color blanca o roja, su forma tubular de 8 a 13 mm de longitud, son hermafroditas, actinomorfas. El cáliz está formado por cinco sépalos totalmente connados (Torres, 2017).

Frutos son de tipo cápsulas cilíndricas, son de color marrón oscuro, su forma elipsoide, con dehiscencia septicida, con tres a cuatro semillas y de 2,5 cm de largo. Las semillas son fusiformes, redondeadas por un ala membranosa, son de 7-10 mm de largo, 2-3 mm de ancho y son ligeras para su tamaño, puesto que un gramo puede contener más o menos 9,000 semillas (Garmendia, 2005; Romero, 2017; Torres, 2017).

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

La cascarilla, cinchona o quina es un árbol originario de la región Andina de América del Sur, además, también se encuentra en Centro - América (Buitrón, 1999). Las cinchonas son nativas de los bosques subandinos del trópico noroeste de Sudamérica. El hábitat

natural de *Cinchona* es en las montañas boscosas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Acosta, 1989).

En Ecuador se encuentran distribuidas a lo largo de los bosques de las estribaciones externas de los Andes, desde la frontera colombo-ecuatoriana hasta la frontera ecuatoriana-peruana (Bosques de la provincia de Loja y Azuay), desde los 600 a 3000 m s.n.m (Acosta, 1989).

2.6. Usos de *Cinchona officinalis* L

Los usos de la cascarilla se atribuyen principalmente a la medicina, puesto que, contiene grandes cantidades de alcaloides en su corteza, la cual es utilizada para curar las fiebres producidas por la malaria y fiebres palúdicas (Hernández , 2015; Moya, 1994). También se usa para curar neumonías, acelerar el parto, un tónico capilar para evitar la caída del cabello, para las desordenes del ritmo cardiaco, calambres e indigestión. Es considerada una planta depurativa ya que favorece la eliminación de toxinas por piel y orina. Además, es utilizada en el sector maderero, puesto que su madera es atractiva, de color blanco y pesada, usualmente se la utiliza para tablas, puntales, vigas, así como también como fuente de energía a través de la leña y carbón (Zevallos, 1989).

2.7. Métodos de propagación de plantas *in vivo*

2.7.1. Propagación sexual

Es la formación de nuevas plantas a partir de dos progenitores (Cruz y Irigoyen, 2005). Cada progenitor aporta sus gametos, se unen y luego forman el cigoto, la primera célula del individuo será una combinación de material genético de ambos progenitores, es por ello que, los descendientes pueden heredar una combinación de rasgos que le ofrecen ciertas ventajas adaptativas en diferentes condiciones ambientales. La semilla es la unidad de dispersión y supervivencia de la especie, es el método de propagación más utilizado (Cerqueda, 2010).

2.7.2. Propagación asexual

Este tipo de propagación, también es conocido como reproducción vegetativa, se caracteriza por la presencia de un único progenitor, que se divide, y de esta manera da origen a nuevos individuos, con características idénticas al progenitor y entre sí (Cerqueda, 2010).

2.8. Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas (Daorden, 2012). El cultivo de tejidos abarca el cultivo aséptico de tejidos, ya sea de células o de órganos. La micropropagación es la multiplicación masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1993). En la Tabla 1, se detalla las principales ventajas y desventajas que tiene el cultivo de tejidos *in vitro*:

Tabla 2. Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Propagación de individuos que no han alcanzado su madurez	Técnica sensible a contaminación por hongos y bacterias
Propagación de especies exóticas o en peligro de extinción	Instrumental e infraestructura especializada
Mejoramiento genético de las especies	Capacitación para aprender las técnicas <i>in vitro</i>
Propagación vegetativa rápida y a gran escala	Desarrollo empírico de las técnicas
Propagar plantas libres de patógenos	Propensión del tejido a oxidación y crecimiento anómalo
Reducción en el tiempo de multiplicación y espacio	Pérdidas durante los trasplantes
Conservación del germoplasma	Costo beneficio de las técnicas

FUENTE: (Wegier et al. 2013; Mejía, 2012).

2.8.1. Factores que intervienen en el Cultivo de Tejidos

2.8.1.1. El inóculo o explante

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido o células, seccionado del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. Es importante considerar factores como: genotipo, edad de la planta, y su estado fisiológico, para obtener mejores resultados (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.8.1.2. Factores físicos

pH: es el grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo, es específico para cada tipo de plantas. Sin embargo, el pH en las plantas tiene un rango de 4.5 a 7 (Abdelnour y Escalant, 1994).

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

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

Temperatura: se mantiene constante de 24 a 26°C, dependiendo de la especie, de la cual se obtienen los explantes; se elige una temperatura baja 18°C para especies bulbosas, o una temperatura alta de 28 a 29°C para especies tropicales (Pierik, 1990).

2.9. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una mezcla de sustancias, en la cual crecen los explantes, el medio de cultivo se debe esterilizar en autoclave o por filtración, para posteriormente ser utilizado. Son combinaciones de sustancias químicas, y está compuesto por sales minerales, compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y mataría inerte (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.9.1. Compuestos Inorgánicos

2.9.1.1. Agua

El agua es el componente más abundante de los seres vivos, contiene aproximadamente hasta el 90 % del peso fresco. Por eso, no sólo es fundamental en el medio nutritivo, sino que también es el componente principal. Sus principales características: es disolvente de sustancias iónicas, tiene atracción electrostática entre las moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno, tiene alto calor de fusión y de vaporización (Barrueto, 2005).

2.9.1.2. Sales Minerales

Las sales minerales, que conforman el medio de cultivo son las utilizadas por Murashige y Skoog (1962), generalmente son conocidas como medio MS. Las sales minerales se dividen en macro y micro nutrientes (Ramos, 2012). En el Tabla 2 se detalla los componentes que forman parte de la composición química de MS.

Tabla 3. Composición química del MC de Murashige y Skoog-MS (1962)

Solución Madre	Componentes	Cantidad mg/l	Macro/micro elementos
NITRATOS	Nitratos de amonio	1 650,00	*
	Nitratos de potasio	1 900,00	*

Fuente: Murashige y Skoog, 1962. * Macroelementos; ** Microelementos

	Sulfato de magnesio	370,00	**
SULFATOS	Sulfato de manganeso	16,90	*
	Sulfato de zinc	8,60	**
	Sulfato cúprico	0,03	**
HALOIDES	Cloruro de calcio	440,00	*
	Yoduro de potasio	0,83	**
	Cloruro de cobalto	0,25	**
	Fosfato de potasio	170,00	*
P, B, Mo	Ácido bórico	6,20	**
	Molibdato de sodio	0,25	**
Na Fe EDTA	Sulfato ferroso	27,80	**
	Ácido etilendiaminotetraacético	37,30	**

2.9.2. Compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos están conformados por: carbohidratos, vitaminas, hormonas o reguladores de crecimiento (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.9.2.1. Carbohidratos

Son sustancias orgánicas, como los azúcares, que están compuestos por tres elementos básicos como: Hidrógeno, oxígeno y carbono. Los azúcares son producto de la fotosíntesis, es por ello que es de vital importancia aplicar a las plantas que crecen *in vitro*, debido a que tienen baja intensidad lumínica (Abdelnour y Escalant, 1994). La sacarosa es el soluto adicionado al medio nutritivo en mayor cantidad como fuente de energía, y es preferido a otros carbohidratos (Barrueto, 2005).

2.9.2.2. Vitaminas

Las vitaminas forman parte de enzimas, por lo que son importantes para desempeñar una acción catalítica normal. Se clasifican en liposolubles e hidrosolubles (Barrueto, 2005). La vitamina que se ha demostrado como más importante dentro de un medio de cultivo es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizados con frecuencia para estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, riboflavina (Abdelnour y Escalant, 1994).

La más utilizada es la B1 (Tiamina) y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* son B2 (Riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (Ácido pantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina H (Biotina), vitamina E (α - tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico) (Roca y Mroginski, 1995).

2.9.2.3. Hormonas o Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas intervienen en varias respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, es decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos, además, de la cantidad de concentración, esta misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta (Aguilar, Melgarejo y Romero, 2010). En general, son tres grupos de hormonas las más empleadas: auxinas, citoquininas y giberelinas (Barrueto, 2005).

Las hormonas son factores estimulantes del desarrollo, pero este es uno de sus efectos y no su acción fundamental. En realidad, las moléculas directamente reguladoras de los procesos del desarrollo es el metabolismo las enzimas. Las hormonas son mensajeras cuyo papel sería el de un intermediario entre el estímulo (a menudo la luz o la temperatura) y la respuesta de la planta (germinación, floración)

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se les encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en las plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada.

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo

largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión.

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas, la principal es el ácido indol acético AIA. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades, principalmente donde se presentan procesos activos de división celular, es por ello que, se lo relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (Aguilar et al, 2010). Entre las acciones fisiológicas promovidas por las auxinas en la micropropagación están: la inducción de callos, inducción de raíces, establecimiento de suspensión celular, metilación de la citocina, formación de frutos (Barrueto, 2005; Jordán y Casereto, 2006).

Las citoquininas han sido consideradas estructuralmente como derivadas de adeninas o purinas, y dentro de este grupo se incluyen a: kinetina, zeatina y benzil amino purina. Las citoquininas intervienen en procesos de división celular, entre ellos, la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular, y en el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Aguilar et al, 2010). En el cultivo de tejidos es normalmente usada para promover el desarrollo de yemas adventicias a partir de callos o embriogénesis somática (Barrueto, 2005).

Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles.

La citoquinina es poco móvil aplicada en forma exógena, si se aplica en una yema, solo actúa en el lugar de aplicación. La citoquinina endógena parece tener transporte polar basipétalo, pero se desconocen el mecanismo y velocidad. Un efecto es producir mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, por lo que se le llama hormona de la división celular, así como la auxina hormona del alargamiento, esta caracterización no es absoluta ya que la citoquinina promueve un poco el alargamiento. El otro efecto es el retardo del

envejecimiento o senescencia de los órganos y los fenómenos a que esta da lugar como amarillamiento y caída de las hojas, sea por acción sobre el DNA o porque la presencia de citoquinina hace afluir, por un mecanismo no conocido, auxina y nutrientes a las hojas.

Las auxinas usadas junto con las citoquininas pueden estimular o suprimir la embriogénesis *in vitro*. La adición de auxinas tales como AIA y 2,4 -D al medio de cultivo en concentraciones elevadas, suprimen significativa o totalmente la embriogénesis mientras que los inhibidores de síntesis de auxina (7 azi-indol y 5-HNB) estimulan este proceso al igual que las altas concentraciones de citoquininas, especialmente cinetina y benzilaminopurina.

2.10. Métodos de propagación de plantas “*in vitro*”

2.10.1. Callogénesis “*in vitro*”

Los callos son un conjunto de células, procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo presenta células no diferenciadas, sin embargo, tiene la capacidad de conservar el poder de dividirse (Abdelnour y Escalant, 1994).

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en múltiples especies de plantas (Litz y Jarret, 1991). En todas las fases del cultivo de callo, el genotipo juega un papel importante para llegar a obtener éxito, por la cual se debe siempre trabajar durante la investigación con 2 a 3 genotipos a la vez.

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

El cultivo de callos puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal. La producción de callo requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, como un pedazo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Correia y Canhoto 2010). En cualquier caso, la inducción de callo representa

un proceso de dediferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación.

Para la inducción de callos se ha utilizado diferentes tipos de explantes, entre los más utilizados las hojas, sin embargo, todas las partes de una planta pueden ser utilizadas. Independientemente del explante usado, la edad del explante es fundamental puesto que este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado, contribuyen a la formación de el callo. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente está situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada.

La generación de plantas vía embriogénesis se realiza con secciones de tallo, ápices, meristemas, eje embrionario, tejido nuclear, callo, peciolos y cotiledones. La formación de estructuras embriogénicas y luego su formación de brotes y raíces va a depender de las características propias del explante, de los componentes químicos y físicos del medio de cultivo y de las condiciones de incubación; por otra parte, la diferenciación va a estar influenciada por la interacción entre auxinas y citoquininas, donde la predominancia de auxinas estimula la formación de raíces y la predominancia de citoquininas estimula la brotación (Martínez et al, 2004).

El cultivo de células vegetales en suspensión es una herramienta que permite conocer diversos aspectos del cultivo, como su comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico, así como controlar y optimizar las condiciones de cultivo para la producción de biomasa, o bien la producción de metabolitos secundarios empleando diferentes elicitores. Esta estrategia requiere un proceso inicial que incluye la formación de callo friable y posteriormente el establecimiento de suspensiones celulares. Para ello, es necesario conocer la cinética de crecimiento de las células y su comportamiento en estos sistemas, para así estimar el tiempo requerido de subcultivo y los días en que se produce el crecimiento activo del cultivo celular. Además, los callos pueden ser utilizados para hacer suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Normalmente, esta vía requiere de una elevada concentración de auxinas en la etapa de inducción de callo (Sánchez y Alvarenga, 2014).

2.10.2. Organogénesis

La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos, ya sea de los explantes o de los callos (Villalobos y Thorpe, 1993). La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes y por ende receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014), además, permitirán el desarrollo de meristemos, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur y Koncz, 2005).

La organogénesis se considera como un proceso morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, es decir, que a partir de una yema se forma un primordio unipolar que con su posterior desarrollo se forma un brote vegetativo, en el que siempre va a existir un enlace entre los brotes formados y el tejido paterno; estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final.

Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o a partir de callos (organogénesis indirecta). En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa.

La organogénesis es considerada como la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos técnicas: la formación de yemas axilares (organogénesis directa) y la formación de yemas adventicias (organogénesis indirecta).

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

Los meristemoides son similares a meristemas verdaderos, ya que éstos poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y si están en condiciones adecuadas puede formar yemas o raíces primarias. En la organogénesis la repuesta de los explantes depende del balance entre auxinas y citoquininas tanto en el medio de cultivo como las que existen en forma endógena en el explante (Cardoza, 2005).

2.10.2.1. Organogénesis Directa

Es la producción directa de yemas o brotes de un tejido, en el cual no hay formación de callo; esta técnica permite mejorar los rangos de multiplicación, así como también, para obtener plantas transgénicas (Cardoza, 2005). Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados varias veces (Hu y Wang, 1983).

La inducción de yemas axilares e inducción de yemas múltiples es una técnica que asegura la producción de material vegetal sin variación genética. Los brotes axilares se forman directamente de meristemas, que se encuentran en los nudos sin que existan cambios en su organización genética. La inducción de yemas múltiples es de gran importancia económica principalmente en plantas cultivadas, sin embargo, no es muy utilizada en especies forestales (Cardoza, 2005).

La producción de plantas con el empleo de organogénesis directa y de brotes axilares es una alternativa para el rescate y la preservación de los recursos filogenéticos de los bosques tropicales y de esta forma se puede mantener la dinámica y el equilibrio del ecosistema forestal y así como también del ambiente como una herramienta para la propagación masiva, reemplazando en un elevado porcentaje a los sistemas de propagación tradicional. De esta manera se podrán producir plantas de genotipo deseado con una alta estabilidad genética provenientes de bancos y jardines clonales (Daquinta et al. 2002).

Una de las desventajas que tiene esta técnica es lo tedioso del proceso, además implica costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante, se puede automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de bioreactores (Takayama y Akita, 1996) y sistemas de inmersión temporal de los explantes (Alvard et al., 1993; Jiménez et al., 1997).

2.10.2.2. Organogénesis Indirecta

Es el desarrollo de masas de células desorganizadas, y en proceso de desdiferenciación y rediferenciación, denominado callo. Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio, el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, a su vez, interactúan con los fitorreguladores, logrando un equilibrio para la formación de órganos (organogénesis), una vez llegado a esto la producción de callo se detiene. Este proceso involucra la diferenciación celular que a su vez refleja la expresión de la totipotencia celular, interacción celular y la reacción a señales específicas (Yépez, 2006); además la inducción de plantas usando esta técnica no asegura la fidelidad clonal, pero esta puede ser ideal en un sistema para la selección de variantes soma clonales debido a la variabilidad genética que existe en las células somáticas o debido a la inducción de mutaciones o cambios epigenéticos, con el fin de obtener caracteres deseados, además de la multiplicación de masa (Cardoza, 2005).

La formación de yemas adventicias, es la formación de estructuras *de novo*, a partir de meristemas preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o de varias células, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas (Cardoza, 2005). Se denomina estructuras *de novo* al brote adventicio que se obtiene de una célula callogénica en base al potencial para regenerar una nueva planta completa de acuerdo a la totipotencia celular (Aguilera, 2012).

Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo, en comparación con el método anterior de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción (Akita et al., 1994). La inducción de plantas vía la producción de callo ha sido usada para la producción de plantas transgénicas en las cuales el callo es transformado y las plantas son regeneradas (Mathur y Koncz, 2005). Además, con la técnica de caulogénesis indirecta para fines de micropropagación se ha logrado con el uso de citoquininas, principalmente BAP durante la etapa de inducción de callos de *Eucalyptus globulus* (Larson et al. 2006).

La organogénesis indirecta a menudo induce la variación somaclonal y permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable (Sala y Labra, 2003). Sin embargo, la rizogénesis *in vitro* y el cultivo de células a partir de callos podría ser utilizada para la producción de metabolitos

secundarios en biorreactores, lo cual resulta de suma importancia para una planta a la cual se le atribuyen numerosas características medicinales, como efectos analgésicos, anti-inflamatorios, astringentes, actividad antimicrobiana y antioxidante de sus hojas (Delporte et al. 2007).

Esta técnica de propagación *in vitro* tiene sus desventajas ya que el proceso productivo es realizado en varias etapas: producción de callos, brotes, crecimiento y enraizamiento. Además, presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni et al., 1986). Cabe recalcar que este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema.

2.11. Estudios similares

González et al. 2018 realizaron estudios para “Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja” donde los callos se cultivaron en medio de MS sólido suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: 2, 4-D en una concentración de 1,0 mg/l, y KIN en una concentración de 0,5 mg/l. Se observó que cuando los callos se cultivaron en MS sin hormonas (T1), la formación de embriones fue del 15 %. Cuando se añadieron auxinas (2,4-D) en una concentración 0,1 mg/l, la formación de embriones fue del 17 % (T2). Al combinar auxinas y citoquininas resulto ser la más efectiva, obteniéndose 28,33 % de formación de embriones con la combinación de 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg% KIN.

En la investigación realizada por Méndez (2018) sobre “Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de *cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja” los callos fueron inoculados en medio de cultivo MS sólido suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones: ANA en concentraciones de 0,3; 0,6; y 1,0 mg/l, y BAPA en concentraciones de 1,0; 1,5; y 2,0 mg/l. Además, Daquinta et al. (2002) en la investigación sobre “Inducción de callos y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L” en la combinación hormonal de 0.5 mg/l-1 BAP+0.25 mg/l-1 KIN, obtuvieron un 26% de regeneración de brotes en *Tectona grandis*, a partir de callos. En otro estudio realizado por Larson et al. (2006) sobre “Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*” en la combinación de 1 mg/l-1 BAP+0.1 mg/l-1 ANA obtuvieron el 62% de formación de brotes en *Eucalyptus globulus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área de estudio

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

El Laboratorio de Micropropagación Vegetal (Figura 1), se encuentra ubicado al sur de la ciudad, aproximadamente a 3 km de la ciudad de Loja, en las coordenadas UTM: 699837.48m E y 9554078.10m S, a 2136 m s.n.m



Figura 1. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

3.2. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina en la inducción de estructuras *de novo*

3.2.1. Obtención del material vegetal *in vitro*

El material vegetal que se utilizó para el desarrollo del trabajo de investigación, se obtuvo del banco de germoplasma de plantas germinadas *in vitro*, disponibles en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Las vitroplantas seleccionadas pertenecen, según la codificación, al árbol No. 11 del sector Zamora Huayco. Las características fenotípicas que se tomó en cuenta para seleccionar el material vegetal, fueron el estado físico de la planta, como: color de las hojas (verdes) y que no tengan problemas de marchitez y

contaminación; que el tamaño del explante tenga alrededor de 5 cm y que las vitroplantas estén vigorosas (Figura 2)



Figura 2. Obtención del Material Vegetal. a) Selección de vitroplantas. b) Soluciones madre MS y reguladores de crecimiento para el medio de cultivo. c) Preparación medio de cultivo.

3.2.1.1. Fase de inducción de callos

Luego de seleccionar las vitroplantas se procedió a establecer los ensayos para la inducción de callos, para lo cual, no fue necesario la desinfección de los explantes, por cuanto el material vegetal se encontraba creciendo en condiciones asépticas.

Para la inducción de callos se aplicó la metodología utilizada por Guartanza (2019), que consistió en preparar el medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con tiamina 1 mg/l^{-1} , mio-inositol 100 mg/l^{-1} , piridoxina 1 mg/l^{-1} , ácido nicotínico 2 mg/l^{-1} , glicina 1 mg/l^{-1} , ergostín $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$, sacarosa 2 % (como fuente exógena de carbono), Agar 6 g/l^{-1} (agente solidificante). Las combinaciones hormonales utilizadas, estuvieron conformadas por $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2, 4-D + $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de Kinetina. Luego se distribuyó, el medio de cultivo en frascos de vidrio, a razón de 25 ml por frasco, y se los esterilizó en la autoclave a 120°C de temperatura y $1,5 \text{ kg/cm}^2$ de presión, durante un tiempo de 20 minutos.

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar se realizó la inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis*, para lo cual, se diseccionaron segmentos de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm, se inocularon tres explantes por frasco (Anexo 22). Finalmente se procedió a etiquetar cada frasco, y se los llevó al cuarto de incubación, a una temperatura de $\pm 23^\circ \text{C}$, para la formación de callos los frascos estuvieron en total oscuridad, cubiertos con cartulina negra, como se observa en la Figura 3. El material de disección, completamente esterilizado, que se utilizó fue bisturí, pinzas, tijeras y cajas petri. Cabe señalar que, en esta fase solo se produjo la formación de callos, ya que los callos constituyen el material *in vitro* base para la formación de estructuras *de novo*, por lo tanto, en esta fase no se evaluó ninguna variable.

Las estructuras callogénicas se empezaron a formar a partir del quinto día de inoculación de explantes y después de los 45 días, las estructuras callogénicas tuvieron una consistencia dura con callos friables, listos para la inducción de estructuras *de novo* (Anexo 23)



Figura 3. Inducción de callos. **a)** Disección de material vegetal. **b)** Inoculación de explantes. **c)** Cuarto de luces (frascos cubiertos con cartulina)

3.2.1.2. Selección de callos

El material vegetal que se utilizó para la fase de formación de estructuras *de novo*, fue las mejores estructuras callogénicas. Para la selección de callos se tomó en cuenta: callos friables, con tamaño de 0,5 a 1,0 cm y de un color crema (Figura 4). No se realizó la desinfección de los callos, ya que el material vegetal estuvo bajo condiciones asépticas.



Figura 4. Callos seleccionados para formación de estructuras *de novo*

3.2.2. Fase de inducción de estructuras *de novo*

3.2.2.1. Preparación del medio de cultivo sólido

El medio de cultivo sólido se preparó con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con vitaminas como: Tiamina 1 mg/l^{-1} y mio-inositol 100 mg/l^{-1} ; sacarosa 2 %; agar 0,6 %. Las combinaciones hormonales utilizadas en esta fase, estuvieron conformadas por Ácido Indol Acético (AIA/auxina) y Kinetina (KIN/citoquinina) en diferentes concentraciones, que se detallan en el Tabla 3. Para el tratamiento testigo se empleó el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Tabla 3. Tratamientos para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES HORMONALES (mg/l ⁻¹)		CÓDIGO
	AIA	KINETINA	
T0	0,0	0,0	TESTIGO
T1	0,0	1,0	A1C1
T2	0,0	2,0	A1C2
T3	0,0	3,0	A1C3
T4	0,2	1,0	A2C1
T5	0,4	2,0	A3C2
T6	0,6	3,0	A4C3

El pH, del medio de cultivo, se ajustó a 5.8 ± 0.2 . Para bajar el pH se utilizó HCL (ácido clorhídrico) y con NaOH 1N (hidróxido de sodio) se aumentó el pH. Luego de haber terminado la preparación del medio de cultivo se procedió a distribuir de 25 ml en cada frasco de vidrio; finalmente, se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave a 120 ° C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos. Además, se puso a esterilizar el material de disección necesario para la inoculación (Figura 5).



Figura 5. Medio de cultivo. **a)** Sales minerales y reguladores de crecimiento. **b)** Preparación del medio. **c)** Medición de pH en el medio de cultivo. **d)** Esterilización de frascos (autoclave)

3.2.2.2. Inoculación *in vitro* de callos

La inoculación *in vitro* de los callos de *Cinchona officinalis* L, para la inducción de brotes *de novo*, se realizó en condiciones de total asepsia, dentro de la cámara de flujo laminar. Con ayuda del material de disección, completamente estériles, como bisturí y pinzas se procedió a retirar las partes necrosadas del material vegetal. Seguidamente, en una caja petri cubierta con papel absorbente se realizó la disección de los callos. Cada sección constituyó un explante y se inocularon dos callos por frasco; luego se colocó una etiqueta a cada frasco para su identificación respectiva (Figura 6).

Finalmente, se llevó los frascos al cuarto de luces, para mantenerlos en incubación a una temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 80 días. En la fase de inducción de estructuras *de novo* no se realizó ensayos en total oscuridad. La evaluación se realizó mediante la observación directa, a partir del segundo día hasta 80 días de inoculación.



Figura 6. Inoculación *in vitro* de callos de *Cinchona officinalis* (Fase 1)

3.2.3. Diseño experimental para la formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

En esta fase se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial de 2 x 3, teniendo en total 6 tratamientos, más un testigo y tres repeticiones. En el Tabla 4 se indica las diferentes concentraciones que se utilizó de cada hormona.

Tabla 4. Tratamientos para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

FACTOR	CONCENTRACIONES HORMONALES (mg/l^{-1})
Nivel de concentración de Auxinas (AIA)	0,2
	0,4
	0,6
	1,0
Nivel de concentración de Citoquininas (KIN)	2,0
	3,0

3.2.3.1. Especificaciones del Diseño experimental

La unidad experimental del ensayo fue un callo y se sembraron dos callos en cada frasco de vidrio. Cada tratamiento tiene 30 callos, el ensayo completo tiene un total de 210 callos. A continuación, en el Tabla 5, se detalla las especificaciones del diseño.

Tabla 5. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental	Un callo
Número de tratamientos	7

Número de repeticiones	3
Número total de frascos por repetición	5
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de callos por frasco	2
Número de callos por tratamiento	30
Número total de callos del ensayo	210
Número total de frascos del ensayo	105

Las variables evaluadas para la formación de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* fueron:

- Porcentaje de formación de estructuras *de novo*
- Número de días para la formación de estructuras *de novo*
- Número de brotes *de novo* por callo
- Altura de brotes *de novo*
- Número de raíces *de novo* por callo
- Longitud de raíces
- Porcentaje de contaminación
- Porcentaje de oxidación fenólica

Los datos se registraron en la ficha técnica que se observa en el Anexo 1, cabe recalcar que se realizó una ficha para cada variable a evaluar.

3.2.4. Hipótesis del modelo

H0. La combinación hormonal Auxina – Citoquinina, no influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

H1. La combinación hormonal Auxina – Citoquinina, influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

3.2.5. Análisis estadístico de datos, correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la fase de inducción de estructuras *de novo*, se introdujo los datos de las diferentes variables evaluadas en el Software IBM SPSS Statistics 23, donde se calculó los supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2020 se realizó un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis, y la prueba estadística con el test de

Bonferroni al 5 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.3. Metodología para evaluar el efecto hormonal de una citoquinina BAP en la inducción de estructuras *de novo* en *Cinchona officinalis* L.

3.3.1. Selección de callos

Se escogieron las mejores estructuras callogénicas, inducidas en la fase de obtención del material vegetal. El material vegetal que se utilizó para la fase de formación de estructuras *de novo*, fue las mejores estructuras callogénicas. Para la selección se tomó en cuenta el tamaño, color y estructura de los callos. No se procedió a realizar la desinfección, ya que el material vegetal es aséptico.

3.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido

El medio de cultivo basal utilizado fue con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con vitaminas como Thiamina 1 mg/l y mio-inositol 100 mg/l; sacarosa 2 %; agar 0,6 %. El regulador de crecimiento utilizado fue Bencil Amino Purina (BAP) en diferentes concentraciones, que se detallan en el Tabla 6. Para el tratamiento testigo se utilizó el mismo medio de cultivo, pero sin ninguna concentración de BAP.

Tabla 6. Tratamientos para evaluar el efecto de una citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES HORMONALES BAP (mg/l⁻¹)	CÓDIGO
T0	0,0	TESTIGO
T1	1,0	B1
T2	1,5	B2
T3	2,0	B3

El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con HCL o NaOH 1N, en agitación. Seguidamente, se procedió a colocar el medio de cultivo en frascos de vidrio, con una cantidad de 25 ml por frasco, luego fue esterilizado en la autoclave a 120°C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos.

3.3.3. Inoculación *in vitro* de callos

Se inocularon los callos de *C. officinalis* para la formación de estructuras *de novo*, en condiciones de total asepsia en la cámara de flujo laminar. En la caja petri cubierta con papel se realizó la disección de los callos, para lo cual se procedió a retirar las partes necrosadas del material vegetal. Se inocularon dos callos por frasco, con un total de 15 frascos por tratamiento (Figura 7). Finalmente, se mantuvo los frascos en el cuarto de incubación a una temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ y a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 80 días. Cada frasco estuvo rotulado de acuerdo al número de tratamiento, repetición, fecha de inoculación y lugar de procedencia, para su respectiva identificación.



Figura 7. Inoculación *in vitro* de callos de *Cinchona officinalis* L (Fase 2)

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

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial 1x3, con 3 tratamientos, más un testigo y tres repeticiones (Tabla 7)

Tabla 7. Concentraciones para evaluar el efecto de la citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

FACTOR	CONCENTRACIONES HORMONALES BAP (mg/l ⁻¹)
Nivel de concentración de Citoquinina (BAP)	1,0
	1,5
	2,0

3.3.4.1. Especificaciones del Diseño experimental

La unidad experimental es un callo, se sembraron dos callos por frasco de vidrio. Cada tratamiento con 30 callos, el ensayo completo tiene un total de 120 callos. En el Tabla 8, se detalla las especificaciones del diseño.

Tabla 8. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental	Un Callo
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número total de frascos por repetición	5
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de callos por frasco	2
Número de callos por tratamiento	30
Número total de callos del ensayo	120
Número total de frascos del ensayo	60

La evaluación se realizó mediante observación directa, a partir del segundo día hasta 80 días de inoculación, las variables evaluadas para la formación de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L fueron:

- Porcentaje de formación de estructuras *de novo*
- Número de días para la formación de estructuras *de novo*
- Número de brotes *de novo* por callo
- Altura de brotes *de novo*
- Número de raíces *de novo* por callo
- Longitud de raíces
- Porcentaje de contaminación
- Porcentaje de oxidación fenólica

Los datos se registraron en la ficha técnica que se observa en el Anexo 1, cabe recalcar que se realizó una ficha para cada variable a evaluar.

3.3.5. Hipótesis del modelo

H0. La adición de una Citoquinina, como el BAP, no influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

H1. La adición de una Citoquinina, como el BAP, influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

3.3.6. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la fase de inducción de estructuras *de novo*, se introdujo los datos de las diferentes variables

evaluadas en el Software IBM SPSS Statistics 23, donde se calculó los supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2020 se realizó un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis, y la prueba estadística con el test de Bonferroni al 5 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

3.4. Metodología para la difusión de resultados a actores sociales interesados

La difusión del tema de investigación, permitió dar a conocer la importancia de los resultados obtenidos, para ello se realizaron diferentes actividades, tales como:

- Socialización del proyecto de tesis al Equipo Técnico del Proyecto Cinchona del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja y actores interesados
- Elaboración de un manuscrito científico
- Folleto técnico con los resultados obtenidos
- Tríptico con los resultados obtenidos
- Elaboración y publicación de tesis

4. RESULTADOS

4.1. Determinación del efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

4.1.1. Número de días para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

A partir de los callos de *C. officinalis* L, que fueron sometidos a diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas, se logró evidenciar, que la formación de estructuras *de novo* empezó a partir del décimo día, después de la inoculación *in vitro* de callos, para todos los tratamientos (Anexo 24), a excepción del testigo (0,0 mg/l⁻¹ AIA+0,0 mg/l⁻¹ KIN) en el cual empezó la formación a partir del día 25 después de la inoculación. La formación de estructuras *de novo* en el T1 que estuvo conformado por 0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN, se estabilizó a los 55 días; mientras que en los tratamientos T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA+3,0 mg/l⁻¹ KIN) la estabilización fue a los 65 días y en el caso del tratamiento T0 (sin hormonas) se estabilizó a los 80 días (Figura 8).

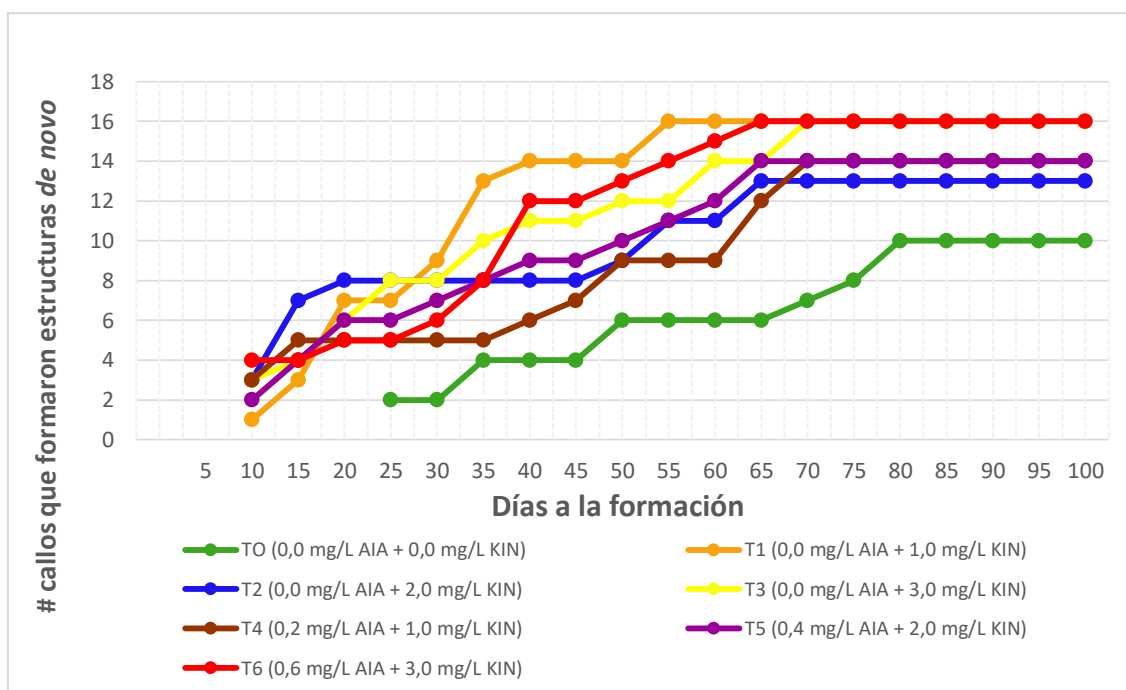


Figura 8. Número de días a la formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

4.1.2. Porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

Durante la fase de inducción de estructuras *de novo* de *C. officinalis*, a partir de callos, al término de 80 días de evaluación, los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de formación de estructuras *de novo* fue el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA+3,0 mg/l⁻¹ KIN) con un porcentaje de formación de 17,77 %; 14,83 % y 11,33 % respectivamente; siendo el tratamiento T0 (sin hormonas) el que presentó menor porcentaje de formación, con un 6,23 % (Figura 9).

Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5 % de probabilidad, se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos; por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula al ser $p > \alpha$ (0,05) en todos los casos (Anexos 2 y 3).

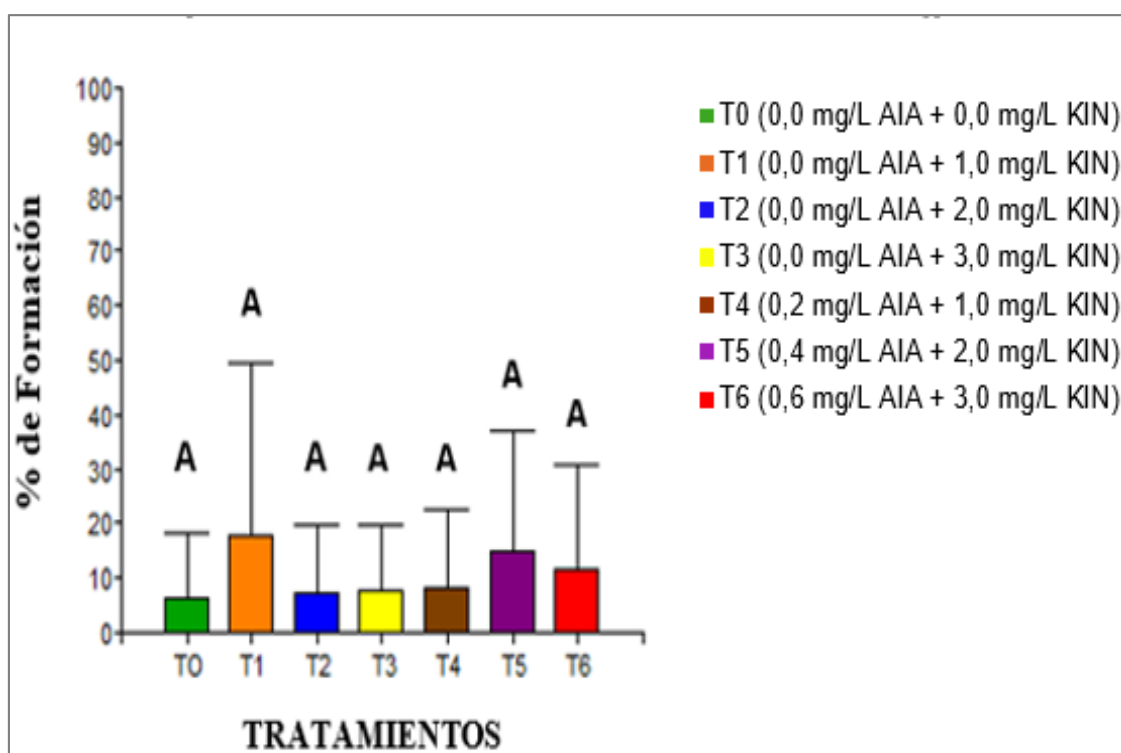


Figura 9. Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.1.3. Número de brotes *de novo* por callo de *C. officinalis* L.

Al finalizar el período de evaluación a los 80 días, se observó que el tratamiento que tuvo mayor cantidad de formación de estructuras *de novo* no diferenciadas fue el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un promedio de 15 estructuras *de novo* por callo, seguido por el tratamiento con la combinación hormonal de 0,4 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN con

un promedio de 12 estructuras *de novo*/callo, en comparación con el tratamiento T0 sin hormonas, que presentó la menor cantidad de estructuras *de novo*, con un valor promedio de cuatro estructuras *de novo*/callo como se observa en las Figuras 10 y 11. Los callos que formaron estructuras *de novo*, no fueron diferenciadas, las cuales pueden formar brotes o embriones.

En cada uno de los tratamientos, se obtuvo una respuesta semejante, es por ello que al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5 % de probabilidad se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula al ser $p > \alpha$ (0,05) en todos los casos (Anexos 4 y 5).

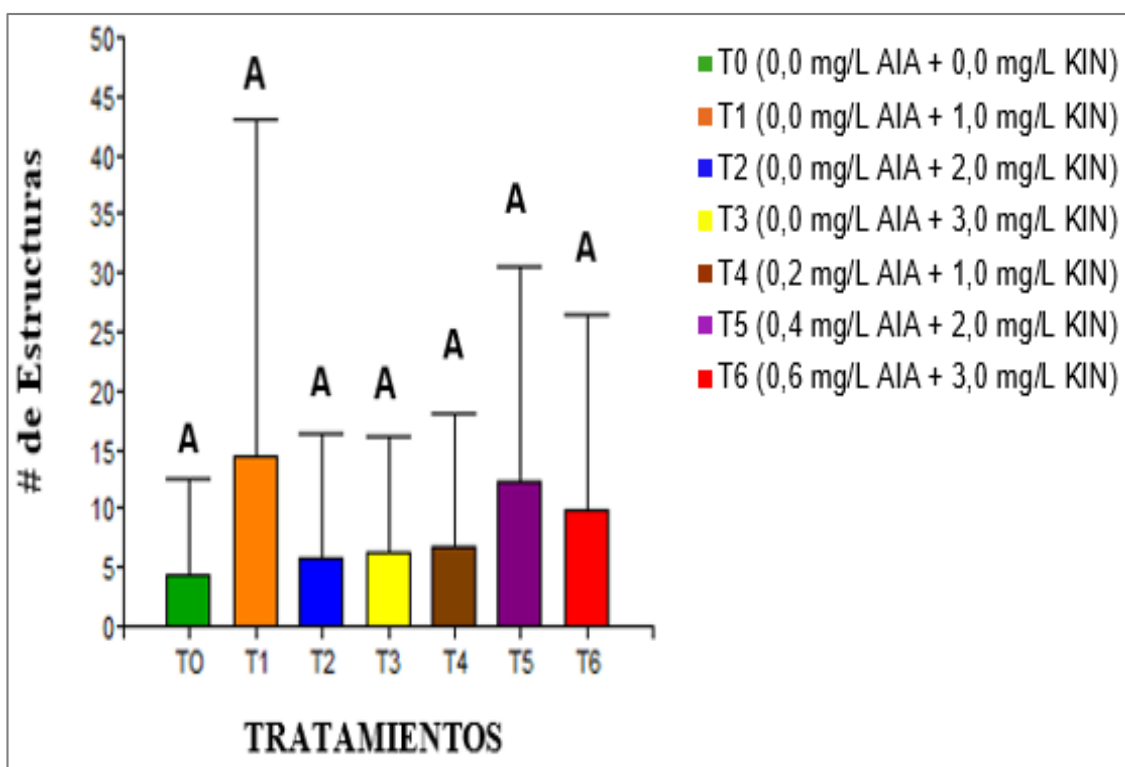


Figura 10. Número de estructuras *de novo* (sin estructura definida), a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Figura 11. Estructuras *de novo* (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de *C. officinalis* L: **a)** T0 (0,0 mg/l AIA + 0,0 mg/l KIN); **b)** T1 (0,0 mg/l AIA+1,0 mg/l KIN); **c)** T2 (0,0 mg/l AIA+2,0 mg/l KIN); **d)** T3 (0,0 mg/l AIA+3,0 mg/l KIN); **e)** T4 (0,2 mg/l AIA+1,0 mg/l KIN); **f)** T5 (0,4 mg/l AIA+2,0 mg/l KIN); **g)** T6 (0,6 mg/l AIA+3,0 mg/l KIN) **h)-i)** Callos necrosados, a los 80 días de evaluación.

4.1.4. Altura de brotes *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

La altura de las estructuras *de novo* se midió al finalizar el período de la evaluación que fue de 80 días, en donde, los tratamientos que registraron mayor altura fueron el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un promedio de 2,87 mm y T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) con 2,10 mm. El tratamiento que tuvo menor altura fue el testigo (T0) que no tuvo ninguna concentración hormonal, con un promedio de 1,43 mm (Ver Figura 12).

Los análisis estadísticos aplicados como análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5 % de probabilidad, mostraron que no existe diferencia significativa entre tratamientos con un $p > 0,05$ (Ver Anexos 5 y 7).

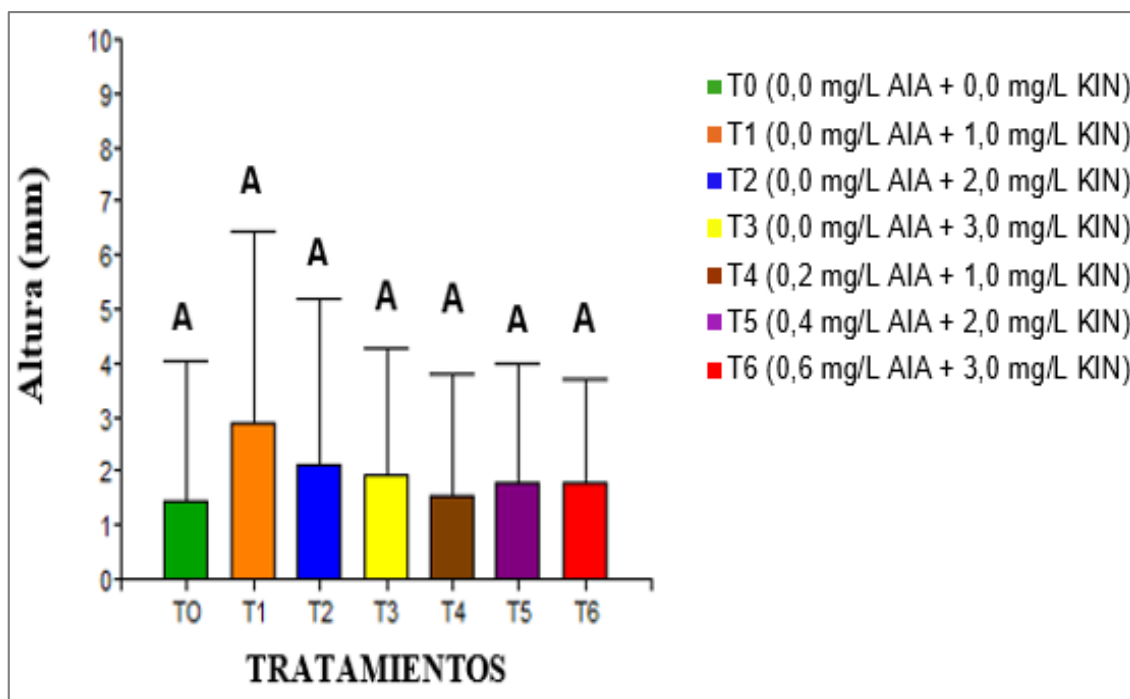


Figura 12. Altura de estructuras *de novo* (sin estructura definida), a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.1.5. Número y longitud de raíces *de novo* por callo de *C. officinalis* L.

Una vez finalizado el período de evaluación de 80 días, en las variables número y longitud de raíces, no se obtuvo resultados, debido a que no se observó formación de raíces en ninguno de los tratamientos del ensayo.

4.1.6. Porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

El mayor porcentaje de contaminación de estructuras *de novo*, se registró en los tratamientos T0 (sin hormonas), T3 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN), T5 ($0,4 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) y T6 ($0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN), con un porcentaje promedio de 6,7 %. Los tratamientos que no presentaron contaminación durante el periodo de evaluación fueron T1 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN), T2 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) y T4 ($0,2 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN).

La contaminación de callos y medio de cultivo fue causada por bacterias y hongos, la misma que se estabilizó a partir de los 15 días de inoculación, como se puede apreciar en la Figura 13.

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad, se observó que no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Anexo 8 y 9).

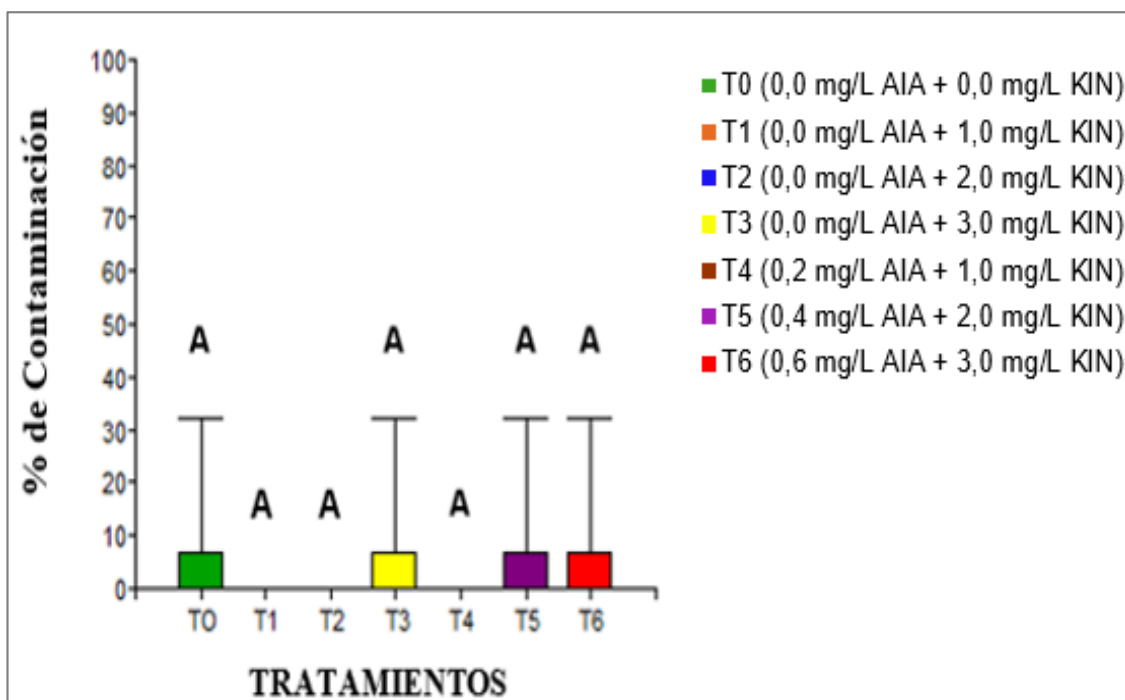


Figura 13. Porcentaje de Contaminación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.1.7. Porcentaje de fenolización de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

En la formación de estructuras *de novo*, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de fenolización, fue el tratamiento T1, que estuvo conformado por $0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN con un 16,7 %, los tratamientos que presentaron menor porcentaje de fenolización fueron el T3 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) y T4 ($0,2 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) con un 6,67 %, en comparación con el tratamiento T2 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN) que no presentó fenolización (Ver Figura 14).

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad, se observó que no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (Anexos 10 y 11).

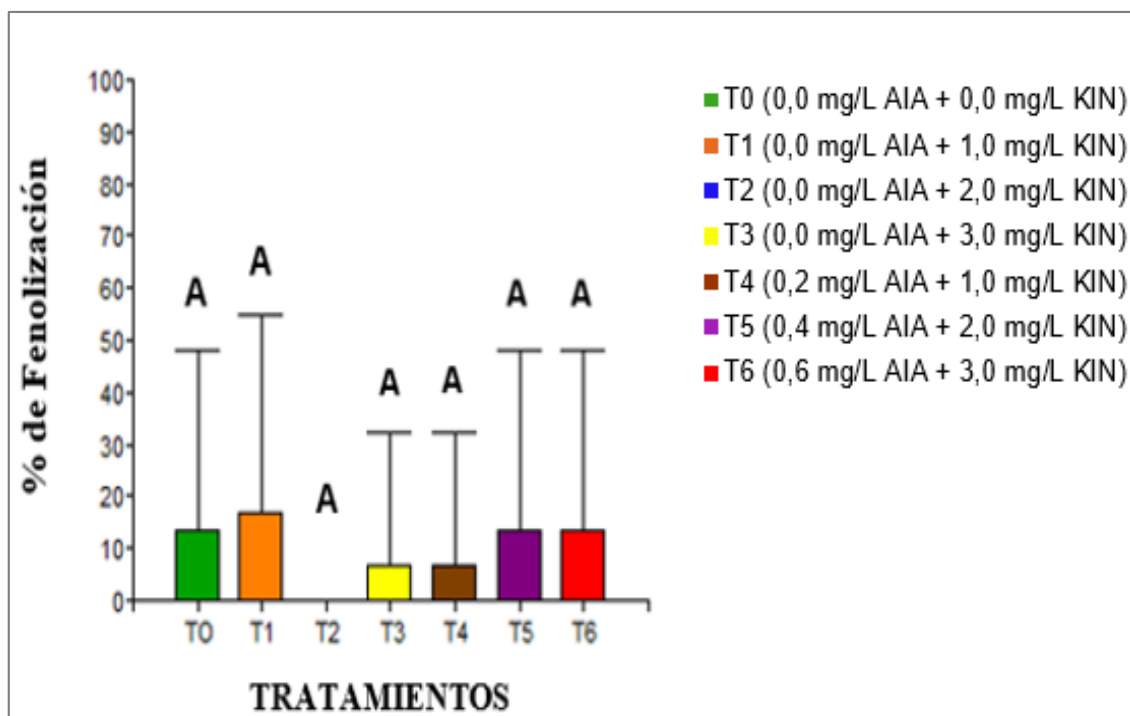


Figura 14. Porcentaje de Fenolización de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.2. Determinación del efecto de la Citoquinina, benzil amino purina (BAP) para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

4.2.1. Número de días para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

La formación de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitro plantas, se observó a partir del décimo día en los tratamientos T0 sin BAP, T1 con la adición de 1,0 mg/l⁻¹ BAP y T2 con 1,5 mg/l⁻¹ BAP; sin embargo, en el tratamiento T3 con 2,0 mg/l⁻¹ BAP la formación empezó a partir de los 15 días de inoculación *in vitro* de los callos (Anexo 25).

La formación de estructuras *de novo* con la adición de 2,0 mg/l⁻¹ BAP se estabilizó a los 55 días de evaluación; en el tratamiento T0 (sin hormona) y con 1,5 mg/l⁻¹ BAP (T2) fue a los 65 días y en el caso del tratamiento con 1,0 mg/l⁻¹ BAP (T1), a partir de los 70 días de evaluación se logró la estabilización, como se observa en la Figura 15.

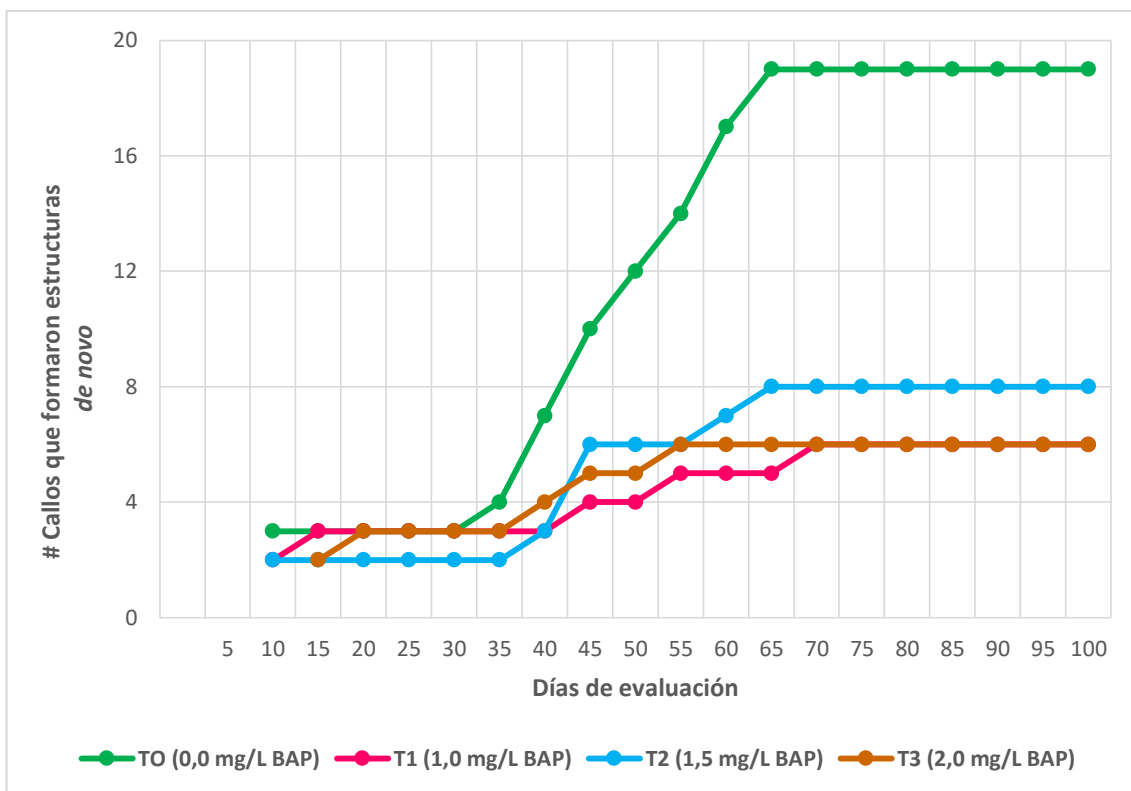


Figura 15. Número de días a la formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L., con una citoquinina.

4.2.2. Porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Respecto a la variable porcentaje de formación de estructuras *de novo*, como se puede ver en la figura 16, el tratamiento que tuvo mayor formación de estructuras *de novo* fue el T0 sin BAP con un 14,93 %; seguido de los tratamientos T1 conformado por 1,0 mg/l⁻¹ BAP y T2 con la adición de 1,5 mg/l⁻¹ BAP con porcentajes promedio de 1,67 % y 1,23 % respectivamente; el tratamiento que tuvo menor formación de estructuras *de novo* fue el tratamiento T3 constituido por 2,0 mg/l⁻¹ BAP con un 0,83 %.

Luego de realizar el análisis estadístico como el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad se observó que, si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (Anexos 12 y 13).

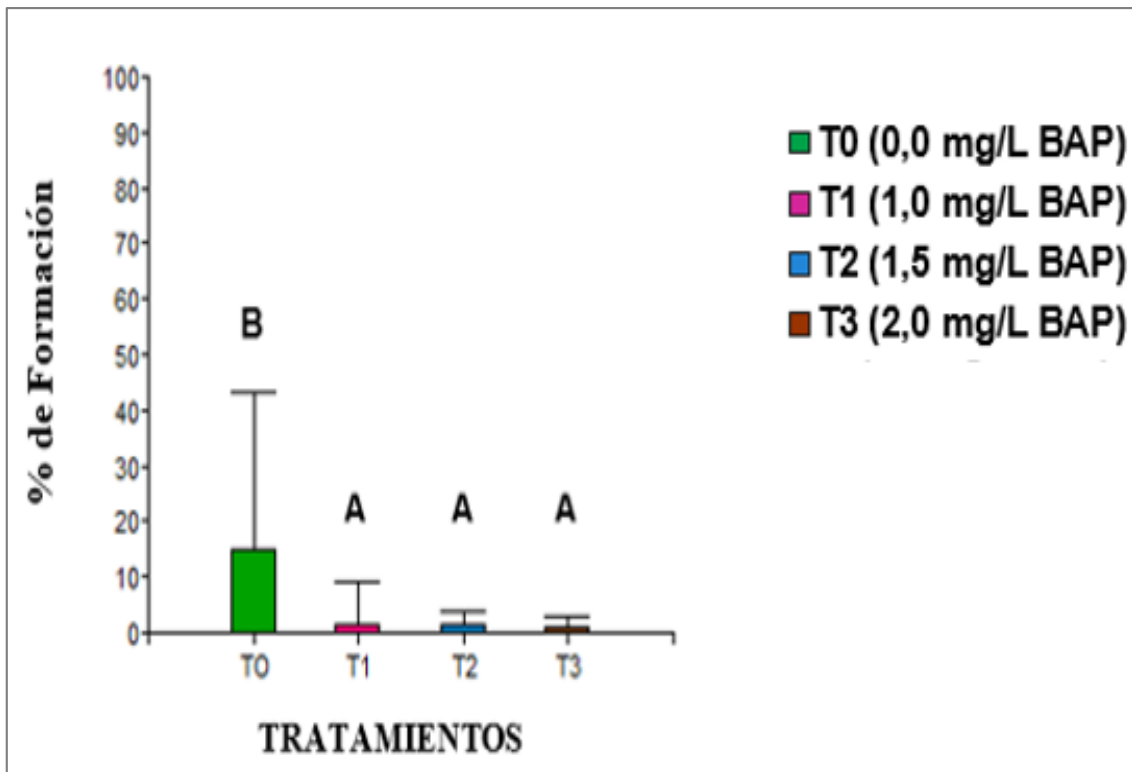


Figura 16. Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

4.2.3. Número de brotes *de novo* por callo de *C. officinalis* L

El tratamiento que tuvo mayor número de estructuras no diferenciadas fue el tratamiento testigo (T0), que no tuvo ninguna concentración hormonal, con un promedio de 12 estructuras *de novo* por callo y los tratamientos que tuvieron menor número de estructuras *de novo*, fueron el T1 con la adición de $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP y T2 constituido por $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP, con un promedio de 2 estructuras *de novo*/callo cada uno y el T3 ($2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP) con un promedio de una estructura *de novo* por callo, como se puede observar en las Figuras 17 y 18.

Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad, se observó que, si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (Anexos 14 y 15).

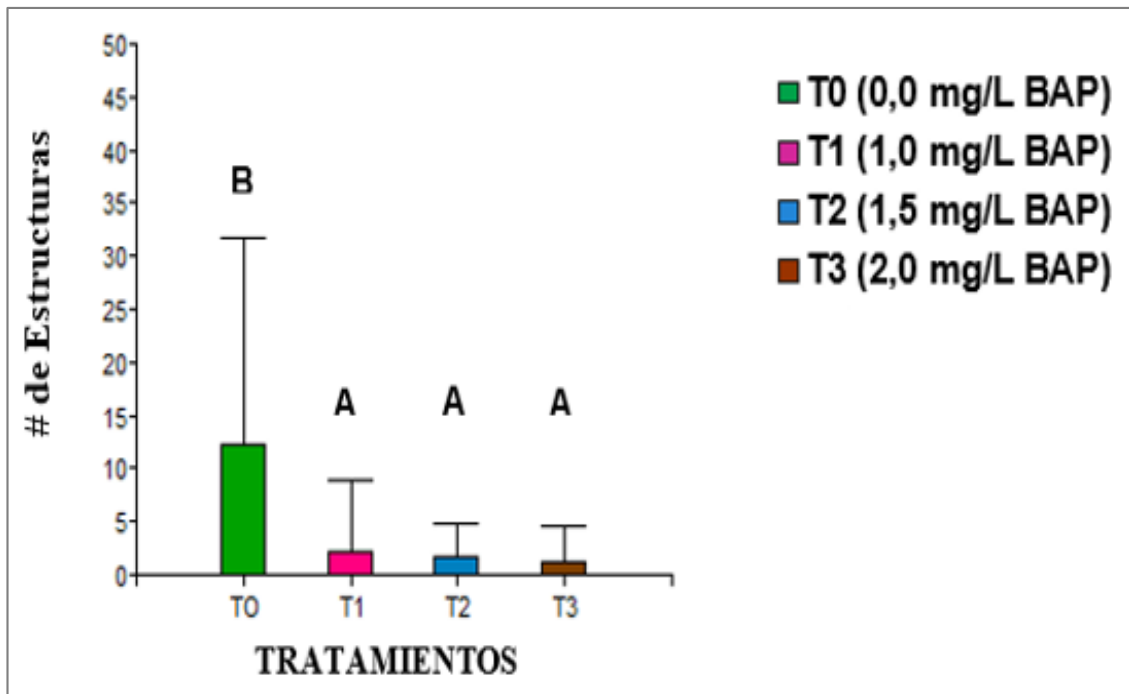


Figura 17. Número de brotes *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L. Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

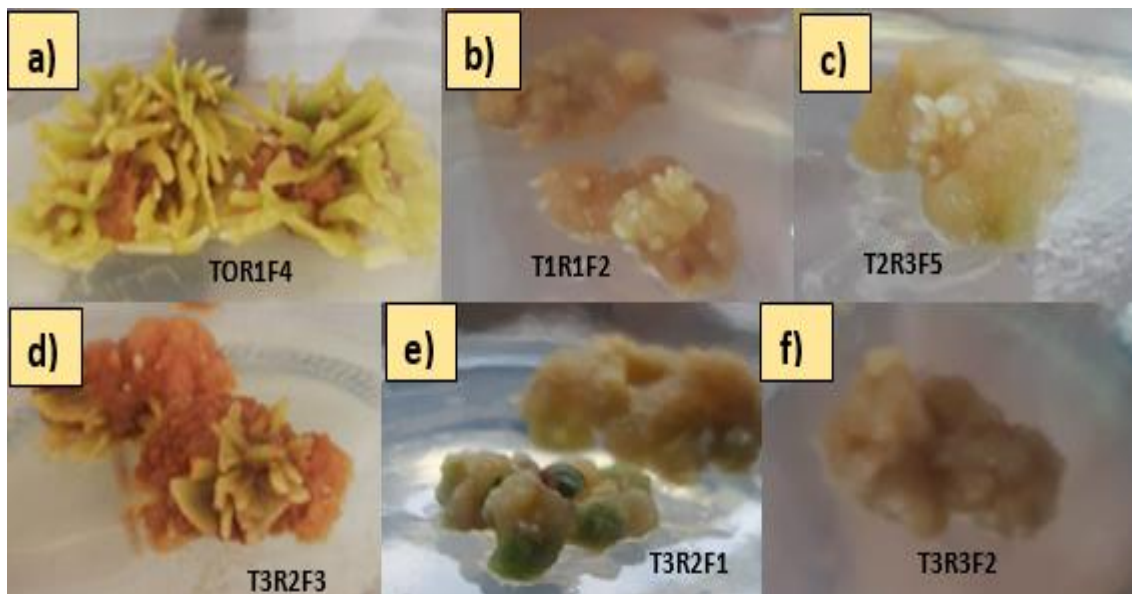


Figura 18. Estructuras *de novo* (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de *C. officinalis* L: **a)** T0 (0,0 mg/L BAP); **b)** T1 (1,0 mg/L BAP); **c)** T2 (1,5 mg/L BAP); **d)** T3 (2,0 mg/L BAP); **e)** Callo con partes verdes; **f)** MC contaminado, a los 80 días de evaluación.

4.2.4. Altura de brotes *de novo* de *C. officinalis* L

El tratamiento T0 sin BAP presentó mayor altura de estructuras *de novo*, con un promedio de 2,37 mm; sin embargo, los tratamientos que tuvieron menor altura fueron en las

concentraciones de 2,0 mg/l⁻¹ BAP (T3), 1,0 mg/l⁻¹ BAP (T1) y 1,5 mg/l⁻¹ BAP (T2), con una altura promedio de 0,97 mm; 0,83 mm y 0,53 mm, respectivamente (Figura 19).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad, mostró que si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Ver Anexos 16 y 17)

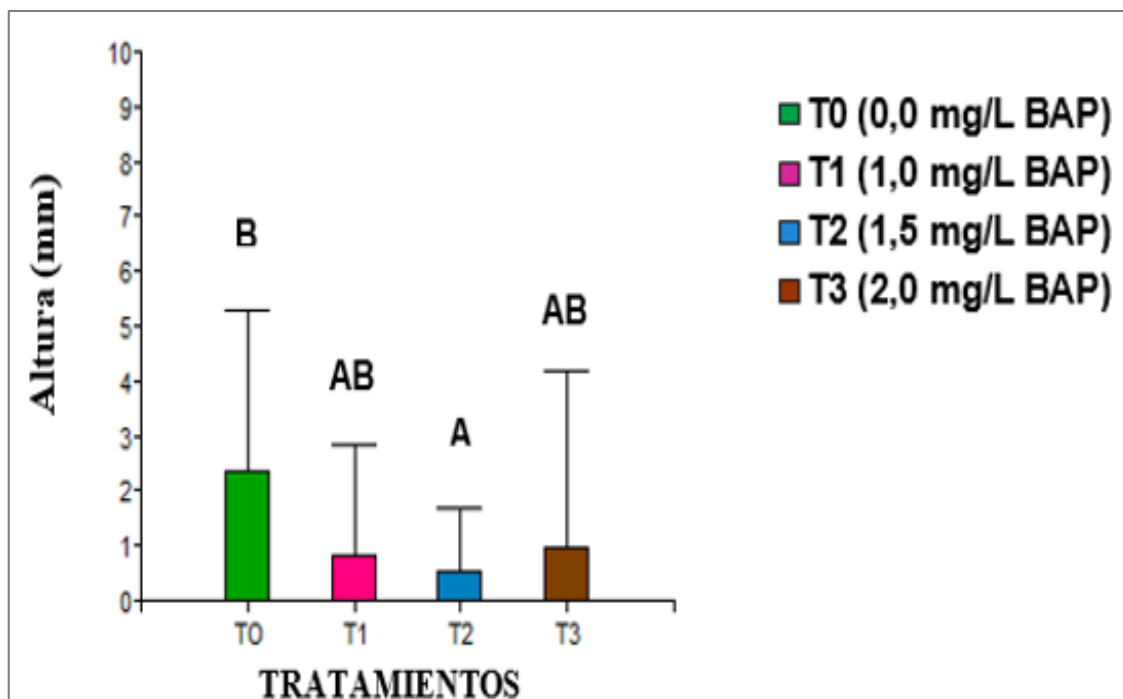


Figura 19. Altura de brotes *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.
Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

4.2.5. Número y longitud de raíces *de novo* por callo de *C. officinalis* L.

Respecto a las variables número y longitud de raíces *de novo* no se obtuvo resultados, ya que, durante el período de evaluación de 80 días, no se evidenció la presencia de raíz en ninguno de los tratamientos ensayados

4.2.6. Porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

Como se muestra en la Figura 20, el porcentaje de contaminación durante la formación de estructuras *de novo* fue bajo, después de los 17 días de inoculación se evidenció contaminación en el tratamiento T0 (testigo) con un 6,67 %, mientras que los tratamientos T1 (1,0 mg/l⁻¹ BAP), T2 (1,5 mg/l⁻¹ BAP) y T3 (2,0 mg/l⁻¹ BAP) no presentaron contaminación.

Según el análisis estadístico aplicado como el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad, se observó que, no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Anexos 18 y 19).

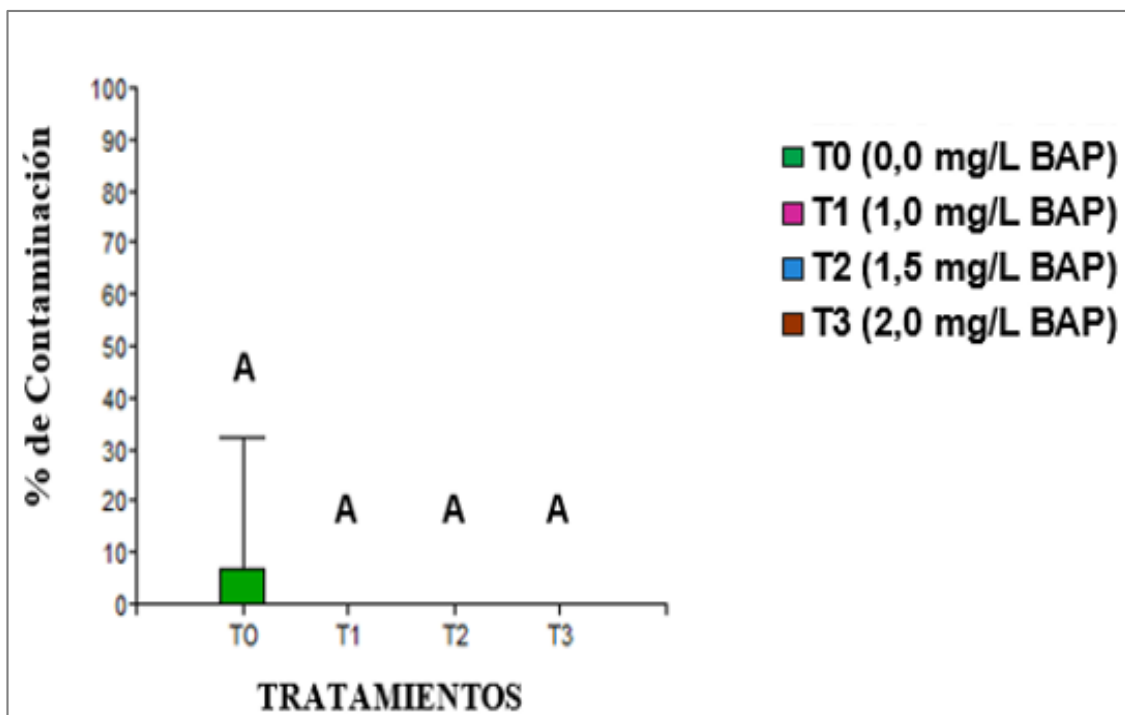


Figura 20. Porcentaje de Contaminación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.2.7. Porcentaje de fenolización de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Como se puede evidenciar en la Figura 21, el tratamiento T3, que tuvo 2,0 mg/l BAP fue el que presentó el mayor porcentaje de fenolización con un 13,33 %, seguido del tratamiento T2 constituido por 1,5 mg/l⁻¹ BAP con 3,33 %; y, finalmente los tratamientos que no presentaron fenolización fueron T1 (1,0 mg/l⁻¹ BAP) y el tratamiento testigo (T0).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5 % de probabilidad demostraron que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Anexos 20 y 21).

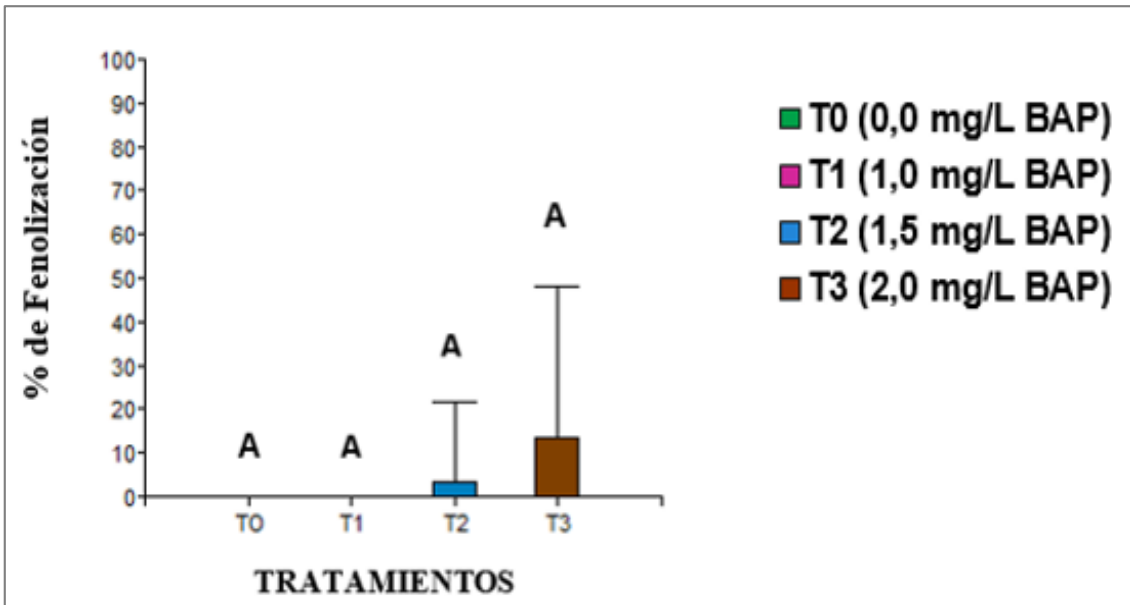


Figura 21. Porcentaje de Fenolización de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.3. Difusión de resultados generados a actores interesados

Por la importancia de la información que se generó en la presente investigación, se realizó la socialización y difusión de los resultados de esta investigación al equipo técnico del proyecto *Cinchona* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en el cual se dio a conocer los resultados obtenidos en la presente investigación (Ver Figura 22).

Se elaboró y entregó un tríptico divulgativo, con los resultados obtenidos de la investigación (Anexo 26); y, finalmente, se elaboró un folleto técnico informativo (Anexo 27) y un manuscrito científico de la tesis, con el propósito de difundir la información generada a los actores sociales interesados en la temática para su conocimiento y aplicación.



Figura 22. Difusión de resultados a actores sociales interesados

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto del balance hormonal AIA – KIN para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

En la presente investigación sobre la formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L, el mejor balance hormonal fue el tratamiento T1, que estuvo conformado por $0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA+ $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN, obteniéndose un porcentaje promedio de formación de 17,77 %; seguido de los tratamientos con las combinaciones hormonales de $0,4 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN (T5) y en $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ AIA + $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN (T6) con porcentajes de formación de 14,83 % y 11,33 % respectivamente, los resultados obtenidos variaron dependiendo de la concentraciones hormonales auxina/citoquinina; estos resultados son superiores a los obtenidos por Méndez (2018) en el estudio sobre procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *C. officinalis*, quien obtuvo en la combinación hormonal de $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ ANA+ $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP un 14,54 % de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre el porcentaje de formación de estructuras *de novo* (17,77 %) son inferiores al reportado por González et al. (2018) quienes evidenciaron la formación de embriones somáticos de *C. officinalis*, a partir de callos, en el tratamiento constituido por $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2, 4-D+ $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN, con un porcentaje de 28,33 %; así mismo, los resultados obtenidos en esta investigación, son inferiores en comparación con resultados en otras especies forestales reportados por Daquinta et al. (2002), quienes en una combinación hormonal de $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP+ $0,25 \text{ mg/l}^{-1}$ KIN, obtuvieron un 26 % de regeneración de brotes en *Tectona grandis*, a partir de callos; y, de acuerdo a lo señalado por Larson et al. (2006) en la combinación de 1 mg/l^{-1} BAP+ $0,1 \text{ mg/l}^{-1}$ ANA obtuvieron el 62 % de formación de brotes en *Eucalyptus globulus*.

Respecto a los días para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, se inició a los 10 días en todos los tratamientos, a excepción del T0, que inició la formación después de los 25 días de inoculación de callos, y se estabilizó a partir de los 55 días hasta los 80 días, dichos resultados son superiores a los reportados por Méndez (2018), quien en su investigación sobre la formación de estructuras *de novo* en *C. officinalis*, la formación de las estructuras *de novo* iniciaron a partir de los 5 días y se estabilizó a partir de los 100 días.

En el tratamiento que se evidenció el mayor número de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, (sin estructura definida) fue en el T1, que estuvo conformado por 0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN, con un promedio de 15 estructuras *de novo* por callo, este resultado es inferior a los obtenidos por Méndez (2018) en la investigación sobre procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras *de novo* de *C. officinalis*, quien al utilizar una combinación hormonal de 0,6 mg/l⁻¹ ANA+1,5 mg/l⁻¹ BAP obtuvo 22 brotes por callo para los explantes provenientes del huertos de Uritusinga y en la combinación hormonal 0,3 mg/l ANA+1,0 mg/l BAP obtuvo 30 brotes por callo para los de Zamora Huayco. Es importante mencionar que el desencadenamiento de la caulogénesis *in vitro* resulta de la interacción entre las citoquininas y auxinas, para ello se debe tener en cuenta la especie, el tipo de explanto y la edad fisiológica; además, la formación de brotes a partir de callos, va a depender de una relación óptima entre las concentraciones totales de citoquininas y de auxinas exógenas y endógenas (Larson et al. 2006).

En lo relacionado a la altura de las estructuras *de novo* de *C. officinalis*, (sin estructura definida) el valor más alto se encontró en el tratamiento T1, que estuvo conformado por 0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN, con una altura promedio de 2,87 mm, este resultado es inferior al reportado por Castellanos et al. (2006) quienes al utilizar una combinación hormonal conformada por 10 mg/l⁻¹ BAP+0,5 mg/l⁻¹ ANA, obtuvieron una altura de brotes en *Paulownia elongata* de 2 cm.

Todos los tratamientos ensayados donde se probó la combinación hormonal AIA (0,2; 0,4 y 0,6 mg/l⁻¹) y KIN (1,0; 2,0 y 3,0 mg/l⁻¹), no permitieron la formación de raíces adventicias en ninguna de las estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, durante el período de evaluación de 80 días, cabe recalcar que, los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Daquinta et al. (2002) en el cual no se evidenció formación de raíces en los brotes en *Tectona grandis*, a partir de callos, en ninguno de los tratamientos ensayados, en los cuales aplicaron diferentes combinaciones de BAP (0,25; 0,5 mg/l⁻¹) y KIN (0,12 y 0,25 mg/l⁻¹); por lo que sería importante ensayar nuevas concentraciones hormonales, únicamente, a base de auxinas en pequeñas concentraciones, por cuanto de acuerdo a lo que manifiesta Pierik (1990), las auxinas en bajas concentraciones, permiten la inducción de raíces adventicias de los explantes.

Por otro lado, Chamba (2017), también manifiesta que en la fase de enraizamiento de *C. officinalis* L, con la aplicación hormonal de ANA en 1,0 mg/l⁻¹, se promueve la formación

de raíces a partir de una organogénesis indirecta o callos y concluye que esta hormona (ANA) da buenos resultados en la inducción del crecimiento de tejido callogénico, fenómeno que se presenta particularmente en ciertas especies vegetales de la familia de las rubiáceas.

En lo relacionado al porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, a partir de callos, el porcentaje fue bajo en cada tratamiento, con un porcentaje de 6,67 % en los tratamientos T0 (sin hormonas), T3 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 3,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) y el T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA + 3,0 mg/l⁻¹ KIN); este porcentaje de contaminación es igual a los reportados por Lima (2016), quien en el estudio sobre procesos biotecnológicos para la propagación *in vitro* de *C. officinalis* L, obtuvo un porcentaje de contaminación de 6,67 %, en las combinaciones hormonales de 0,2 mg/l⁻¹ de ANA+2,0 mg/l⁻¹ de BAP y 0,2 mg/l⁻¹ de ANA+2,0 mg/l⁻¹ de KIN, mientras que Chamba (2017), en su investigación obtuvo un porcentaje de contaminación de 24,90 % de contaminación en el brotamiento de *C. officinalis*. Los resultados del porcentaje de contaminación son bajos, puesto que se utilizó vitroplantas que se encuentran creciendo en condiciones asépticas.

La contaminación de los explantes es independiente del tipo de medio de cultivo o reguladores de crecimiento que se utilice, la contaminación es una de las desventajas que puede llegar a tener en la micropropagación *in vitro*, por ende, la contaminación puede estar presente incluso cuando se trabaja con material aséptico, es por ello que, Hernández y González (2010) mencionan que la contaminación *in vitro* puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio, los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras, conocidos generalmente como vitropatógenos.

En cuanto a la fenolización de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, el mayor porcentaje de fenolización se presentó en el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un 16,67 %, resultado que es similar al obtenido por Méndez (2018) quien obtuvo un porcentaje de fenolización de 17 % en la combinación hormonal de 0,3 mg/l⁻¹ ANA + 1,0 mg/l⁻¹ BAP. La oxidación fenólica de los tejidos, es un fenómeno fisiológico fotoactivo porque se manifiesta en la presencia de la luz y el oxígeno, razón por la cual se considera un grave problema en el establecimiento de cultivos *in vitro*, principalmente de las especies leñosas, es por ello que, Hernández y González (2010) manifiestan que el establecimiento

del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, principalmente de especies frutales, se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos, este fenómeno ocurre por la acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas; además, los mismo autores mencionan que, los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos.

5.2. Efecto de la Citoquinina, benzil amino purina (BAP) para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

La formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, con el uso de BAP en concentraciones de 1,0; 1,5; y 2,0 mg/l⁻¹ fue sumamente bajo, la formación empezó a los 10 días después de la inoculación *in vitro* de callos, y se estabilizó a partir de los 55 días de inoculación. Cuando se añadió 1 mg/l⁻¹ de BAP (T1) el porcentaje de formación de estructuras fue de 1,67 %; sin embargo, cuando se aumentó la concentración de BAP a 1,5 mg/l⁻¹ (T2) y 2 mg/l⁻¹ (T3) el porcentaje de formación de estructuras disminuyó a 1,23 % y 0,82 % respectivamente. Mientras tanto, el tratamiento testigo T0 (sin hormona) presentó la mayor formación promedio de estructuras con un 14,93 %, estos resultados son relativamente bajos, en comparación a los obtenidos por González et al. (2018), quienes en la inducción de embriones somáticos a partir de callos de *C. officinalis* con la adición de 0,1 mg/l⁻¹ de 2-4D (auxina), obtuvieron un 17 % de formación de embriones, mientras que en el tratamiento sin hormonas (T0) obtuvieron un 15 % de formación de embriones.

La presencia de estructuras *de novo* en el tratamiento T0 (sin hormona) puede ser debido a que el medio de cultivo sólido para la inducción de los callos estuvo conformado por altas concentraciones de auxinas y citoquininas (3,0 mg/l⁻¹ de 2, 4-D + 0,5 mg/l⁻¹ KIN) y por lo tanto, estas hormonas hayan influido en la formación de estructuras *de novo*, esto se corrobora con lo mencionado por Rodríguez et al. (2014), quienes mencionan que si el objetivo es regeneración indirecta de plantas se debe inducir los callos a partir de explantes sin hormonas o a base del uso de citoquininas como BAP, zeatina (ZEA), kinetina (KIN) o tiadizuron (TDZ) en bajas concentraciones, con la finalidad de que las hormonas utilizadas para la inducción de callos no influyan en la formación de estructuras *de novo*, además, esta respuesta de formación de estructuras *de novo*, en el tratamiento testigo (T0), pudo ser debido a que el explante ya contenía de forma endógena la cantidad

suficiente de citoquininas para la inducción de estructuras *de novo*; de acuerdo a Pierik (1990) este fenómeno es conocido generalmente como habituación, donde los explantes después de un número de subcultivo se hacen adictos a una determinada hormona y las células pueden seguir creciendo, inclusive, sin adición de hormonas, hasta un determinado tiempo.

En lo relacionado al número de estructuras *de novo* (sin estructura definida) de *C. officinalis* L, a partir de callos, el tratamiento testigo (sin hormonas) fue el que presentó mayor formación de estructuras *de novo*, con un promedio de 12 estructuras *de novo* por callo, este resultado es superior en relación con otras especies forestales como *Tectona grandis*, donde Daquinta et al. (2002) reportan que el tratamiento testigo no tuvo formación de brotes; esto puede deberse a la presencia de las auxinas y citoquininas endógenas durante la fase de inducción de callos por lo que la presencia de estas hormonas en el medio de cultivo, pueden haber influido en la formación de estructuras *de novo*, principalmente en los tratamientos testigos. Las citoquininas endógenas pueden influir no solo en la cantidad de formación de brotes, sino que también intervienen otros factores como son las diferentes especies, el órgano del vegetal, el estado de desarrollo y de las concentraciones endógenas y exógenas de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. El éxito de la caulogénesis dependerá de una relación óptima entre las concentraciones totales de citoquininas y de auxinas exógenas y endógenas (Rodríguez et al., 2014)

La mayor altura que se registró en las estructuras *de novo* (sin estructura definida) de *C. officinalis* L, fue en el tratamiento testigo T0 sin el BAP con un promedio de 2,37 mm; con relación a estudios con otras especies forestales, el resultado de la esta investigación es inferior a los obtenidos por Rodríguez et al. (2014) donde la altura de brotes de *Ugni molinae*, a partir de callos, en la combinación hormonal 0,1 mg/l⁻¹ ANA+1 mg/l⁻¹ BAP fue de 1,35 cm en cotiledones y en la combinación 0,1 mg/l⁻¹ ANA+0,5 mg/l⁻¹ BAP obtuvo 1,45 cm en hipocótilos; de igual forma los resultados obtenidos por Marulanda et al. (2005) son superiores a esta investigación, ya que los embriones somáticos de *Guadua angustifolia* en concentraciones de 6 mg/l⁻¹ de 2-4D alcanzaron alturas de 5-10 mm.

Respecto a la variable formación de raíces en estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, no se evidenció formación de raíces en ninguno de los tratamientos, es por ello que una vez formadas las estructuras *de novo*, estas estructuras se deben pasar a un medio de cultivo con hormonas que permitan la formación de raíces, como ya se mencionó anteriormente

Chamba (2017), sugiere que con la aplicación hormonal ANA en la concentración de $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ resulta ser el más efectivo para la formación de raíces en estructuras que son inducidas a partir de una organogénesis indirecta o callos.

En esta fase el porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, fue bajo, se evidenció contaminación únicamente en el tratamiento testigo con un 6,67 %, este resultado es superior a los obtenidos por Méndez (2018), quien obtuvo un porcentaje de 3,33 %, en las combinaciones hormonales de $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ ANA+ $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP y en $0,9 \text{ mg/l}^{-1}$ ANA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP.

En lo relacionado al porcentaje de fenolización en estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, el mayor porcentaje fue de 13,33 % en el tratamiento T3 ($2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP), resultado que es igual al reportado por Méndez (2018), quien obtuvo un 13,33 % de fenolización en la combinación hormonal $0,9 \text{ mg/l}^{-1}$ ANA + $2,0 \text{ mg/l}^{-1}$ BAP.

6. CONCLUSIONES

- En la fase de inducción de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, a partir de callos, las combinaciones hormonales AIA – KIN no ejercieron un efecto significativo sobre la cantidad y calidad de las estructuras *de novo*.
- El medio de cultivo MS con la adición de 0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN (T1) fue el tratamiento que logró el porcentaje más alto (17,77 %) de formación de estructuras *de novo*.
- La formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, con el uso de una sola citoquinina (BAP) en concentraciones de 1,0 - 1,5 y 2,0 mg/l⁻¹ fue bajo con porcentajes inferiores al 2 % de formación, con lo cual se evidenció que a medida que se incrementó la concentración de BAP, el porcentaje de formación de estructuras *de novo* fue menor.
- De todos los tratamientos ensayados, ninguno de los tratamientos manifestó proliferación de raíces adventicias en las estructuras *de novo* de *C. officinalis* L, por lo que es necesario pasar las estructuras a otro medio que permita la formación de raíces.

7. RECOMENDACIONES

Se debe tener en cuenta la selección de la fuente inicial del explante, como el tamaño del explante con las diferentes partes de las vitroplantas a utilizar (hojas, peciolo, parte media de la hoja), puesto que si los explantes no poseen buen tamaño pueden morir antes de iniciar el proceso de dediferenciación celular.

Una vez formado los callos se recomienda pasar los mismos, a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento por algunos días, con la finalidad de que las hormonas utilizadas para la formación de callos no influyan en la inducción de brotes *de novo*.

Para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos, donde la fuente inicial del explante sea de forma variada (hojas, tallos, segmentos de hojas, semillas, peciolo, flores) con la finalidad de conocer en que fuente de tejido u órgano se inducen mayor formación de estructuras *de novo*.

Para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando nuevas concentraciones de BAP y otras citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones a las utilizadas en la presente investigación.

Para la inducción de raíces adventicias en las estructuras *de novo* de *C. officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando diferentes concentraciones de auxinas

Para investigaciones futuras, se recomienda dar el siguiente paso en temas de biotecnología, como son los estudios histológicos y genéticos de las estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

Continuar realizando trabajos de investigación de *C. officinalis* donde exista la vinculación con instituciones interesadas o inmersas en temas ambientales, con la finalidad de desarrollar y ejecutar proyectos de reforestación con *Cinchona* en diferentes zonas de Loja, y, por ende, asegurar la conservación de la especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., y Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Turrialba - Costa Rica: CATIE.
- Acosta, S. M. (1989). La Cinchona o Quina PLanta Nacional del Ecuador. *Acad. Colomb. Cienc*, XVII(65), 300 - 306.
- Aguilar, M. C., Melgarejo, L. M., y Romero, M. (2010). *Fitohormonas*. En L. M. Melgarejo, *Experimentos en Fisiología Vegetal* . Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Aguilera, G. (2012). *Estandarización de una metodología para la inducción de callos embriogénicos en genotipos híbridos de coco, Cocos nucifera L. (ARECALES: ARECACEAE) a partir de cultivo in vitro de inflorescencias inmaduras*. Colombia : Universidad Nacional de Colombia sede Palmira facultad de Ciencias Agropecuarias departamento de Ciencias Biológicas Palmira.
- Aguirre, M. Z., y Aguirre, M. N. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *ARNALDOA*, XXIV(2), 523-539.
- Akita, M., Shigeoka, T., Koizumi, Y., y Kawamura, M. (1994). Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*, 13(3), 180-183.
- Alvard, D., Cote, F., y Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*. 32(1), 55-60.
- Anda, A. (2002). *La Cascarilla*. Loja - Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Anderson, L. (1999). A revisión of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchonae). *Memories of the New York Botanical Garden*, VI(80), 1-75.
- Andersson, L., y Taylor, C. (1994). *Rubiaceae-Cinchonaceae-coptos apelteae*. En Harling G. Andersson L (Eds), *Flora of Ecuador*. Ecuador.
- Armijos, R. (2016). *Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somoclonal de Cinchona officinalis Linneo*. Madrid - España: Universidad Politécnica de Madrid.

- Barrueto, P. (2005). El cultivo de tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, P. Barrueto, M. Cordeiro, & D. Durzan, *Biotecnología Vegetal* (págs. 31-44). Santiago - Chile: PROGRAF Impresores.
- Biopiratería, C. N. (2018). *Quina: Cinchona sp.* Perú: BioPat.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales situación actual y aspectos importantes para su conservación.* Ecuador: TRAFFIC Interntational.
- Cancho, S. (2017). *Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de Cinchona krauseana L. Andersson y C. calisaya Wedd. (Rubiaceae).* Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cardoza, V. (2005). *Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter 5. Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications.*(2005) ed. . Stewart, C.N.
- Castellanos, O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., y Rodríguez, B. (2006). Organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Pawlonia elongata*. *e-Gnosis*, 4(15), 1-12.
- Cerqueda, H. (2010). *Propagación sexual y asexual de la pitahaya (Hylocereus spp).* Oaxaca - México: Instituto Politécnico Nacional.
- Chamba, L. (2017). *Procesos Biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de Cinchona officinalis L., a partir de vitroplantas en la Argelia - Loja.* Loja-Ecuador.
- Conde, M. (2016). *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie.* Loja - Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Correia, S., y Canhoto, J. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 1 - 13. doi:10.1007/s00709-010-0130-z
- Cruz, M., y Irigoyen, J. (2005). *Guía técnica de semilleros y viveros. (No. IICA-F01 58).* El Salvado: Ministerio de Agricultura y Ganadería, Santa Techa (El Salvador) Programa Nacional de Frutas de El Salvador, Santa Techa (El Salvador) IICA.

- Cuvi, N., y Acosta, M. (2005). *El Conservacionismo en el Ecuador (1936-1953)*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, CEHIC-UAB.
- Daorden, M. E. (2012). *Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales*. Buenos aires - Argentina: E.E.A. INTA SanPedro.
- Daquinta, M., Ramos, L., Capote, I., Lezcano, Y., Rodriguez, R., y Escalona, M. (2002). Inducción de callos y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L. *Biotechnologia vegetal*, 2, 15-19.
- Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M., Peredo, N., y Silva, X. (2007). Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), 162-165.
- Espinosa, C., y Ríos, G. (2014). *Patrones de crecimiento de Cinchona officinalis in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas*. Loja - Ecuador: UTPL.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura); MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). (2015). *Especies forestales leñosas arbóreas y arbustivas de los bosques montanos del Ecuador*. Quito.
- Galeano, V. D., y Galeano, H. D. (2009). *Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades*. AHYAT.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp). Distribución, caracterización de hábitat y arquitectura*. Loja - Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- González, V. K., Eras, V. H., Moreno, J., Minchala, J., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2018). Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja, Ecuador. *Rev. Tzhoecoen*, 10(2), 299-310. doi:10.26495/rtzh1810.226115
- Guartanza, J. (2019). *Procesos Biotecnológicos para la Implantación e Inducción de callos en Cinchona officinalis L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja*. Loja - Ecuador: Universidad Nacional de Loja.

- Hernández, P. (2015). *Tratado metódico y práctico de materia médica y de terapéutica. Fundado en la ley de los semejantes; China – Cinchona officinalis – Quina – Materia médica.*
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *In Vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&p
- Hu, C. V., y Wang, P. J. (1983). *Meristem, shoot tip and bud cultures. En: Handbook of plant cell. Evans, D.A. Ammirato, P.V.; Yameda, Y.*
- Jiménez, E., Capote, A., Pérez, N. Q., de Fera, M., Barbon, R., & Pérez, J. (1997). *Producción de microtubérculos de papa (Solanum tuberosum L.) en sistemas de inmersión temporal. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas.*
- Jiménez, F., y Agramonte, D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Bioteología Vegetal*, XIII(1).
- Jiménez, P. (2019). *Historia de la Quina: De lucha contra la malaria a la aparición de la tónica.* Madrid: Universidad Complutense.
- Jordán, M., y Casereto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento.* Chile: Universidad de La Serena. Obtenido de <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Larreátegui, D., y Lafuente, L. (2013). Revisión Histórica Médica: El árbol de quina, 400 años de su descubrimiento en Ecuador. *Metro Ciencia*, XXI(1), 1-8.
- Larson, C. G., Gómez, C., Sánchez, M., y Ríos, D. (2006). Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *BOSQUES*, 27(3), 250-257.
- Lima, R. (2016). *Procesos Biotecnológicos Para La Propagación In Vitro de Cinchona officinalis L., A Partir De diferentes Fuentes De Material Vegetal.* Loja-Ecuador.

- Litz, E. R., y Jarret, R. L. (1991). *Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: embryogenesis. T. A. Thorpe ed. In vitro Embryogenesis in Plants-Netherlands, 155-203.*
- Madsen, J. (2002). *Historia cultural de la cascarilla de Loja, Botánica austroecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe.* Quito - Ecuador .
- Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A., y Barrero, D. (2004). *Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas.* Bogotá-Colombia.
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., y Gutiérrez, M. (2004). Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus urophyllas* S. T. BLAKE. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 10(2), 83-92.*
- Marulanda, M. L., Gutiérrez, L. G., y Márquez, M. d. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia*. KUNTH. *Actual Biol, 27 (82), 5-15.*
- Mathur, J., y Koncz, C. (2005). Callus and culture regeneration. *Methods in molecular biology. Arabidopsis Protocols, 82.*
- Mejía, F. S. (2012). *Viabilidad y germinación de semillas de Cinchona officinalis L.* Lima: Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Méndez, K. (2018). *Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de Cinchona officinalis L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja.* Loja-Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Moya, A. (1994). *Auge y crisis de la Cascarilla en la audienciade Quito, Siclo XVIII.* Ecuador: FLACSO.
- Murashige, T., y Skoog, F. A. (1962). A revised médium for rapid growt and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant, XV, 473-497.*
- Nieto, M. (2001). *Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo.* Bogotá: Instituto Colombiano de Antropología e Historia.

- Padilla, T. (2017). *Estudio fenológico y análisis de las características del suelo donde se desarrolla Cinchona officinalis L. En cuatro relictos boscosos de la provincia de Loja*. Loja-Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Pierik, R. L. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Ramos, J. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a distancia (UNAD).
- Reuveni, O., Israeli, Y., Degani, H., y Eshdat, Y. ((1986). *Genetic variability in banana plants multiplied via in vitro techniques. IBPGR Final Report*.
- Roca, W., y Mroginski, L. (1995). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT.
- Rodríguez, B. M., Latsague, V. M., Chacón, F. M., y Astorga, B. P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *BOSQUES*, 35(1), 111-118.
- Romero, S. M. (2017). Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(2), 27-35.
- Sala, F., y Labra, M. (2003). Somaclonal variation. In Thomas B, DJ Murphy, B Murray eds. *Encyclopedia Appl. Plant Sci*. Oxford, UK. Academic Press Elsevier. 1417–1422.
- Sánchez, C. L., y Alvarenga, V. S. (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.
- Takayama, S., y Akita, M. (1996). *Biorreactor advances for the large-scale production of propagules*. In *Cost 822 Workshops on Somatic Embryogenesis, Artificial Seeds and Bioreactors*.
- Tapia, J. (2013). *Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de quina (Cinchona officinalis) en el Cantón Loja*. Quito-Ecuador: Universidad San Francisco de Quito.

- Thorpe, T. A. (2014). *History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Torres, E. (2017). *Las Quinas*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Ulloa, C., y Jorgensen, P. (2000). *Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador* (Segunda ed.). Quito - Ecuador: AbyA-YALA.
- Villalobos, V., y Thorpe, T. (1993). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. En W. Roca, & L. Mroginski, *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Turrialba - Costa Rica: CATIE.
- Wegier, A., Barba, E. L., García, C. F., y Pérez, S. J. (2013). *Método para el establecimiento in vitro de caoba (Swietenia macrophylla King) a partir de explantes vegetativos*. *Manual Técnico Núm. 10*. México, D.F: CENID-COMEF, INIFAP.
- Yépez, A. (2006). Revigorización y establecimiento in-vitro de Gemelina arbórea Roxb. V. Mediante cultivo de tejidos vegetales. *Colombia Forestal*, 9(19), 70-87.
- Zevallos, P. (1989). *Taxonomía, Distribución geográfica y Status del género Cinchona en el Perú*. Lima - Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Ziv, M., y Chen, J. (2008). *The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. Part of Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition*. Springer.

9. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro en la toma de datos para la variable: N° de días a la formación de estructuras *de novo*.

Tratamientos	Repeticiones	N° Frasco	N° Callo	N° días a la formación de estructuras <i>de novo</i>																
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	...	N
T1	R1	1	C.1																	
			C.2																	
		...	C.1																	
			C.2																	
	R2	1	C.1																	
			C.2																	
		...	C.1																	
			C.2																	
	R3	1	C.1																	
			C.2																	
		...	C.1																	
			C.2																	

Anexo 2. Resultados obtenidos del ensayo sobre el porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICA DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% de Formación	T1	30	17,77	31,81	1,5	114,5	3,37	0,6817
% de Formación	T2	30	7,23	12,54	0	99,38		
% de Formación	T3	30	7,9	11,95	1,5	107,93		
% de Formación	T4	30	8,4	14,09	0	103,17		
% de Formación	T5	30	14,83	22,11	0	111,93		
% de Formación	T6	30	11,33	19,29	2	110,78		
% de Formación	TO (Testigo)	30	6,23	12,19	0	90,8		

Anexo 3. Resultados obtenidos del ensayo sobre el porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% de Formación	210	180,2			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3369,5	6	561,58	1,56	0,1605
TRATAMIENTOS	3369,5	6	561,58	1,56	0,1605
Error	73068,83	203	359,94		
Total	76438,33	209			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
TO (Testigo)	6,23	30	3,46	A	
T2	7,23	30	3,46	A	
T3	7,90	30	3,46	A	
T4	8,40	30	3,46	A	
T6	11,33	30	3,46	A	
T5	14,83	30	3,46	A	
T1	17,77	30	3,46	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 4. Resultados obtenidos del ensayo sobre el número de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICA DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
# Estructuras	T1	30	14,53	28,49	2,5	112,87	3,65	0,6386
# Estructuras	T2	30	5,73	10,62	0	98,95		
# Estructuras	T3	30	6,33	9,66	2	108,1		
# Estructuras	T4	30	6,73	11,28	0	103,53		
# Estructuras	T5	30	12,2	18,36	0	112,5		
# Estructuras	T6	30	9,97	16,57	2	112,6		
# Estructuras	TO (Testigo)	30	4,27	8,14	0	89,95		

Anexo 5. Resultados obtenidos del ensayo sobre el número de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
# estructuras <i>de novo</i>	210	189,04			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2568,7	6	428,12	1,64	0,1368
TRATAMIENTOS	2568,7	6	428,12	1,64	0,1368
Error	52883,5	203	260,51		
Total	55452,2	209			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
TO (Testigo)	4,27	30	2,95	A	
T2	5,73	30	2,95	A	
T3	6,33	30	2,95	A	
T4	6,73	30	2,95	A	
T6	9,97	30	2,95	A	
T5	12,2	30	2,95	A	
T1	14,53	30	2,95	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 6. Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICA DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
Altura de estructuras (mm)	T1	30	2,87	3,57	2	117,97	3,43	0,6708
Altura de estructuras (mm)	T2	30	2,1	3,08	0	104,67		
Altura de estructuras (mm)	T3	30	1,9	2,38	1	108,78		
Altura de estructuras (mm)	T4	30	1,53	2,29	0	99,5		
Altura de estructuras (mm)	T5	30	1,77	2,24	0	105,33		
Altura de estructuras (mm)	T6	30	1,8	1,88	1,5	110,65		
Altura de estructuras (mm)	TO (Testigo)	30	1,43	2,6	0	91,6		

Anexo 7. Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
Altura de estructuras (mm)	210	137,38			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	40,59	6	6,77	0,98	0,441
TRATAMIENTOS	40,59	6	6,77	0,98	0,441
Error	1403,87	203	6,92		
Total	1444,46	209			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
TO (Testigo)	1,43	30	0,48	A	
T4	1,53	30	0,48	A	
T5	1,77	30	0,48	A	
T6	1,80	30	0,48	A	
T3	1,90	30	0,48	A	
T2	2,10	30	0,48	A	
T1	2,87	30	0,48	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 8. Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICA DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% Contaminación	T1	30	0	0	0	101,5	0,68	0,4003
% Contaminación	T2	30	0	0	0	101,5		
% Contaminación	T3	30	6,67	25,37	0	108,5		
% Contaminación	T4	30	0	0	0	101,5		
% Contaminación	T5	30	6,67	25,37	0	108,5		
% Contaminación	T6	30	6,67	25,37	0	108,5		
% Contaminación	TO (Testigo)	30	6,67	25,37	0	108,5		

Anexo 9. Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% Contaminación	210	503,44			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2285,71	6	380,95	1,04	0,4032
TRATAMIENTOS	2285,71	6	380,95	1,04	0,4032
Error	74666,67	203	367,82		
Total	76952,38	209			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T2	0	30	3,5	A	
T1	0	30	3,5	A	
T4	0	30	3,5	A	
T6	6,67	30	3,5	A	
T5	6,67	30	3,5	A	
T3	6,67	30	3,5	A	
TO (Testigo)	6,67	30	3,5	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 10. Resultados obtenidos del ensayo sobre la fenolización estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% FENOLOZACIÓN	T1	30	16,67	37,9	0	112,5	1,79	0,3559
% FENOLOZACIÓN	T2	30	0	0	0	95		
% FENOLOZACIÓN	T3	30	6,67	25,37	0	102		
% FENOLOZACIÓN	T4	30	6,67	25,37	0	102		
% FENOLOZACIÓN	T5	30	13,33	34,57	0	109		
% FENOLOZACIÓN	T6	30	13,33	34,57	0	109		
% FENOLOZACIÓN	TO (Testigo)	30	13,33	34,57	0	109		

Anexo 11. Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% FENOLOZACIÓN	210	300,25			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6000	6	1000	1,11	0,3581
TRATAMIENTOS	6000	6	1000	1,11	0,3581
Error	183000	203	901,48		
Total	189000	209			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T2	0	30	5,48	A	
T4	6,67	30	5,48	A	
T3	6,67	30	5,48	A	
TO (Testigo)	13,33	30	5,48	A	
T6	13,33	30	5,48	A	
T5	13,33	30	5,48	A	
T1	16,67	30	5,48	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 12. Resultados obtenidos del ensayo sobre % de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% de Formación	T1	30	1,67	7,31	0	51,22	16,28	<0,0001
% de Formación	T2	30	1,23	2,51	0	55,47		
% de Formación	T3	30	0,83	2,2	0	52,78		
% de Formación	TO (Testigo)	30	14,93	28,37	5	82,53		

Anexo 13. Resultados obtenidos del ensayo sobre % de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% de Formación	120	315,91			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4226,6	3	1408,87	6,48	0,0004
TRATAMIENTOS	4226,6	3	1408,87	6,48	0,0004
Error	25212,07	116	217,35		
Total	29438,67	119			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T3	0,83	30	2,69	A	
T2	1,23	30	2,69	A	
T1	1,67	30	2,69	A	
TO (Testigo)	14,93	30	2,69	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 14. Resultados obtenidos del ensayo sobre número de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis) BAP

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
# estructuras <i>de novo</i>	T1	30	2,07	6,82	0	52,7	15,69	<0,0001
# estructuras <i>de novo</i>	T2	30	1,6	3,27	0	54,65		
# estructuras <i>de novo</i>	T3	30	1,27	3,22	0	52,42		
# estructuras <i>de novo</i>	TO (Testigo)	30	12,37	19,39	6,5	82,23		

Anexo 15. Resultados obtenidos del ensayo sobre número de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
# estructuras <i>de novo</i>	120	243,45			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2596,43	3	865,47	7,81	0,0001
TRATAMIENTOS	2596,43	3	865,47	7,81	0,0001
Error	12859,9	116	110,86		
Total	15456,33	119			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T3	1,27	30	1,92	A	
T2	1,60	30	1,92	A	
T1	2,07	30	1,92	A	
TO (Testigo)	12,37	30	1,92	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 16. Resultados obtenidos del ensayo sobre la altura de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
Altura de estructuras (mm)	T1	30	0,83	2	0	54,28	12,56	0,0003
Altura de estructuras (mm)	T2	30	0,53	1,17	0	54,33		
Altura de estructuras (mm)	T3	30	0,97	3,21	0	53,4		
Altura de estructuras (mm)	TO (Testigo)	30	2,37	2,92	2	79,98		

Anexo 17. Resultados obtenidos del ensayo sobre altura de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
Altura de estructuras (mm)	120	209,3			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	59,76	3	19,92	3,29	0,0231
TRATAMIENTOS	59,76	3	19,92	3,29	0,0231
Error	701,57	116	6,05		
Total	761,33	119			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T2	0,53	30	0,45	A	
T1	0,83	30	0,45	AB	
T3	0,97	30	0,45	AB	
TO (Testigo)	2,37	30	0,45	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 18. Resultados obtenidos del ensayo sobre la contaminación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% de Contaminación	T1	30	0	0	0	59,5	0,3	0,1092
% de Contaminación	T2	30	0	0	0	59,5		
% de Contaminación	T3	30	0	0	0	59,5		
% de Contaminación	TO (Testigo)	30	6,67	25,37	0	63,5		

Anexo 19. Resultados obtenidos del ensayo sobre contaminación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% de Contaminación	120	761,12			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1000	3	333,33	2,07	0,1078
TRATAMIENTOS	1000	3	333,33	2,07	0,1078
Error	18666,67	116	160,92		
Total	19666,67	119			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T2	0	30	2,32	A	
T1	0	30	2,32	A	
T3	0	30	2,32	A	
TO (Testigo)	6,67	30	2,32	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 20. Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Prueba Kruskal Wallis)

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS								
VARIABLE	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
% de Fenolización	T1	30	0	0	0	58	1,07	0,0307
% de Fenolización	T2	30	3,33	18,26	0	60		
% de Fenolización	T3	30	13,33	34,57	0	66		
% de Fenolización	TO (Testigo)	30	0	0	0	58		

Anexo 21. Resultados obtenidos del ensayo sobre fenolización de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con BAP, durante 80 días de evaluación (Test Bonferroni)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
Variable	N	Coeficiente de Variación			
% de Fenolización	120	469,19			
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3583,33	3	1194,44	3,13	0,0286
TRATAMIENTOS	3583,33	3	1194,44	3,13	0,0286
Error	44333,33	116	382,18		
Total	47916,67	119			
TEST: BONFERRONI					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	Rangos	
T1	0	30	3,57	A	
TO (Testigo)	0	30	3,57	A	
T2	3,33	30	3,57	A	
T3	13,33	30	3,57	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Anexo 22. Inoculación *in vitro* de explantes para la formación de callos de *Cinchona officinalis* L



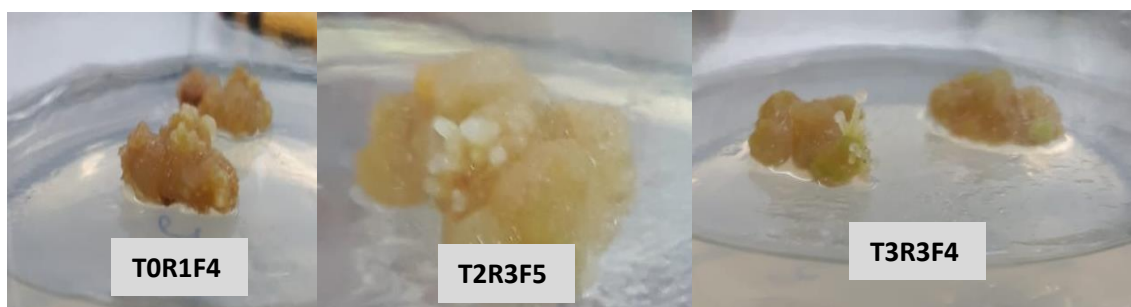
Anexo 23. Formación de callos de *Cinchona officinalis* L a los 45 días, después de la inoculación *in vitro*



Anexo 24. Formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, en la combinación hormonal AIA/KIN a los 25 días, después de la inoculación *in vitro* de callos



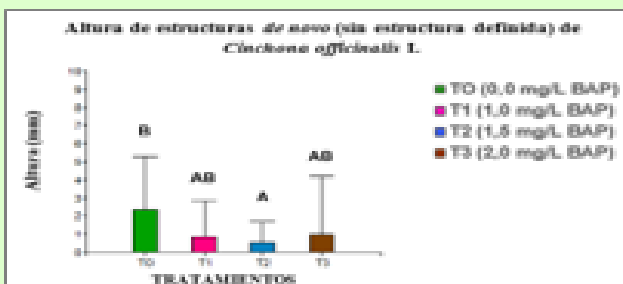
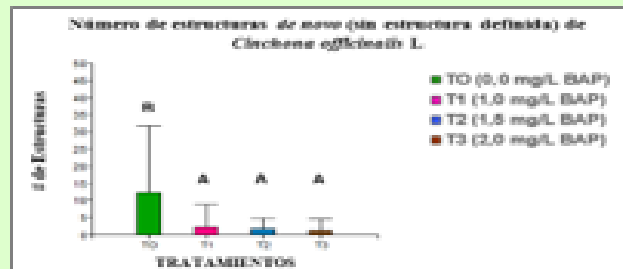
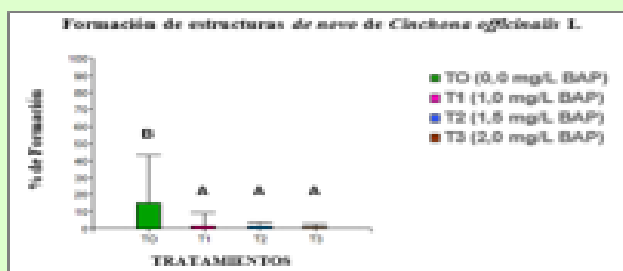
Anexo 25. Formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L, con una citoquinina BAP a los 25 días, después de la inoculación *in vitro* de callos



RESULTADOS

2.1. Determinación del efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina para la inducción de estructuras de novo de *Cinchona officinalis* L.

Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5,00 % de probabilidad, se encontró que si existe diferencia significativa entre los tratamientos. El tratamiento que formó más estructuras de novo fue el T0 (14,9%)



CONCLUSIONES

- En la fase de inducción de estructuras de novo de *C. officinalis* L., a partir de callos, los tratamientos que lograron los mayores porcentajes de formación de estructuras de novo fueron en las combinaciones hormonales de 0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN (T1) con 17,77% y en 0,4 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN (T5) con el 14,85%.
- La formación de estructuras de novo de *C. officinalis* L., con el uso de una sola citoquinina (BAP) en concentraciones de 1,0 - 1,5 y 2,0 mg/l⁻¹ fue sumamente bajo con porcentajes inferiores al 2% de formación, con lo cual se evidenció que a medida que se incrementó la concentración de BAP, el porcentaje de formación de estructuras de novo fue menor.
- El tratamiento que alcanzó el mayor número de estructuras de novo (sin estructura definida) de *C. officinalis* L., fue el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un promedio de 15 estructuras de novo/callos y con una longitud promedio de 2,87 mm.
- El porcentaje de fenolización de estructuras de novo de *C. officinalis* L., fue bajo, evidenciándose un 16,67% en el tratamiento T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN) y un 13,35% en el T3 (2,0 mg/l⁻¹ BAP).

RECOMENDACION

Para la formación de estructuras de novo de *C. officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando nuevas concentraciones de BAP y otras citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones a las utilizadas en la presente investigación.

Para la inducción de raíces adventicias en las estructuras de novo de *C. officinalis* L., se recomienda realizar nuevos ensayos utilizando diferentes concentraciones de auxinas.

Para investigaciones futuras, se recomienda dar el siguiente paso en temas de biotecnología, como son los estudios histológicos y genéticos de las estructuras de novo de *C. officinalis* L.

Continuar realizando trabajos de investigación de *C. officinalis*, donde exista la vinculación con instituciones gubernamentales, con la finalidad de desarrollar y ejecutar proyectos de reforestación con *Cinchona* en diferentes zonas de Loja, y, por ende, asegurar la conservación de la especie.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Laboratorio de Micropropagación Vegetal

“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS DE NOVO, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA”



Responsable:

Katty María Lima Suquilanda

Director:

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán Mg.sc

**Loja-Ecuador
2020**

INTRODUCCIÓN

La cascarilla es una especie nativa del valle de Loja, y se distribuye en las estribaciones de los Andes (FAO y MAE, 2015). Su rango altitudinal oscila desde los 2.300 a los 3.100 m s.n.m. (Espinoza y Rios, 2014). Según datos proporcionados por Zevallos (1989) y Padilla (2017), el género *Cinchona* se desarrolla en climas cálidos y húmedos, con precipitaciones abundantes y nubosidad presente casi todo el año, en zonas de topografía generalmente ondulada y empinada; y en suelos de origen aluvial y coluvial. La utilización de la corteza, para la extracción de la quinina, generó un aporte significativo para la salud y la cultura a nivel mundial (Garmendia, 2005).

La propagación *in vitro*, mediante inducción de callos y de estructuras *de novo*, se convierte en una excelente alternativa de apoyo al sector forestal. En este contexto, Jiménez y Agramonte (2013) señalan que la micropropagación permite mantener el equilibrio del ecosistema forestal y, por ende, también del ambiente, debido a que contribuye a la conservación de la biodiversidad genética y a la producción de plantas.

OBJETIVOS

GENÉRAL -

Contribuir a la generación de información sobre el balance hormonal para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.

ESPECÍFICOS -

- Evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina-Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.
- Evaluar el efecto de una Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, de la UNL.

2. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina-Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

El material vegetal inicial se obtuvo de plantas germinadas *in vitro*, disponibles en el LMV. Para la inducción de callos, el MC sólido se preparó con las sales minerales de MS, suplementado con vitaminas y los reguladores de crecimiento 3,0 mg/L de 2,4-D + 0,5 mg/L de Kinetina. El material vegetal que se utilizó para la fase de formación de estructuras *de novo*, fue las mejores estructuras callogénicas. El MC sólido se preparó con las sales minerales de MS, suplementado con vitaminas y reguladores de crecimiento que se detallan a continuación:

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES	CÓDIGO
T0	0,0 mg/l AIA + 0,0 mg/l KIN	TESTIGO
T1	0,0 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC1
T2	0,0 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC2
T3	0,0 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC3
T4	0,2 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC1
T5	0,4 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC2
T6	0,8 mg/l AIA + 1,0 mg/l KIN	ΔPC3

Luego en la cámara de flujo laminar se procedió a realizar la inoculación de callos de *C. officinalis* en condiciones de total asepsia.

2. Metodología para evaluar el efecto de una Citoquinina (BAP), para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

Para la formación de estructuras *de novo*, se seleccionó las mejores estructuras callogénicas. El MC sólido se preparó con las sales minerales de MS, suplementado con vitaminas y reguladores de crecimiento que se detallan a continuación:

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES	CÓDIGO
T0	0,0 mg/l BAP	TESTIGO
T1	1,0 mg/l BAP	E1
T2	1,5 mg/l BAP	E2
T3	2,0 mg/l BAP	E3

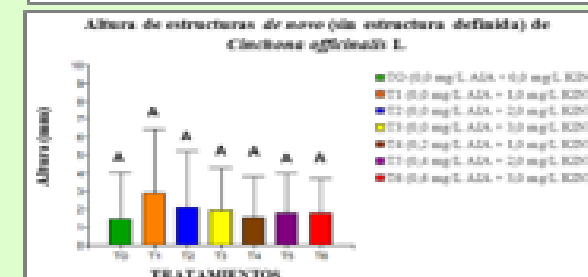
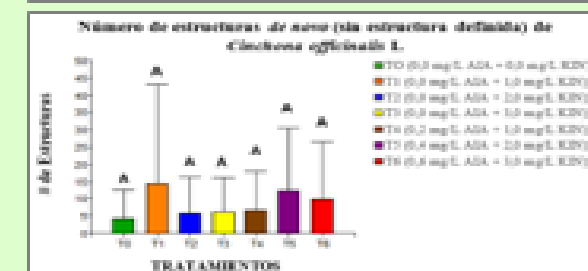
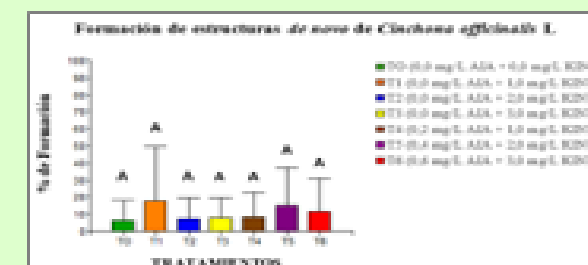
En cámara de flujo laminar se procedió a realizar la inoculación de callos de *C. officinalis* en condiciones de total asepsia.

RESULTADOS

2. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina-Citoquinina, para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

2.1. Determinación del efecto de la combinación hormonal Auxina - Citoquinina para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5,00 % de probabilidad, se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos para ninguna de las variables evaluadas; sin embargo, el tratamiento que presentó mayor formación de estructuras *de novo* fue el T1





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN
VEGETAL**

**“INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS *DE NOVO*,
A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE
VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L.,
DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA
PROVINCIA DE LOJA”**

Autores:

Katty María Lima Suquilanda
Ing. Víctor Hugo Eras Guamán

Loja – Ecuador
2020



1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es considerado como uno de los 17 países megadiversos del mundo, debido a que contiene una exuberante diversidad biológica y en una superficie muy reducida, que representa el 0,2% del planeta (Aguirre y Aguirre, 2017). En el sur del Ecuador, se encuentra ubicada la provincia de Loja, la cual, según lo señala el mismo autor, contiene gran diversidad de plantas y animales; ello, como resultado de la influencia de varios factores que en conjunto generan hábitats y micro hábitats, que crean condiciones favorables para el desarrollo óptimo de numerosas especies.

Dentro de la gran diversidad de especies vegetales de la provincia de Loja, destacan las especies pertenecientes al género *Cinchona*; entre estas especies, *Cinchona officinalis* L., conocida como cascarilla roja, cinchona o quina, ha sido la más representativa, ya que en el pasado tuvo una gran importancia para la economía del país, especialmente por sus múltiples propiedades medicinales. Actualmente sus poblaciones se encuentran reducidas a causa de la sobreexplotación que tuvo la especie, para el aprovechamiento de la corteza por su alto contenido de quinina (Conde, 2016; Cancho, 2017). En varios estudios realizados se encontró que en la corteza de cascarilla contiene componentes activos para curar el paludismo, debido a la presencia de alcaloides en su corteza (Jiménez, 2019). La utilización de la corteza, para la extracción de la quinina, generó un aporte significativo para la salud y la cultura a nivel mundial (Garmendia, 2005).

Estas técnicas de propagación, tal como lo señala Espinosa y Ríos (2014) facilitan la obtención de nuevas plantas, con las mismas características genéticas y fenotípicas de los árboles plus, con lo cual se puede tener mayor cantidad de individuos por unidad de superficie y en el menor tiempo; además, las plantas pueden ser utilizadas en actividades de reforestación para recuperar los ecosistemas nativos degradados.

Con la presente investigación se pretende generar información acerca del balance hormonal para la inducción de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *C. officinalis* L., provenientes de árboles codificados seleccionados en relictos boscosos de la provincia de Loja, y de esta manera obtener material vegetal, para continuar con la investigación científica de la especie a nivel de propagación *in vitro* para contribuir a la mejora genética de la especie y a generar nuevas plántulas, para apoyar a los planes de regeneración e inserción de la cascarilla en su hábitat natural, con lo cual se contribuirá a la conservación de esta especie y al desarrollo del sector forestal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del área de estudio

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

El Laboratorio de Micropropagación Vegetal (Figura 1), se encuentra ubicado al sur de la ciudad, aproximadamente a 3 Km de la ciudad de Loja, en las coordenadas UTM: 699837.48m E y 9554078.10m S, a 2136 m s.n.m



Figura 2. Ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

2.2. Metodología para evaluar el efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina en la inducción de estructuras *de novo*

2.2.1. Obtención del material vegetal *in vitro*

El material vegetal que se utilizó para el desarrollo del trabajo de investigación, se obtuvo del banco de germoplasma de plantas germinadas *in vitro*, disponibles en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Las vitroplantas seleccionadas pertenecen, según la codificación, al árbol No. 11 del sector Zamora Huayco. Las características fenotípicas que se tomó en cuenta para seleccionar el material vegetal, fueron el estado físico de la planta, como, por ejemplo: color de las hojas (verdes) y que no tengan problemas de marchitez y contaminación; que el tamaño del explante tenga alrededor de 5 cm y que las vitroplantas estén vigorosas. (Figura 2)



Figura 2. Obtención del Material Vegetal. a) Selección de vitroplantas. b) Soluciones madre MS y reguladores de crecimiento para el medio de cultivo. c) Preparación medio de cultivo.

2.2.1.1. Fase de inducción de callos

Luego de seleccionar las vitroplantas se procedió a establecer los ensayos para la inducción de callos, para lo cual, no fue necesario la desinfección de los explantes, por cuanto el material vegetal se encontraba creciendo en condiciones asépticas.

Para la inducción de callos se aplicó la metodología utilizada por Guartanza (2019), que consistió en preparar el medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con tiamina 1 mg/l^{-1} , mio-inositol 100 mg/l^{-1} , piridoxina 1 mg/l^{-1} , ácido nicotínico 2 mg/l^{-1} , glicina 1 mg/l^{-1} , ergostín $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$, sacarosa 2 % (como fuente exógena de carbono), Agar 6 g/l^{-1} (agente solidificante). Las combinaciones hormonales utilizadas, estuvieron conformadas por $3,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2, 4-D + $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de Kinetina.

Luego se distribuyó, el medio de cultivo en frascos de vidrio, a razón de 25 ml por frasco, y se los esterilizó en la autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante un tiempo de 20 minutos.

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar se realizó la inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis*, para lo cual, se diseccionaron segmentos de aproximadamente 0.5 a 1.0 cm, se inocularon tres explantes por frasco. Finalmente se procedió a etiquetar cada frasco, y se los llevó al cuarto de incubación, a una temperatura de ± 23 °C, para la formación de callos los frascos estuvieron en total oscuridad, cubiertos con cartulina negra, como se observa en la Figura 3. El material de disección, completamente esterilizado, que se utilizó fue bisturí, pinzas, tijeras y cajas petri. Cabe señalar que, en esta fase solo se realizó la formación de callos, ya que los callos constituyen el material *in vitro* base para la formación de estructuras *de novo*, por lo tanto, en esta fase no se evaluó ninguna variable.

Las estructuras callogénicas se empezaron a formar a partir del quinto día de inoculación de explantes y después de los 45 días, las estructuras callogénicas tuvieron una consistencia dura con callos friables, listos para la inducción de estructuras *de novo*.

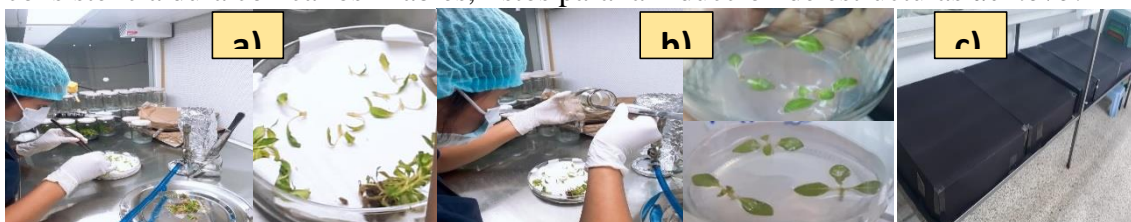


Figura 3. Inducción de callos. a) Disección de material vegetal. b) Inoculación de explantes. c) Cuarto de luces (frascos cubiertos con cartulina)

2.2.1.2. Selección de callos

El material vegetal que se utilizó para la fase de formación de estructuras *de novo*, fue las mejores estructuras callogénicas. Para la selección de callos se tomó en cuenta: callos friables, con tamaño de 0.5 a 1.0 cm y de un color crema (Figura 4). No se realizó la desinfección de los callos, ya que el material vegetal estuvo bajo condiciones asépticas.





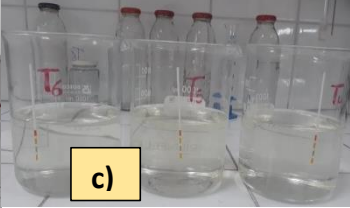

Figura 4. Callos seleccionados para formación de estructuras *de novo*

2.2.2. Fase de inducción de estructuras *de novo*

2.2.2.1. Preparación del medio de cultivo sólido

El medio de cultivo sólido se preparó con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con vitaminas como: Tiamina 1 mg/l⁻¹ y mio-inositol 100 mg/l⁻¹; sacarosa 2 %; agar 0.6 %. Las combinaciones hormonales utilizadas en esta fase, estuvieron conformadas por Ácido Indol Acético (AIA/auxina) y Kinetina (KIN/citoquinina) en diferentes concentraciones, que se detallan en el Tabla 1. Para el tratamiento testigo se empleó el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES HORMONALES (mg/l ⁻¹)		CÓDIGO
	AIA	KINETINA	
T0	0,0	0,0	TESTIGO
T1	0,0	1,0	A1C1
			
T6	0,6	3,0	A4C3

El pH, del medio de cultivo, se ajustó a 5.8 ± 0.2 . Para bajar el pH se utilizó HCL (ácido clorhídrico) y con NaOH 1N (hidróxido de sodio) se aumentó el pH. Luego de haber terminado la preparación del medio de cultivo se procedió a distribuir de 25 ml en cada frasco de vidrio; finalmente, se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave a 120 ° C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos. Además, se puso a esterilizar el material de disección necesario para la inoculación (Figura 5).

2.2.2.2. Inoculación *in vitro* de callos

La inoculación *in vitro* de los callos de *Cinchona officinalis* L, para la inducción de brotes (Figura 5). Medio de cultivo. **a)** Sales minerales y reguladores de crecimiento. **b)** Preparación del medio. **c)** Medición de pH en el medio de cultivo. **d)** Esterilización de frascos (autoclave)

petri cubierta con papel absorbente se realizó la disección de los callos. Cada sección constituyó un explante y se inocularon dos callos por frasco; luego se colocó una etiqueta a cada frasco para su identificación respectiva (Figura 6).

Finalmente, se llevó los frascos al cuarto de luces, para mantenerlos en incubación a una temperatura de ± 23 °C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 80 días. En la fase de inducción de estructuras *de novo* no se realizó ensayos en total oscuridad. La evaluación se realizó mediante la observación directa, a partir del segundo día hasta 80 días de inoculación.

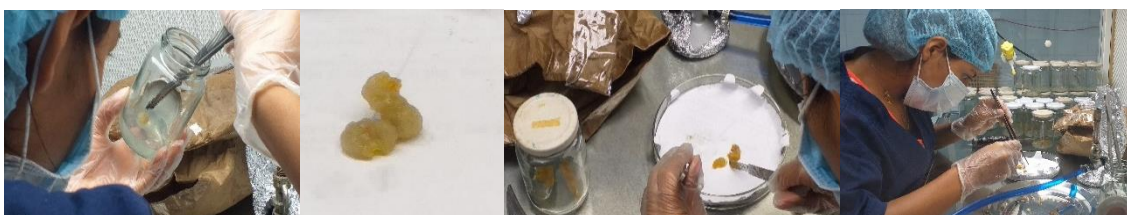


Figura 6. Inoculación *in vitro* de callos de *Cinchona officinalis* (Fase 1)

2.2.3. Diseño experimental para la formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

En esta fase se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial de 2 x 3, teniendo en total 6 tratamientos, más un testigo y tres repeticiones. En el Tabla 2 se indica las diferentes concentraciones que se utilizó de cada hormona.

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto de la interacción auxina- citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

FACTOR	CONCENTRACIONES HORMONALES (mg/l ⁻¹)
Nivel de concentración de Auxinas (AIA)	0.2
	0.4
	0.6
Nivel de concentración de Citoquininas (KIN)	1.0
	2.0
	3.0

2.2.3.1. Especificaciones del Diseño experimental

La unidad experimental del ensayo fue un callo y se sembraron dos callos en cada frasco de vidrio. Cada tratamiento tiene 30 callos, el ensayo completo tiene un total de 210 callos. A continuación, en el Tabla 3, se detalla las especificaciones del diseño.

Tabla 3. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental	Un callo
Número de tratamientos	7
Número de repeticiones	3
Número total de frascos por repetición	5
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de callos por frasco	2
Número de callos por tratamiento	30
Número total de callos del ensayo	210
Número total de frascos del ensayo	105

Las variables evaluadas para la formación de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* fueron: Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, Número de días para la formación de estructuras *de novo*, Número de brotes *de novo* por callo, Altura de brotes *de novo*, Número de raíces *de novo* por callo, Longitud de raíces, Porcentaje de contaminación, Porcentaje de oxidación fenólica. Los datos se registraron en la ficha técnica que se observa en el Anexo 1, cabe recalcar que se realizó una ficha para cada variable a evaluar.

2.2.4. Hipótesis del modelo

H0. La combinación hormonal Auxina – Citoquinina, no influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

H1. La combinación hormonal Auxina – Citoquinina, influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

2.2.5. Análisis estadístico de datos, correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la fase de inducción de estructuras *de novo*, se introdujo los datos de las diferentes variables evaluadas en el Software IBM SPSS Statistics 23, donde se calculó los supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2020 se realizó un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis, y la prueba estadística con el test de Bonferroni al 5,00 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

2.3. Metodología para evaluar el efecto hormonal de una citoquinina BAP en la inducción de estructuras *de novo* en *Cinchona officinalis* L

2.3.1. Selección de callos

Se escogieron las mejores estructuras callogénicas, inducidas en la fase de obtención del material vegetal. El material vegetal que se utilizó para la fase de formación de estructuras *de novo*, fue las mejores estructuras callogénicas. Para la selección se tomó en cuenta el tamaño, color y estructura de los callos. No se procedió a realizar la desinfección, ya que el material vegetal es aséptico.

2.3.2. Preparación del medio de cultivo sólido

El medio de cultivo basal utilizado fue con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con vitaminas como Thiamina 1 mg/l y mio-inositol 100 mg/l; sacarosa 2 %; agar 0.6 %. El regulador de crecimiento utilizado fue Bencil Amino Purina (BAP) en diferentes concentraciones, que se detallan en el Tabla 4. Para el tratamiento testigo se utilizó el mismo medio de cultivo, pero sin ninguna concentración de BAP.

Tabla 4. Tratamientos para evaluar el efecto de una citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES HORMONALES BAP (mg/l¹)	CÓDIGO
T0	0,0	TESTIGO
T1	1,0	B1
T2	1,5	B2
T3	2,0	B3

El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCL o NaOH 1N, en agitación. Seguidamente, se procedió a colocar el medio de cultivo en frascos de vidrio, con una cantidad de 25 ml por frasco, luego fue esterilizado en la autoclave a 120 ° C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 20 minutos.

2.3.3. Inoculación *in vitro* de callos

Se inocularon los callos de *C. officinalis* para la formación de estructuras *de novo*, en condiciones de total asepsia en la cámara de flujo laminar. En la caja petri cubierta con papel se realizó la disección de los callos, para lo cual se procedió a retirar las partes necrosadas del material vegetal. Se inocularon dos callos por frasco, con un total de 15 frascos por tratamiento (Figura 7). Finalmente, se mantuvo los frascos en el cuarto de incubación a una temperatura de ± 23 °C y a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, por un periodo de 80 días. Cada frasco estuvo rotulado de acuerdo al número de tratamiento, repetición, fecha de inoculación y lugar de procedencia, para su respectiva identificación.



Figura 7. Inoculación *in vitro* de callos de *Cinchona officinalis* L (Fase 2)

2.3.4. Diseño experimental para la formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial 1x3, con 3 tratamientos, más un testigo y tres repeticiones (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones para evaluar el efecto de la citoquinina en la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L.

FACTOR	CONCENTRACIONES HORMONALES BAP (mg/l ⁻¹)
Nivel de concentración de Citoquinina (BAP)	1,0
	1,5
	2,0

2.3.4.1. Especificaciones del Diseño experimental

La unidad experimental es un callo, se sembraron dos callos por frasco de vidrio. Cada tratamiento con 30 callos, el ensayo completo tiene un total de 120 callos. En el Tabla 6, se detalla las especificaciones del diseño.

Tabla 6. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental	Un Callo
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número total de frascos por repetición	5
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de callos por frasco	2
Número de callos por tratamiento	30

Número total de callos del ensayo	120
Número total de frascos del ensayo	60

La evaluación se realizó mediante observación directa, a partir del segundo día hasta 80 días de inoculación. Las variables evaluadas para la formación de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L fueron: Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, Número de días para la formación de estructuras *de novo*, Número de brotes *de novo* por callo, Altura de brotes *de novo*, Número de raíces *de novo* por callo, Longitud de raíces, Porcentaje de contaminación, Porcentaje de oxidación fenólica. Los datos se registraron en la ficha técnica que se observa en el Anexo 1, cabe recalcar que se realizó una ficha para cada variable a evaluar.

2.3.5. Hipótesis del modelo

H0. La adición de una Citoquinina, como el BAP, no influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

H1. La adición de una Citoquinina, como el BAP, influye en la inducción de estructuras *de novo* de *Chinchona officinalis* L.

2.3.6. Análisis estadístico de datos correspondientes a la fase de formación de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

Para evaluar el efecto de la combinación hormonal auxina - citoquinina, en la fase de inducción de estructuras *de novo*, se introdujo los datos de las diferentes variables evaluadas en el Software IBM SPSS Statistics 23, donde se calculó los supuestos de homogeneidad y normalidad. En el software InfoStat versión 2020 se realizó un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis, y la prueba estadística con el test de Bonferroni al 5,00 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

2.4. Metodología para la difusión de resultados a actores sociales interesados

La difusión del tema de investigación, permitió dar a conocer la importancia de los resultados obtenidos, para ello se realizaron diferentes actividades, tales como:

- Socialización del proyecto de tesis al Equipo Técnico del Proyecto Cinchona del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja y actores interesados.
- Elaboración de un manuscrito científico.
- Folleto técnico con los resultados obtenidos
- Tríptico con los resultados obtenidos.
- Elaboración y publicación de tesis

3. RESULTADOS

3.1. Determinación del efecto de la combinación hormonal Auxina – Citoquinina para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

3.1.1. Número de días para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

A partir de los callos de *C. officinalis* L, que fueron sometidos a diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas, se logró evidenciar, que la formación de estructuras *de novo* empezó a partir del décimo día, después de la inoculación *in vitro* de callos, para todos los tratamientos, a excepción del testigo (0,0 mg/l⁻¹ AIA+0,0 mg/l⁻¹ KIN) en el cual empezó la formación a partir del día 25 después de la inoculación. La formación de estructuras *de novo* en el T1 que estuvo conformado por 0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN, se estabilizó a los 55 días; mientras que en los tratamientos T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA+3,0 mg/l⁻¹ KIN) la estabilización fue a los 65 días y en el caso del tratamiento T0 (sin hormonas) se estabilizó a los 80 días (Figura 8).

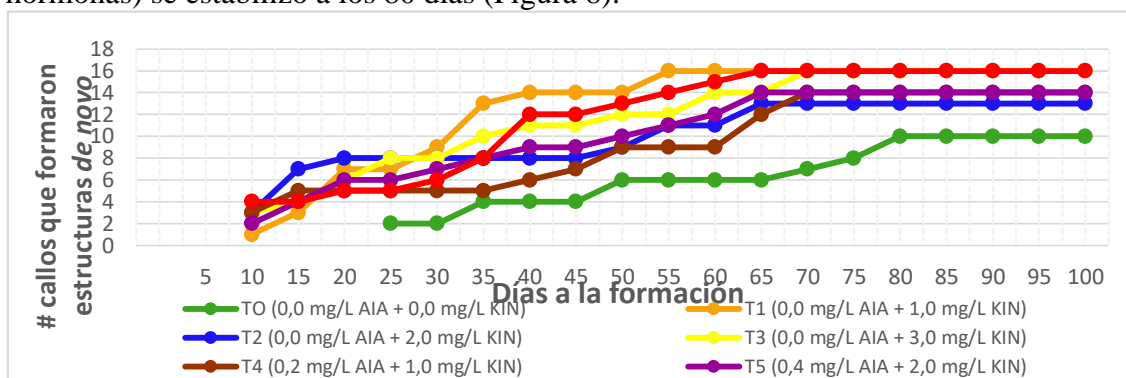


Figura 8. Número de días a la formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

3.1.2. Porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Durante la fase de inducción de estructuras *de novo* de *C. officinalis*, a partir de callos, al término de 80 días de evaluación, los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de formación de estructuras *de novo* fue el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA+1,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA+2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA+3,0 mg/l⁻¹ KIN) con un porcentaje de formación de 17,77%; 14,83% y 11,33% respectivamente. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos; por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula al ser $p > \alpha$ (0,05) en todos los casos.

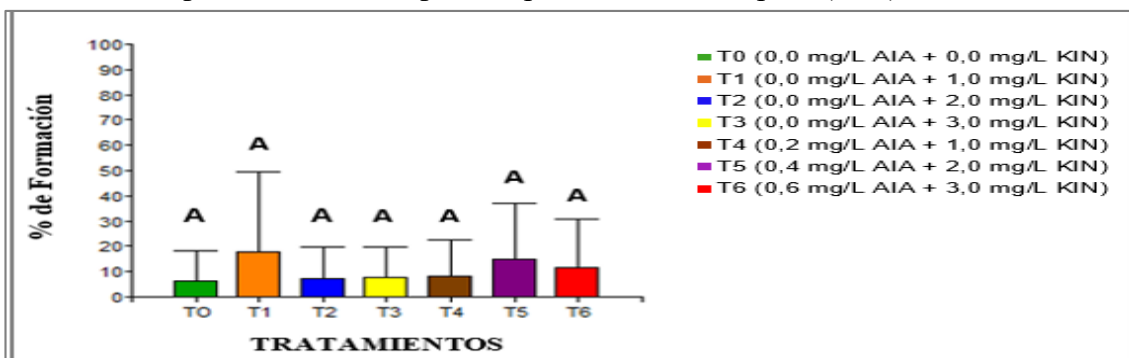


Figura 9. Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

3.1.3. Número de brotes *de novo* por callo de *C. officinalis* L

Al finalizar el período de evaluación a los 80 días, se observó que el tratamiento que tuvo mayor cantidad de formación de estructuras *de novo* no diferenciadas fue el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un promedio de 15 estructuras *de novo* por callo, seguido por el tratamiento con la combinación hormonal de 0,4 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN con un promedio de 12 estructuras *de novo*/callo, en comparación con el tratamiento T0 sin hormonas, que presentó la menor cantidad de estructuras *de novo*, con un valor promedio de cuatro estructuras *de novo*/callo como se observa en las Figuras 10 y 11. Los callos que formaron estructuras *de novo*, no fueron diferenciadas, las cuales pueden formar brotes o embriones.

En cada uno de los tratamientos, se obtuvo una respuesta semejante, es por ello que al aplicar el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula al ser $p > \alpha$ (0,05) en todos los casos.

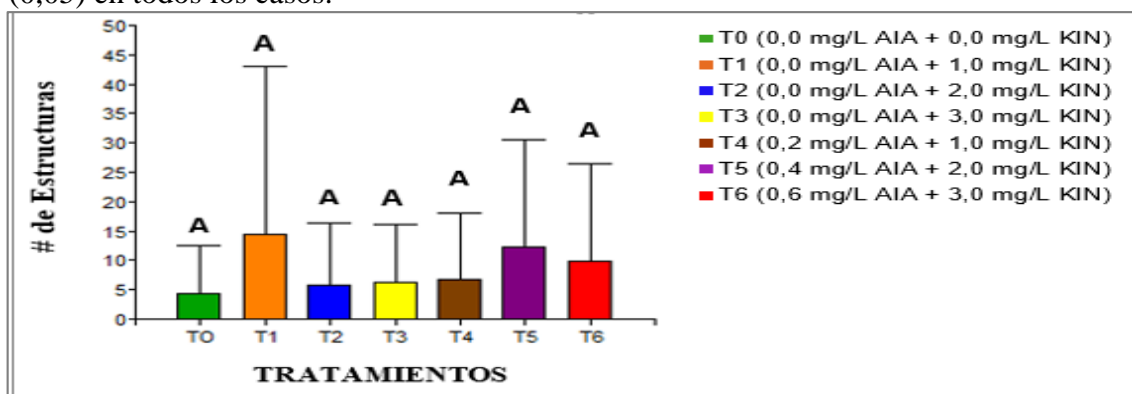


Figura 10. Número de estructuras *de novo* (sin estructura definida), a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

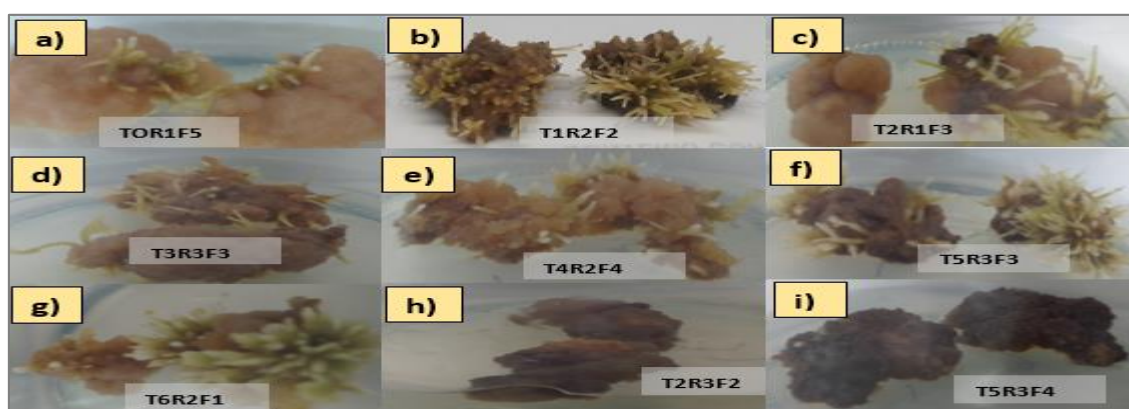


Figura 11. Estructuras *de novo* (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de *C. officinalis* L: **a)** T0 (0,0 mg/l AIA + 0,0 mg/l KIN); **b)** T1 (0,0 mg/l AIA+1,0 mg/l KIN); **c)** T2 (0,0 mg/l AIA+2,0 mg/l KIN); **d)** T3 (0,0 mg/l AIA+3,0 mg/l KIN); **e)** T4 (0,2 mg/l AIA+1,0 mg/l KIN); **f)** T5 (0,4 mg/l AIA+2,0 mg/l KIN); **g)** T6 (0,6 mg/l AIA+3,0 mg/l KIN) **h)-i)** Callos necrosados, a los 80 días de evaluación.

3.1.4. Altura de brotes *de novo* de *C. officinalis* L

La altura de las estructuras *de novo* se midió al finalizar el período de la evaluación que fue de 80 días, en donde, los tratamientos que registraron mayor altura fueron el T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un promedio de 2,87 mm y T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) con 2,10 mm. El tratamiento que tuvo menor altura fue el testigo (T0) que no tuvo ninguna concentración hormonal, con un promedio de 1,43 mm (Ver Figura 12).

Los análisis estadísticos aplicados como análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis y la prueba de significación de Bonferroni al 5,0% de probabilidad, mostraron que no existe diferencia significativa entre tratamientos con un $p > 0,05$.

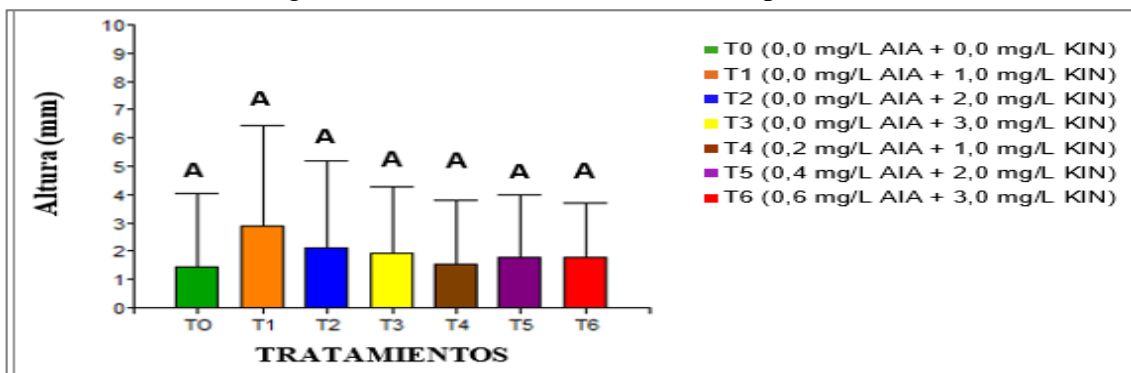


Figura 12. Altura de estructuras *de novo* (sin estructura definida), a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.1.5. Número y longitud de raíces *de novo* por callo de *C. officinalis* L

Una vez finalizado el período de evaluación de 80 días, con respecto a las variables número y longitud de raíces, no se obtuvo resultados, debido a que no se observó formación de raíces en ninguno de los tratamientos del ensayo.

3.1.6. Porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

El mayor porcentaje de contaminación de estructuras *de novo*, se registró en los tratamientos T0 (sin hormonas), T3 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 3,0 mg/l⁻¹ KIN), T5 (0,4 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T6 (0,6 mg/l⁻¹ AIA + 3,0 mg/l⁻¹ KIN), con un porcentaje promedio de 6.7%. Los tratamientos que no presentaron contaminación durante el periodo de evaluación fueron T1 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN), T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) y T4 (0,2 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) como se puede apreciar en la Figura 13.

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, se observó que no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos.

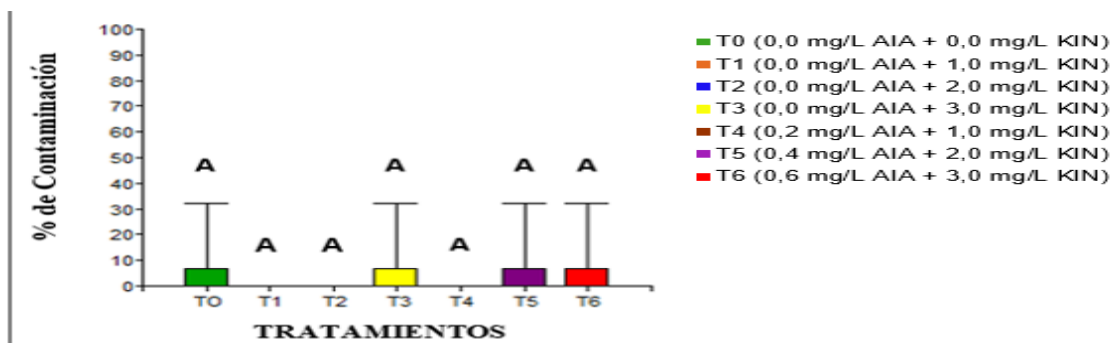


Figura 13. Porcentaje de Contaminación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.1.7. Porcentaje de fenolización de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

En la formación de estructuras *de novo*, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de fenolización, fue el tratamiento T1, que estuvo conformado por 0,0 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN con un 16,7%, los tratamientos que presentaron menor porcentaje de fenolización fueron el T3 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 3,0 mg/l⁻¹ KIN) y T4 (0,2 mg/l⁻¹ AIA + 1,0 mg/l⁻¹ KIN) con un 6,67%, en comparación con el tratamiento T2 (0,0 mg/l⁻¹ AIA + 2,0 mg/l⁻¹ KIN) que no presentó fenolización (Ver Figura 14). De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, se observó que no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos.

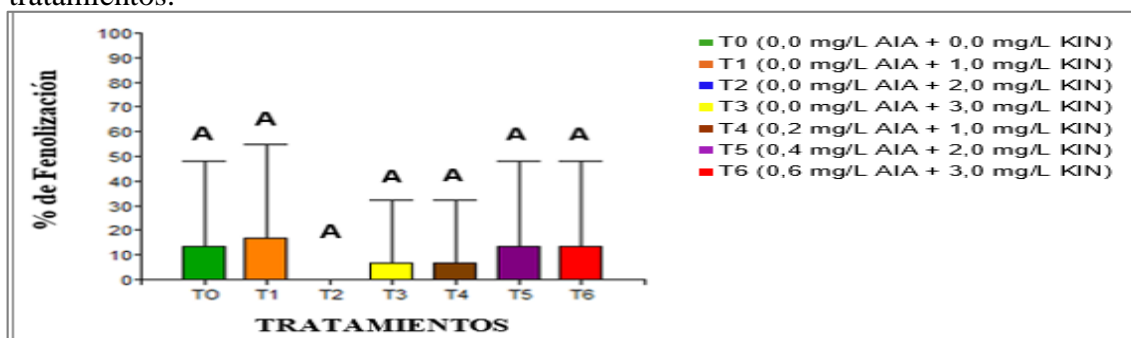


Figura 14. Porcentaje de Fenolización de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2. Determinación del efecto de la Citoquinina, benzil amino purina (BAP) para la inducción de estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L

3.2.1. Número de días para la formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L.

La formación de estructuras *de novo*, a partir de callos obtenidos de vitro plantas, se observó a partir del décimo día en los tratamientos T0 sin BAP, T1 con la adición de 1,0 mg/l⁻¹ BAP y T2 con 1,5 mg/l⁻¹ BAP; sin embargo, en el tratamiento T3 con 2,0 mg/l⁻¹ BAP la formación empezó a partir de los 15 días de inoculación *in vitro* de los callos.

La formación de estructuras *de novo* con la adición de 2,0 mg/l⁻¹ BAP se estabilizó a los 55 días de evaluación; en el tratamiento T0 (sin hormona) y con 1,5 mg/l⁻¹ BAP (T2) fue a los 65 días y en el caso del tratamiento con 1,0 mg/l⁻¹ BAP (T1), a partir de los 70 días de evaluación se logró la estabilización, como se observa en la Figura 15.

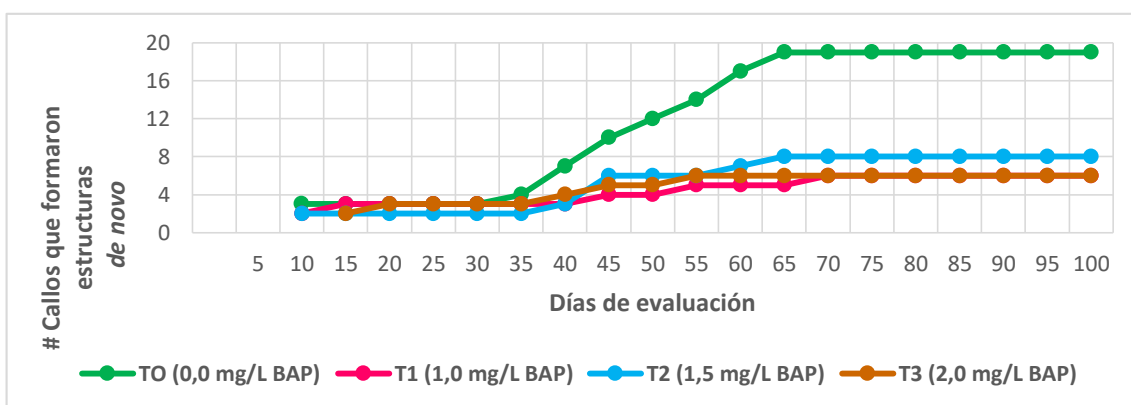


Figura 15. Número de días a la formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L., con una citoquinina.

3.2.2. Porcentaje de formación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Respecto a la variable porcentaje de formación de estructuras *de novo*, como se puede ver en la figura 16, el tratamiento que tuvo mayor formación de estructuras *de novo* fue el T0 sin BAP con un 14,93%; seguido de los tratamientos T1 conformado por 1,0 mg/l⁻¹ BAP y T2 con la adición de 1,5 mg/l⁻¹ BAP con porcentajes promedio de 1,67% y 1,23% respectivamente; el tratamiento que tuvo menor formación de estructuras *de novo* fue el tratamiento T3 constituido por 2,0 mg/l⁻¹ BAP con un 0,83%.

Luego de realizar el análisis estadístico como el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad se observó que, si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

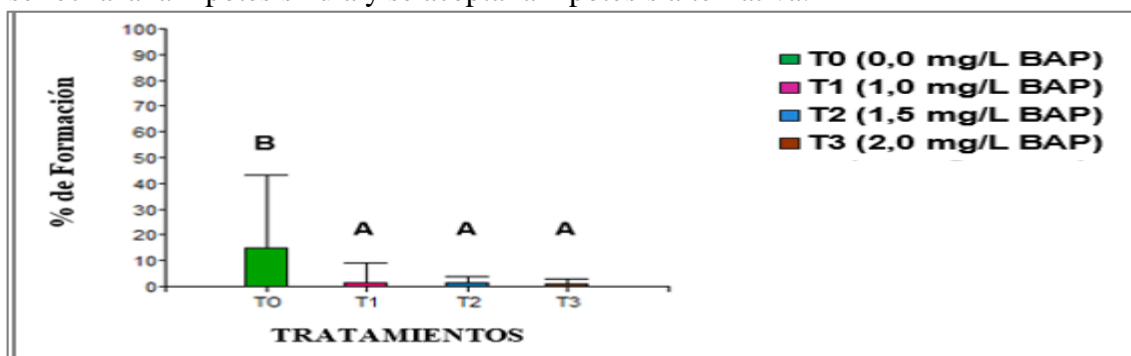


Figura 16. Porcentaje de formación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

3.2.3. Número de brotes *de novo* por callo de *C. officinalis* L

El tratamiento que tuvo mayor número de estructuras no diferenciadas fue el tratamiento testigo (T0), que no tuvo ninguna concentración hormonal, con un promedio de 12 estructuras *de novo* por callo y los tratamientos que tuvieron menor número de estructuras *de novo*, fueron el T1 con la adición de 1,0 mg/l⁻¹ BAP y T2 constituido por 1,5 mg/l⁻¹ BAP, con un promedio de 2 estructuras *de novo*/callo cada uno y el T3 (2,0 mg/l⁻¹ BAP) con un promedio de una estructura *de novo* por callo, como se puede observar en las Figuras 17 y 18. Al aplicar el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, se observó que, si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

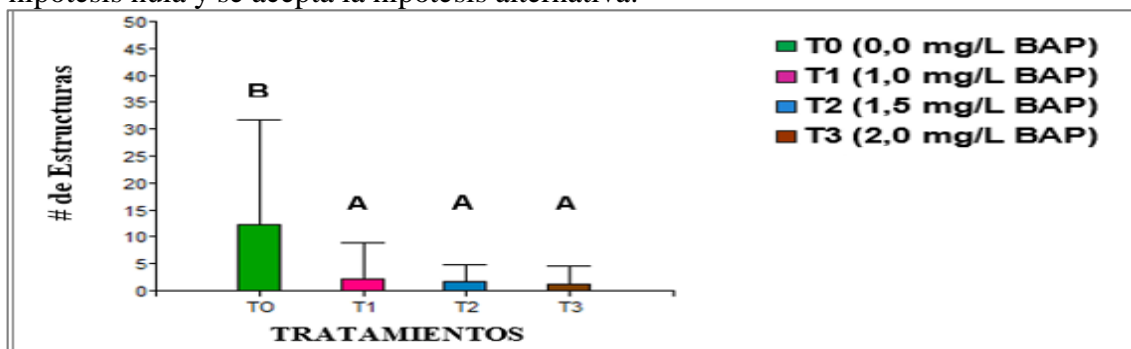


Figura 17. Número de brotes *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

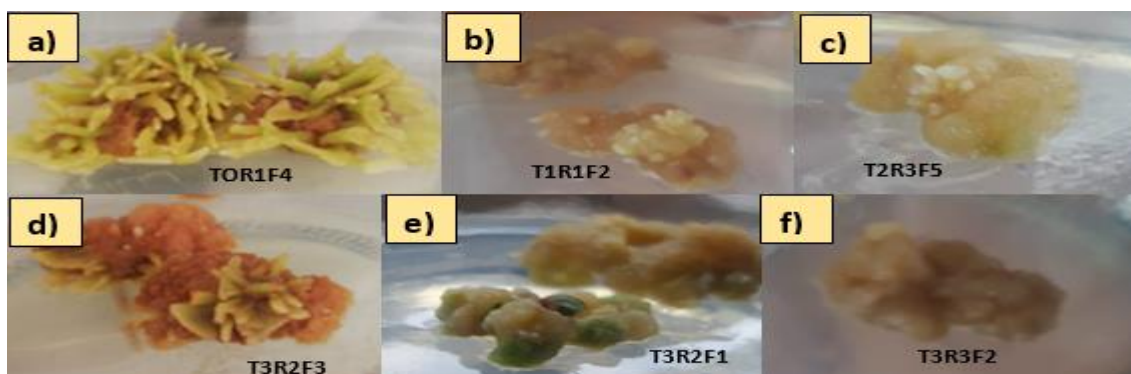


Figura 18. Estructuras *de novo* (sin estructura definida) obtenidas a partir de callos de *C. officinalis* L: **a)** T0 (0,0 mg/L BAP); **b)** T1 (1,0 mg/L BAP); **c)** T2 (1,5 mg/L BAP); **d)** T3 (2,0 mg/L BAP); **e)** Callo con partes verdes; **f)** MC contaminado, a los 80 días de evaluación.

3.2.4. Altura de brotes *de novo* de *C. officinalis* L

El tratamiento T0 sin BAP presentó mayor altura de estructuras *de novo*, con un promedio de 2,37 mm; sin embargo, los tratamientos que tuvieron menor altura fueron en las concentraciones de 2,0 mg/l⁻¹ BAP (T3), 1,0 mg/l⁻¹ BAP (T1) y 1,5 mg/l⁻¹ BAP (T2), con una altura promedio de 0,97 mm; 0,83 mm y 0,53 mm, respectivamente (Figura 19).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, mostró que si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

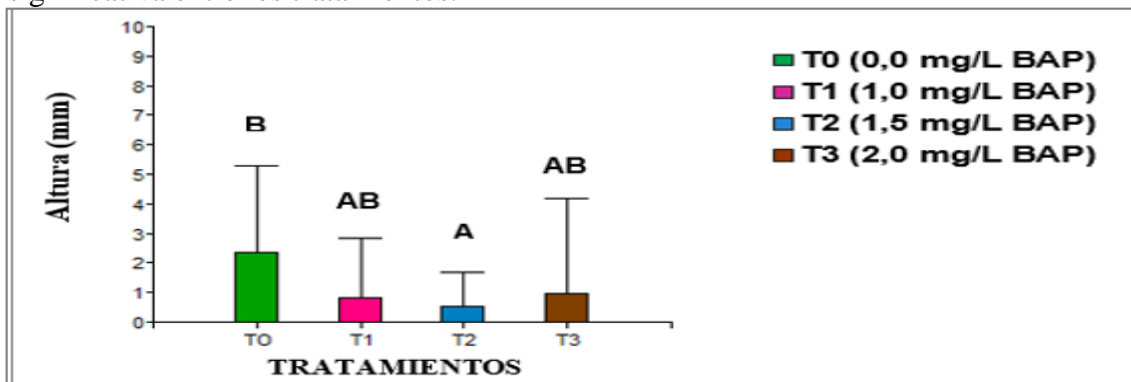


Figura 19. Altura de brotes *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra diferente presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

3.2.5. Número y longitud de raíces *de novo* por callo de *C. officinalis* L

Respecto a las variables número y longitud de raíces *de novo* no se obtuvo resultados, ya que, durante el período de evaluación de 80 días, no se evidenció la presencia de raíz en ninguno de los tratamientos ensayados

3.2.6. Porcentaje de contaminación de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Como se muestra en la Figura 20, el porcentaje de contaminación durante la formación de estructuras *de novo* fue bajo, después de los 17 días de inoculación se evidenció contaminación en el tratamiento T0 (testigo) con un 6,67 %, mientras que los tratamientos T1 (1,0 mg/l⁻¹ BAP), T2 (1,5 mg/l⁻¹ BAP) y T3 (2,0 mg/l⁻¹ BAP) no presentaron contaminación.

Según el análisis estadístico aplicado como el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad, se observó que, no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

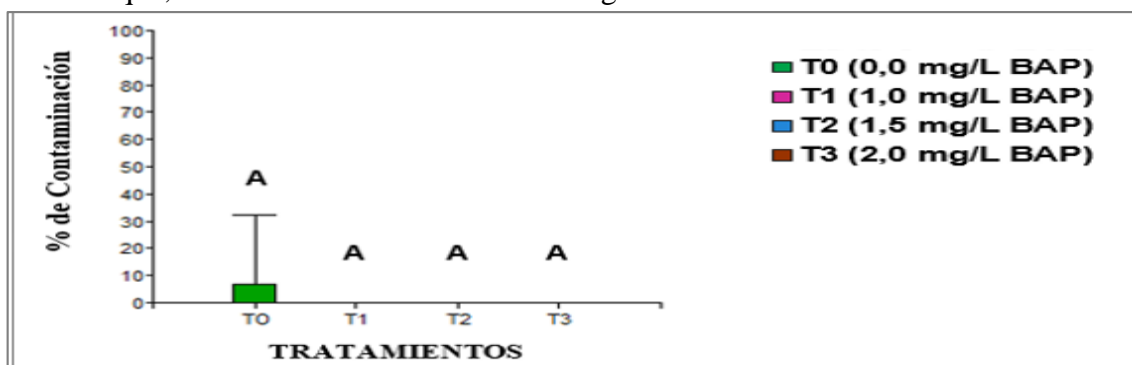


Figura 20. Porcentaje de Contaminación de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2.7. Porcentaje de fenolización de estructuras *de novo* de *C. officinalis* L

Como se puede evidenciar en la Figura 21, el tratamiento T3, que tuvo 2,0 mg/l BAP fue el que presentó el mayor porcentaje de fenolización con un 13,33%, seguido del tratamiento T2 constituido por 1,5 mg/l⁻¹ BAP con 3,33%; y, finalmente los tratamientos que no presentaron fenolización fueron T1 (1,0 mg/l⁻¹ BAP) y el tratamiento testigo (T0).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de significancia de Bonferroni al 5,0 % de probabilidad demostraron que, no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

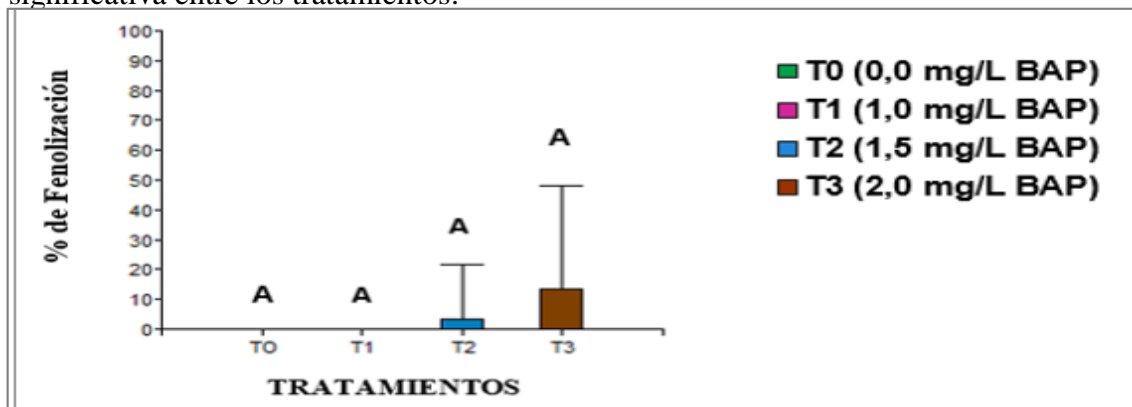


Figura 21. Porcentaje de Fenolización de estructuras *de novo*, a partir de callos de *C. officinalis* L.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.3. Difusión de resultados generados a actores interesados

Por la importancia de la información que se generó en la presente investigación, se realizó la socialización y difusión de los resultados de esta investigación al equipo técnico del proyecto *Cinchona* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en el cual se dio a conocer los resultados obtenidos en la presente investigación (Ver Figura 22).

Además, se elaboró y entregó un tríptico divulgativo, con los resultados obtenidos de la investigación y, finalmente, se elaboró un folleto técnico informativo y un manuscrito científico de la tesis, con el propósito de difundir la información generada a los actores sociales interesados en la temática para su conocimiento y aplicación.



Figura 22. Difusión de resultados a actores sociales interesados

4. CONCLUSIONES

- En la fase de inducción de estructuras de novo de *C. officinalis* L, a partir de callos, las combinaciones hormonales AIA – KIN no ejercieron un efecto significativo sobre la cantidad y calidad de las estructuras de novo.
- El medio de cultivo MS con la adición de 0,0 mg/l-1 AIA + 1,0 mg/l-1 KIN (T1) fue el tratamiento que logró el porcentaje más alto (17,77 %) de formación de estructuras de novo.
- La formación de estructuras de novo de *C. officinalis* L, con el uso de una sola citoquinina (BAP) en concentraciones de 1,0 - 1,5 y 2,0 mg/l-1 fue bajo con porcentajes inferiores al 2 % de formación, con lo cual se evidenció que a medida que se incrementó la concentración de BAP, el porcentaje de formación de estructuras de novo fue menor.
- De todos los tratamientos ensayados, ninguno de los tratamientos manifestó proliferación de raíces adventicias en las estructuras de novo de *C. officinalis* L, por lo que es necesario pasar las estructuras a otro medio que permita la formación de raíces.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, M. Z., y Aguirre, M. N. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *ARNALDOA*, XXIV(2), 523-539.
- Cancho, S. (2017). *Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de Cinchona krauseana L. Andersson y C. calisaya Wedd. (Rubiaceae)*. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Conde, M. (2016). *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie*. Loja - Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Espinosa, C., y Ríos, G. (2014). *Patrones de crecimiento de Cinchona officinalis in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas*. Loja - Ecuador: UTPL.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp). Distribución, caracterización de hábitat y arquitectura*. Loja - Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Guartanza, J. (2019). *Procesos Biotecnológicos para la Implantación e Inducción de callos en Cinchona officinalis L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja*. Loja - Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Jiménez, P. (2019). *Historia de la Quina: De lucha contra la malaria a la aparición de la tónica*. Madrid: Universidad Complutense.
- Murashige, T., y Skoog, F. A. (1962). A revised médium for rapid growt and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, XV, 473-497.