



Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional De Loja

## Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

### Carrera de Ingeniería Forestal

#### Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad

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

#### AUTOR:

Jordy Gabriel Camacho Sánchez

#### DIRECTOR:

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

Loja – Ecuador

2023

## Certificación

Loja, 25 de noviembre de 2022

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

### **DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

#### **CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad** de la autoría de la estudiante **Jordy Gabriel Camacho Sanchez**, con cedula de identidad Nro. **0705284305**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa



Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN  
CURRICULAR**

## **Autoría**

Yo, **Jordy Gabriel Camacho Sanchez**, declaro ser autor del presente Trabajo de Integración Curricular o de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

**Firma:**



**Cédula de identidad:** 0705284305

**Fecha:** 25 de noviembre de 2022

**Correo electrónico:** jordy.g.camacho@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0992263217

**Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total y /o publicación electrónica del texto completo, del trabajo de integración curricular o de titulación.**

Yo, **Jordy Gabriel Camacho Sanchez**, declaro ser autor del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad**, como requisito para optar al título de **Ingeniero Forestal**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los once días del mes de enero de dos mil veintitrés.

**Firma:**



**Autor:** Jordy Gabriel Camacho Sanchez

**Cédula:** 0705284305

**Dirección:** Bernardo Valdivieso, Andrés Bello y Catacocha

**Correo electrónico:** jordy.g.camacho@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0992263217

#### **DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director del Trabajo de Integración Curricular:**

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

## **Dedicatoria**

Este documento se lo dedico a Dios quien supo guiarme por el buen camino, iluminar mi mente y fortificar mi corazón; a mis padres Segundo Camacho y Beatriz Sanchez por ser el pilar fundamental que, con sus consejos, comprensión, cariño y amor, me apoyaron incondicionalmente con los recursos necesarios para lograr este objetivo, a mis hermanos, mis abuelos y al grupo de estudio Ciatio. A todos mis docentes que me han apoyado y compartido todos sus conocimientos que hoy permiten formarme como profesional, así como también al equipo de investigación *Cinchona*, especialmente a mi director por haber orientado el presente trabajo de investigación, a todos y cada una de las personas que creyeron en mí.

**Jordy Gabriel Camacho Sanchez**

## **Agradecimiento**

Expreso mi gratitud a la Universidad Nacional de Loja, Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, carrera de Ingeniería Forestal, por darme la oportunidad de formar parte de ella, a los distinguidos docentes por sus valiosos conocimientos impartidos día a día que contribuyeron a mi formación profesional, al grupo de estudio Ciatio que siempre nos hemos apoyado en cada etapa de nuestra formación profesional y hoy esos esfuerzos rinden sus frutos. De la misma manera expresar mis sinceros agradecimientos al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, director del presente trabajo de investigación. A la Ing. Magaly Yaguana y el Ing. Darlin Gonzalez por la colaboración y asesoramiento en el transcurso del desarrollo de la investigación, al igual que sus consejos para la vida. Agradezco a todos mis familiares por el apoyo incondicional brindado para lograr mi meta, esto no pudo haber sido posible sin ustedes, infinitas gracias a todos.

**Jordy Gabriel Camacho Sanchez**

## Índice de contenidos

<b>Portada</b> .....	i
<b>Certificación</b> .....	ii
<b>Autoría</b> .....	ii
<b>Carta de autorización</b> .....	iv
<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimiento</b> .....	vi
<b>Índice de contenidos</b> .....	vii
Índice de figuras .....	xii
Índice de tablas .....	xv
Índice de anexos .....	xvii
<b>1. Título</b> .....	1
<b>2. Resumen</b> .....	2
2.1. Abstract .....	4
<b>3. Introducción</b> .....	6
<b>4. Marco Teórico</b> .....	8
4.1 Descripción del género <i>Cinchona</i> .....	8
4.2 Descripción botánica de <i>Cinchona officinalis</i> L. ....	8
4.3 Descripción taxonómica de <i>Cinchona officinalis</i> L. ....	9
4.4 Ubicación y distribución geográfica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	9
4.5 Importancia de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	9
4.6 Usos de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	9
4.7 Biotecnología vegetal.....	10
4.7.1 Micropropagación vegetal .....	11
4.7.2 Explante .....	11
4.7.2.1 Preparación del explante .....	11
4.7.3 Medio de cultivo .....	12
4.7.3.1 Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog .....	12
4.7.4 Reguladores de crecimiento .....	13
4.7.4.1 Auxinas.....	14
4.7.4.2 Citoquininas o Citocininas.....	15
4.7.4.3 Giberelinas (AG).....	16
4.8 Condiciones ambientales que influyen en la micropropagación vegetal. ....	17
4.8.1 Luz .....	17

4.8.2 Fotoperiodo.....	17
4.8.3 Intensidad lumínica.....	17
4.8.4 Temperatura.....	17
4.8.5 Humedad relativa.....	17
4.9 Formación de estructuras callogénicas.....	18
4.9.1 Inducción del callo .....	18
4.9.2 Cultivo de callos .....	19
4.9.3 Variables a tomar en cuenta en la fase de callogénesis	20
<b>5. Metodología.....</b>	<b>22</b>
5.1 Ubicación del sitio de estudio.....	22
5.2 Metodología para evaluar el desarrollo de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo. ....	22
5.2.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	22
5.2.2 Selección del material vegetal .....	23
5.2.3 Preparación del medio de cultivo.....	23
5.2.4 Inoculación de los explantes .....	24
5.2.5 Diseño experimental .....	25
5.2.6 Factores y niveles.....	25
5.2.6.1 Especificaciones del diseño experimental.....	26
5.2.7 Hipótesis del modelo. ....	26
5.2.8 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina. ....	26
5.2.9 Variables evaluadas .....	27
5.2.10 Análisis estadístico .....	27
5.3 Metodología para evaluar el desarrollo de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad.....	28
5.3.1 Obtención del material vegetal .....	28
5.3.2 Preparación del medio de cultivo.....	28
5.3.3 Inoculación de explantes.....	28
5.3.4 Diseño experimental .....	29
5.3.5 Factores y niveles.....	29
5.3.5.1 Especificaciones del diseño experimental.....	30
5.3.6 Hipótesis del modelo .....	30

5.3.7 Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina. ....	30
5.3.8 Variables evaluadas .....	31
5.3.9 Análisis estadístico .....	31
5.4 Metodología para la difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación .....	31
<b>6. Resultados</b> .....	<b>33</b>
6.1 Efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.....	33
6.1.1 Porcentaje de contaminación de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	33
6.1.2 Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	34
6.1.3 Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	35
6.1.4 Porcentaje de formación de estructuras callogénicas, en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	36
6.1.5 Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	37
6.1.6 Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	38
6.1.7 Color de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación. ....	39

6.1.8 Friabilidad de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.....	40
6.2 Efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.....	41
6.2.1 Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	41
6.2.2 Porcentaje de sobrevivencia de los explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	42
6.2.3 Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	43
6.2.4 Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	44
6.2.5 Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	45
6.2.6 Color de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación. ....	46
6.2.7 Friabilidad de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación. ....	47
6.3 Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.....	48
<b>7. Discusión.....</b>	<b>49</b>
7.1 Contaminación de los explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	49
7.2 Oxidación fenólica de los explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación. ....	49
7.3 Sobrevivencia de los explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación. ....	49
7.4 Formación de estructuras callogénicas en explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	50
7.5 Raíces en estructuras callogénicas en explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	51

7.6 Brotes en estructuras callogénicas en explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	51
7.7 Color de las estructuras callogénicas en explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	52
7.8 Friabilidad en estructuras callogénicas en explantes en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	52
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Recomendaciones.....</b>	<b>55</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
<b>11. Anexos.....</b>	<b>65</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal .....	22
<b>Figura 2.</b>	A= Preparación del medio de cultivo. B= Etiquetado de frascos.....	24
<b>Figura 3.</b>	A= Inoculación de los explantes. B= Explantes inoculados en el medio de cultivo MS .....	25
<b>Figura 4.</b>	Porcentaje de contaminación de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	33
<b>Figura 5.</b>	Explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. contaminados, en fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	34
<b>Figura 6.</b>	Porcentaje de oxidación fenólica en los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	34
<b>Figura 7.</b>	Explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. fenolizados, en condiciones fotoperiodo a los 70 días de evaluación .....	35
<b>Figura 8.</b>	Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	35
<b>Figura 9.</b>	Explantes vivos de <i>Cinchona officinalis</i> L., en fotoperiodo a los 70 días de evaluación.....	36
<b>Figura 10.</b>	Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	36
<b>Figura 11.</b>	Estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., desarrolladas en condiciones de fotoperiodo a los 70 días de evaluación .....	37
<b>Figura 12.</b>	Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	37
<b>Figura 13.</b>	Raíces desarrolladas en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	38
<b>Figura 14.</b>	Porcentaje de estructuras callogénicas con brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	38
<b>Figura 15.</b>	Brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., desarrollados en estructuras callogénicas, en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	39
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje de coloración de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	39

<b>Figura 17.</b> Color de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en fotoperiodo, a los 70 días de evaluación. A= Color café. B= Color carmelita .....	40
<b>Figura 18.</b> Porcentaje friabilidad de estructuras callogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.....	40
<b>Figura 19.</b> Friabilidad de las estructuras callogénicas <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	41
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	41
<b>Figura 21.</b> Explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L. fenolizados, en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	42
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de supervivencia de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	42
<b>Figura 23.</b> Supervivencia de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	43
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	43
<b>Figura 25.</b> Estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., desarrolladas en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	44
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	44
<b>Figura 27.</b> Raíces desarrolladas en estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	45
<b>Figura 28.</b> Porcentaje de estructuras callogénicas con brotes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	45
<b>Figura 29.</b> Brotes <i>de novo</i> en <i>Cinchona officinalis</i> L., desarrollada en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	46
<b>Figura 30.</b> Porcentaje de coloración de las estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	46
<b>Figura 31.</b> Estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L. de color crema, en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	47
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de estructuras callogénicas friables de acuerdo a los tratamientos aplicados en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	47

<b>Figura 33.</b> Estructuras callogénicas friables de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	48
<b>Figura 34.</b> Difusión de resultados de investigación <b>A=</b> Exposición de resultados en casa abierta <b>B=</b> Socialización de resultados ante el equipo técnico del proyecto <i>Cinchona</i> . <b>C=</b> Entrega de trípticos.....	48
<b>Figura 35.</b> Tratamientos en fotoperiodo en el cuarto de incubación: <b>A=</b> Tratamiento 1. <b>B=</b> Tratamiento 2. <b>C=</b> Tratamiento 3. <b>D=</b> Tratamiento 4.....	65
<b>Figura 36.</b> Medio de cultivo contaminado, incubado en condiciones de fotoperiodo a los 70 días de evaluación.....	66
<b>Figura 37.</b> Presencia de callo en explantes incubados en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación .....	66
<b>Figura 38.</b> Brote de novo presente en el T3, incubado en total oscuridad a los 70 días de evaluación .....	67
<b>Figura 39.</b> Frasco de vidrio con brote de novo presente en el T3, incubado en total oscuridad a los 70 días de evaluación.....	67

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de nutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962).....	13
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos para evaluar el efecto del fotoperíodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	24
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos y su codificación para evaluar el efecto del fotoperíodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	25
<b>Tabla 4.</b> Factores y niveles de concentración de balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación <i>in vitro</i> de explantes sometidos en condiciones de fotoperíodo, para la obtención de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	25
<b>Tabla 5.</b> Especificaciones del diseño experimental, utilizado para la inoculación <i>in vitro</i> de explantes sometidos en condiciones de fotoperíodo, para la obtención de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	26
<b>Tabla 6.</b> Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperíodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas .....	27
<b>Tabla 7.</b> Tratamientos para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	28
<b>Tabla 8.</b> Tratamientos para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	29
<b>Tabla 9.</b> Factores y niveles de concentración del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación <i>in vitro</i> de explantes sometidos a oscuridad total, en la obtención de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	29
<b>Tabla 10.</b> Especificaciones del diseño experimental, utilizado para la inoculación <i>in vitro</i> de explantes sometidos a oscuridad total, para la obtención de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	30

**Tabla 11.** Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L..... 31

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y el fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	65
<b>Anexo 2.</b> Fotografías obtenidas en la inducción de estructuras callogénicas bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y el fotoperiodo, a los 70 días de evaluación .....	65
<b>Anexo 3.</b> Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y la total oscuridad, a los 70 días de evaluación.....	66
<b>Anexo 4.</b> Fotografías registradas en la inducción de estructuras callogénicas bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y la total oscuridad a los 70 días de evaluación .....	66
<b>Anexo 5.</b> Poster científico presentado para la difusión de resultados a actores sociales interesados .....	67
<b>Anexo 6.</b> Tríptico para la difusión de resultados con actores sociales interesados .....	68
<b>Anexo 7.</b> Certificado de traducción.....	69

## **1. Título**

**Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad**

## 2 Resumen

*Cinchona officinalis* L., es una especie de gran importancia ecológica, medicinal y económica, que se distribuye naturalmente a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera andina. Esta especie actualmente se encuentra en categoría de amenazada de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, debido a causas antrópicas y a su bajo porcentaje de regeneración natural. Por estas razones, se han realizado diversos esfuerzos para mantener y aumentar el número de individuos de esta especie en su hábitat natural, una de las técnicas con las que se ha logrado mejores resultados, es la micropropagación vegetal. En este contexto, la presente investigación se basa en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., probando el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog en diferentes concentraciones hormonales de Ácido Naftalenacético (ANA) y Kinetina (KIN), en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad) y de total oscuridad. El material vegetal utilizado fueron explantes extraídos de vitroplantas, los cuales fueron evaluados durante un periodo de 70 días, en intervalos de 3 días. Las variables evaluadas en los explantes fueron porcentajes de contaminación, fenolización, sobrevivencia, desarrollo de callos, raíces, brotes, color y friabilidad de los callos. En total se probaron 5 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos evidenciaron que la contaminación, únicamente se presentó en condiciones de incubación en fotoperiodo, en donde, el T1 (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) alcanzaron el 3 % de contaminación, respectivamente. La oxidación fenólica fue menor en fotoperiodo, en donde el T4 presentó tan solo el 3 % de oxidación de los explantes; por lo tanto, la sobrevivencia fue mayor en fotoperiodo, alcanzando un valor de 90 % en el T2; mientras que, las estructuras callogénicas se desarrollaron mejor en condiciones de total oscuridad, con un 86,5 % en el T4. En las estructuras callogénicas desarrolladas, se formaron raíces adventicias en mayor proporción en condiciones de fotoperiodo, en donde el T1 y T2, alcanzaron el 40 %; sin embargo, es necesario recalcar que las raíces presentaron mayor vitalidad en total oscuridad. En lo referente a la variable de formación de brotes adventicios en las estructuras callogénicas, estos fueron mayores en los tratamientos que no contenían ninguna combinación hormonal, en donde los brotes se formaron directamente de los explantes, sin que se presente la formación de estructuras callogénicas; así, en condiciones de total oscuridad, el T0 (0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN) presentó el 23 % de formación de brotes; sin embargo, los brotes presentaron mayor vitalidad en fotoperiodo. En lo relacionado a la variable coloración del callo, el T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), presentó la mejor coloración, que es el

color crema, con el 47 % en condiciones de fotoperiodo. Finalmente, la friabilidad se presentó mayormente en condiciones de fotoperiodo, en donde, en el T2 alcanzó el mayor porcentaje de callos friables con el 67 %. Se concluyó que el T4 fue el mejor para el desarrollo de las estructuras callogénicas en condiciones tanto de fotoperiodo como de oscuridad, mientras que, el mejor tratamiento para mantener estas estructuras en fotoperiodo fue con la aplicación de 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN y en oscuridad utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN.

**Palabras claves:** *Cinchona*, fotoperiodo, vitroplantas, callo, micropropagación

## 2.1. Abstract

*Cinchona officinalis* L. is a species of great ecological, medicinal and economic importance, which is naturally distributed throughout the tropical and equatorial zone of the Andean mountain range. This species is currently in the threatened category according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), due to anthropogenic causes and its low percentage of natural regeneration. For these reasons, various efforts have been made to maintain and increase the number of individuals of this species in their natural habitat, one of the techniques with which the best results have been achieved in plant micropropagation. In this context, the present investigation is based on the induction of callogenic structures of *Cinchona officinalis* L., testing the Murashige and Skoog basal culture medium in different ANA and KIN hormonal concentrations, under photoperiod conditions (16 hours of light and 8 hours of darkness) and total darkness. The plant material used was explants extracted from vitroplants, which were evaluated during a period of 70 days, at 3-day intervals. The variables evaluated in the explants were percentages of contamination, phenolization, survival, callus development, roots, shoots, color, and callus friability. In total, 5 treatments and three repetitions per treatment were tested. The results obtained showed that the contamination only occurred under photoperiod incubation conditions, where T1 (1.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN), T2 (2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) and T4 (2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN) reached 3% contamination, respectively. Phenolic oxidation was lower in photoperiod, where T4 presented only 3% oxidation of the explants; therefore, survival was higher in photoperiod, reaching a value of 90 % in T2; while, the callogenic structures developed better in conditions of total darkness, with 86.5% in T4. In the developed callogenic structures, adventitious roots were formed in a higher proportion under photoperiod conditions, where T1 and T2 reached 40 %; however, it is necessary to emphasize that the roots presented greater vitality in total darkness. Regarding the variable of formation of adventitious shoots in the callogenic structures, these were higher in the treatments that did not contain any hormonal combination, where the shoots were formed directly from the explants, without the formation of callogenic structures; thus, in conditions of total darkness, T0 (0.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN) presented 23 % shoot formation; however, the shoots presented greater vitality in photoperiod. Regarding the callus color variable, T2 (2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN), presented the best coloration, which is cream color, with 47 % under conditions of photoperiod. Finally, friability occurred mainly under photoperiod conditions, where, in T2, it reached the highest

percentage of friable calluses at 67 %. In conclusion, T4 was the best for the development of callogenic structures in both photoperiod and dark conditions, while the best treatment to maintain these structures in photoperiod was the application of 2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN and in the dark using 1.0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN. It was concluded that T4 was the best for the development of callogenic structures in both photoperiod and dark conditions, while the best treatment to maintain these structures in photoperiod was the application of 2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0.0 mg L<sup>-1</sup> KIN and in the dark using 1.0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN

**Keywords:** *Cinchona*, photoperiod, vitroplants, callus, micropropagation

### 3 Introducción

La especie *Cinchona officinalis* L., conocida comúnmente como cascarilla, quina, quina quina, polvos de la condessa, se la considera como la “Planta Nacional del Ecuador” y como el “Árbol de la vida”, debido a las propiedades curativas de su corteza (Cuvi, 2010). Históricamente, esta especie ha sido objeto de una explotación masiva durante muchos años sin tomar en cuenta la previsión de futuro, debido a su excesiva demanda, incremento de frontera agrícola, incendios forestales, etc, situación que ha degradado el hábitat de esta especie, logrando reducir de manera significativa su población, tanto que, en la actualidad, solo es posible encontrarla en pequeños relictos boscosos y lugares apartados de difícil acceso (Aldaz y Ochoa, 2011).

En condiciones naturales, *Cinchona officinalis* L. se propaga mediante semillas, su principal agente de dispersión es el viento y su agente polinizador son las aves. La especie posee un desarrollo lento y de acuerdo con Buddenhagen et al (2004) el género *Cinchona* en condiciones naturales presenta una tasa de germinación muy baja, constituyéndose en uno de los principales motivos por el cual la especie se encuentra en categoría amenazada (UICN, 2022).

Dentro de las alternativas de recuperación de poblaciones a partir de la producción masiva de plantas, aparece como alternativa la biotecnología vegetal, que es definida como el conjunto de diversas técnicas, las cuales utilizan partes vegetativas de una planta con fines de mejoramiento o conservación de tejidos y genes (Levitus et al., 2010). Esta aplicación nos ofrece la oportunidad de aumentar significativamente el número de plántulas por unidad de superficie, mediante la utilización de la técnica de micropropagación vegetal o cultivo de tejidos *in vitro*. La utilización de estas técnicas biotecnológicas, ofrecen mayores ventajas comparativas, frente a los métodos de propagación tradicionales; estas ventajas son: El uso de un reducido espacio de superficie, obtención de plantas libres de contaminantes y enfermedades, reducción del tiempo normal de la propagación, lo que origina nuevos individuos más saludables, para su adaptación a las condiciones naturales (Bisang et al., 2009).

En este contexto, la presente investigación, se articula como parte del proyecto de investigación macro denominado: “Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperíodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de

*Cinchona officinalis* L.”, que se ejecuta en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja; por lo tanto, los resultados obtenidos en la presente investigación contribuyen a la generación de información científica, para la inducción de estructuras callogénicas, probando concentraciones hormonales de auxinas y citocininas y dos métodos de incubación *in vitro* de los explantes, tanto en presencia de fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y en total oscuridad, con la finalidad de obtener mayor cantidad y calidad de estructuras callogénicas en explantes obtenidos a partir de vitroplantas. Además, estos resultados serán considerados como apoyo al trabajo de los investigadores y la comunidad científica; así como también, de las instituciones gubernamentales y no gubernamentales, que consideren a la especie en programas de forestación y reforestación.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, desde el mes de enero, hasta julio de año 2022, en la cual se persiguieron los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

- Contribuir a la generación de información científica relacionada con la influencia de la luz, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

**Objetivos Específicos:**

- Determinar el efecto del fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y la combinación hormonal auxina– citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Evaluar el efecto de la total oscuridad y la combinación hormonal auxina– citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

## 4 Marco Teórico

### 4.1 Descripción del género *Cinchona*

Las especies del género *Cinchona* son altamente reconocidas por su potencial uso en el campo de la medicina, ya que sus alcaloides producidos constituyeron la cura del paludismo o la malaria, siendo así nombrada como la “Salvadora de la humanidad” conmemorándose el remedio efectivo en contra las fiebres palúdicas (Buitron, 1999). De acuerdo con Guamán, (2014), aproximadamente 40 especies de árboles pertenecen al género *Cinchona*, de estos, 24 especies pertenecen a variedades de *Cinchona officinalis* L., las cuales alcanzan entre 15 a 20 metros de altura en su etapa adulta, además de producir flores de color rosa, blanco o amarillo. Se conoce que, cerca del 60 % de la corteza extraída de *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* L., es utilizada para la elaboración de medicamentos, además de su uso industrial en alimentos y diversas bebidas, estos productos son mayormente comercializados en mercados de la región europea (Ulloa, 2006).

El género se lo puede encontrar en la zona tropical y ecuatorial de la cordillera andina, desde los 12 ° en latitud norte hasta los 20 ° en latitud sur; el rango altitudinal donde se distribuye este género es de entre los 700 hasta 2 900 msnm (Garmendia, 2005). Son característicos por tener un tamaño mediano, corteza amarga, hojas color verde con la presencia de pequeñas flores, sus hojas son opuestas, entre lanceoladas y redondas, la longitud de estas es de 1 – 4 cm siendo estas, perennes. Las flores se presentan en panículas terminales y los frutos son en cápsula con numerosas semillas (Barrero et al., 2012).

### 4.2 Descripción botánica de *Cinchona officinalis* L.

De acuerdo con Andersson, (1998), *Cinchona officinalis* L., es de tipo arbóreo, alcanzando una altura de entre 11 a 15 metros, en diámetro es capaz de alcanzar entre 30 a 40 centímetros, posee ramificación tipo simpodial, copa globosa irregular, la forma de sus hojas tiende a variar entre orbicular a lanceolada de 8 a 27 cm de longitud y entre 7 a 18 cm de ancho.

Garmendia, (2005) afirma que, las flores se agrupan en panículas terminales con una longitud de entre 20 a 25 cm, estas son hermafroditas, actinomorfas; la corola es de color blanca rojiza. Los frutos tienen forma de cápsula con una coloración marrón oscuro en forma de elipsoide.

#### **4.3 Descripción taxonómica de *Cinchona officinalis* L.**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Gentianales

**Familia:** Rubiaceae

**Género:** *Cinchona*

**Especie:** *officinalis*

**Nombre Científico:** *Cinchona officinalis* L.

**Nombre Común:** cascarilla, quina, quinina, quina quina, polvos de la condesa.

#### **4.4 Ubicación y distribución geográfica de *Cinchona officinalis* L.**

Esta especie es nativa de valles andinos de Sudamérica (Buitron, 1999), su zona de vida está distribuida a partir de los 12 ° latitud Norte hasta 20 ° Sur, en esta zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes, se le puede encontrar en altitudes que van desde los 700 hasta 2 000 msnm, es una especie descubierta en el valle de Loja y por esto, considerada endémica del sur del Ecuador (Garmendia, 2005), sin embargo, es posible encontrar individuos de *Cinchona officinalis* L., en las provincias de Chimborazo, Bolívar, Cañar, Morona, Azuay, Loja y Zamora (Guamán, 2014).

#### **4.5 Importancia de *Cinchona officinalis* L.**

*Cinchona officinalis* L., ha tenido gran relevancia a partir del siglo XVII, por su uso en el campo de la medicina, ya que al aislar los alcaloides de esta especie se crea medicamentos que combaten la malaria. Debido a esto, su explotación fue desmesurada y en los últimos tiempos ha incrementado su aprovechamiento, que en cierto punto histórico disminuyó gracias a la creación de alcaloides sintéticos, aunque los parásitos de la malaria se han vuelto resistentes a estos medicamentos sintéticos (Cóndor et al., 2009).

#### **4.6 Usos de *Cinchona officinalis* L.**

De entre sus diversos usos, se destaca el uso de su madera, aplicada para postes, leña, vigas e inclusive carbón, en cuanto a su corteza, posee compuestos metabólicos, razón por la que fue explotada de manera indiscriminada (Lojan, 1992).

Su corteza es utilizada mayormente en el campo de la medicina para la extracción de la quinina, el cual es un alcaloide que está presente en la producción de fármacos antimaláricos, esto además del uso que se le da como estimulador del apetito y crecimiento capilar, como cura de neumonías, depurativa y controlador del ritmo cardíaco, de la misma manera se la utiliza en la industria alimenticia como agua tónica, conocida como “gin tonic” y se la comercializa mayormente en el mercado europeo (Ulloa, 2006).

En el aspecto culinario, desde la corteza se extrae la quinina, la cual brinda un sabor amargo al combinar este con agua tónica para realizar cocteles, de la misma manera, esta combinación es aplicada en la industria de bebidas gaseosas las cuales, principalmente se comercializan en Europa y Estados Unidos (Ulloa, 2006).

#### **4.7 Biotecnología vegetal**

Es la aplicación de la ciencia en auge, esta emplea organismos vivos y todas sus características, su finalidad es crear, obtener y modificar productos. Esta aplicación ha tenido un rápido desarrollo, esto debido a nuevas demandas de consumidores e industrias agroalimentarias para producción a mayor escala. Esta constituye una herramienta de suma importancia para procesos productivos, esto a nivel técnico, para la obtención de especies mejoradas, las grandes industrias cuentan con el apoyo y el debido asesoramiento desde organismos públicos de investigación (Vertedor et al., 2016). Además, Sasson (1994) define a la biotecnología como una aplicación de diferentes principios científicos y conocimientos de ingeniería para procesar materiales por medio de agentes biológicos, refiriéndose principalmente a las células animales y vegetales, enzimas, macroorganismos y en general, al material genético aislado.

En base a esto, gracias a nuevas tecnologías y desarrollo de técnicas, que han permitido aislar células, órganos o tejidos, han permitido cultivar pequeños segmentos de plantas sobre medios completamente sintéticos que poseen los elementos correctos y necesarios para el desarrollo de estos segmentos, estos son sometidos a condiciones controladas que simulan el ambiente natural con la diferencia de ser un ambiente totalmente aséptico, todo esto con el propósito que a partir de estos segmentos minúsculos, se regenere todo el individuo vegetal (Martínez et al., 2003).

Se entiende entonces, como una herramienta innovadora y creciente en su aplicación, dentro de sus objetivos básicos, se encuentran el aplicar recursos genéticos para mejoramiento

de especies seleccionadas y el mantenimiento de la diversidad genética en bosques naturales con fines de conservación (Soto et al., 2010).

#### **4.7.1 *Micropropagación vegetal***

Desde el punto de vista de Núñez y Gago (2007), la micropropagación vegetal es la manera generalizada del cultivo *in vitro*, es con esta aplicación donde desde únicamente un fragmento de la planta conocida como “planta madre”, se obtiene una descendencia genéticamente idéntica, también llamados clones. Es todo un proceso que empieza por la selección del material vegetal correcto, hasta la obtención de la planta lista para plantarse en campo. Cabe destacar que todo el proceso se lo realiza en condiciones controladas y en un ambiente totalmente aséptico.

De la misma manera, la aplicación de la denominada micropropagación tiene gran impacto en cultivos de tejidos; esta multiplicación celular está basada en la totipotencia, la cual involucra una gran serie de fases, desde procedimientos previos a establecimiento de cultivos, el mismo establecimiento, proliferación de los subcultivos, enraizamiento, aclimatación del material obtenido y su trasplante en campo (Cruz, 2012). Esta técnica enfrenta limitaciones, tales como la etapa de enraizamiento, ya que varias especies no responden favorablemente a las hormonas de enraizamiento, también en la etapa de aclimatación, debido a que se toma en cuenta aspectos como el manejo del material, su fisiología y anatomía (Lucero, 2013).

#### **4.7.2 *Explante***

Hace referencia a cualquier parte vegetal, separada de la planta madre, este tejido puede ser fragmentos de hojas, raíces, tallos, pétalos, etc. (Narváez, 2009). También se puede extraer de órganos en específico como puede ser el caso de anteras, semillas, botones florales, ovarios u otros, e incluso células individuales. El éxito del cultivo *in vitro* se ve influenciado parcialmente por los factores del explante como pueden ser el tamaño, estado de desarrollo de la especie, edad fisiológica de este explante, fuente del tejido u órgano (Conger, 2018).

##### **4.7.2.1 *Preparación del explante***

El primer paso es la selección de la mejor planta madre, en caso de ser extraído desde el campo, en condiciones naturales, requiere una desinfección superficial para evitar que hongos y bacterias crezcan en el medio de cultivo. Dentro de los desinfectantes más comunes encontramos la solución de hipoclorito de sodio y de calcio, también el peróxido de hidrógeno,

nitrate de plata, cloro, alcohol en distintos porcentajes, etc. El desinfectante a aplicar se lo elige en función a las características del explante o en base a la literatura. Un buen explante es aquel que sus células sobreviven en alta proporción ante el desinfectante y posteriormente se desarrolla con normalidad en condiciones *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991).

Una vez realizada la desinfección, se procede a colocar el material vegetal sobre papel filtro y luego, proceder al aislamiento del explante, sobre el medio de cultivo; este proceso se lleva a cabo en la cámara de flujo laminar, la cual nos brinda un área totalmente aséptica. Cabe recalcar que el éxito del cultivo *in vitro* está directamente influenciado a factores del explante, como pueden ser: tamaño, estado de desarrollo, edad fisiológica, fuente del tejido u órgano y su genotipo arbores (George y Sherrington, 1984). Seguidamente, se lleva las plantas seleccionadas al laboratorio para realizarles una desinfección completa a los explantes. Se recalca además que las plantas seleccionadas deben ser previamente tratadas con fungicida, esto debe ser mínimo un mes antes de la recolección (Guartanza, 2019).

#### **4.7.3. Medio de cultivo**

Se conoce como medio de cultivo al conjunto de nutrientes y componentes como sales minerales, vitaminas, agua, agar, reguladores de crecimiento y azúcar, que crean condiciones necesarias para el correcto desarrollo de los organismos (Rodríguez y Zhurbenko, 2018). No existe un medio de cultivo universal, este es específico para cada especie y cada tipo de organismo (Villalobos y Thorpe, 1991). Este medio de cultivo puede tener una consistencia sólida o líquida y tomando en cuenta que además de sus componentes principales, también podemos adicionar reguladores de crecimiento y en casos excepcionales, otras sustancias (Figuerola, 2015).

**4.7.3.1. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962).** Las sales minerales del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) se suelen dividir en macro y micronutrientes, los elementos que conforman esta sustancia son: Nitrate de potasio; Nitrate de amonio; Sulfato de magnesio, Sulfato de zinc, Sulfato cúprico, Cloruro de potasio, Yoduro de potasio, Fosfato de potasio, Ácido bórico y Molibdato de sodio (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de nutrientes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962)

<b>Macronutrientes</b>	
<b>Nomenclatura</b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,00
KNO <sub>3</sub>	1 900,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00
CaCl <sub>2</sub> .aq	440,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
<b>Micronutrientes</b>	
<b>Nomenclatura</b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	15,50
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80

Fuente: Murashige y Skoog (MS, 1962).

#### **4.7.4. Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento, de acuerdo con (Brinkman, 2020), son productos químicos que contienen materias activas de origen sintético o natural, estas cumplen la función de reguladoras durante el desarrollo del individuo vegetal, logran influir en el crecimiento de las plantas y sus órganos, por ejemplo: raíces, tallos, hojas, frutos y semillas.

**4.7.4.1. Auxinas.** Las auxinas fueron el primer gran descubrimiento en el grupo de las fitohormonas. Los registros muestran que desde el siglo XIX se observó sus efectos en la elongación de plantas y desde aquel momento se pensó en aumentar la productividad de los cultivos (Redagrícola, 2017). Las auxinas están implicadas con el desarrollo vegetal ya que afecta la división celular de la misma manera con el crecimiento y diferenciación del tejido vegetal. Estas sintetizan las regiones meristemáticas desde tallos y desde este sitio, migran a todas las zonas de la planta, este viaja por el parénquima. Su accionar se ve implicado con hormonas como las giberelinas, el etileno y citoquininas, estas producen el efecto de alargamiento de raíz y tallos, al aplicarlas sobre una estructura callogénica estimula la formación de las traqueidas por medio de la diferenciación de células del propio callo (J. C. Martínez, 2017).

**A. *Ácido Naftalenacético (ANA).*** El ácido naftalenacético (A.N.A) es un bioestimulante o fitorregulador, el cual de acuerdo con la dosis aplicada y el momento en el que se aplica, actúa en la división celular, induce formación de raíces en la zona aplicada, también controla los rebrotes después de ser podado y si se aplican en altas concentraciones, actúa con inhibidor de crecimiento (Alcantara et al., 2019). Su utilización de manera general, impide crecimiento de los brotes y es recomendada la aplicación de esta, para evitar una caída de flores y frutos de manera prematura en situaciones donde el fruto sea de alto interés comercial o en caso de plantas ornamentales cuando se quiera aumentar el tiempo de floración (AgroActivo, 2022).

**b. *Ácido indol butírico (AIB).*** El Ácido indol butírico (AIB) es un compuesto de origen natural, de consistencia sólida y cristalina con un color blanquecino. Este ácido es soluble únicamente en etanol a una concentración de 75 %, la solución del mismo debe mantenerse en un ambiente frío y de preferencia a temperaturas menores a 0 °C (Pohanish, 2015).

En el principio, se dio uso como un producto de únicamente síntesis, actualmente puede ser extraído de diferentes especies del género *Salix*. El ácido indol butírico, se utiliza para la estimulación de formación de raíces, por lo general se usa directamente sobre estacas o más comúnmente usado sobre cultivos de hortalizas, plantas ornamentales, otra de las aplicaciones es para incrementar el tamaño de frutos con énfasis en melones, sandías, mangos y melones (Srivastava, 2002).

c. **Ácido indolacético (AIA).** El ácido indol-3-acético, de acuerdo con Won et al., (2011) es una fitohormona natural, perteneciente al grupo de las auxinas, que se produce en ápices de hojas jóvenes y es nativa de plantas superiores. El AIA está directamente involucrado con el desarrollo de las plantas, incluyendo el alargamiento y la división celular, la diferenciación de su tejido, fototropismo y gravitropismo.

Se conoce que hongos, bacterias, y algas, también son capaces de sintetizar AIA, este puede afectar el desarrollo y crecimiento de plantas. Las plantas superiores tienen la capacidad de exudar el precursor de su biosíntesis de AIA microbiano, el cual es el aminoácido triptófano (Press et al., 1997).

**4.7.4.2. Citoquininas o Citocininas.** Estas citoquininas cumplen con la regulación del ciclo celular ayudando así al mantenimiento de los meristemos; en conjunto con las auxinas, controlan la preformación de órganos, de acuerdo con el método de operación de Skoog-Miller sobre organogénesis, es el balance auxina/citoquinina, siendo las auxinas favorables (J. C. Martínez, 2017).

Es por esto que se hace posible la diferenciación de yemas vegetativas, mientras que si la cantidad de citoquinina es favorable, se dará formación de raíces. De acuerdo con Martínez (2017), estas son sustancias que se derivan de la adenina y promueven la división celular, dentro de estas, se mencionan: K (kinetina), BA (bencil adenina), 6-furfuril aminopurina, Z (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). (Godoy et al., 2006). Entre ellas, Zea y 2-iP son naturales, mientras que Ba y K, son citocininas sintetizadas.

La aplicación de estas citoquininas se la realiza de manera común para la proliferación de tejidos, siendo necesaria para esta una baja concentración de la misma; en caso de utilizarse citoquininas en altas concentraciones, estas favorecen la proliferación *in vitro* de meristemos axilares y para la formación de yemas sobre callos, se debe realizar una aplicación moderada (Jacques, 1988).

**a. Kinetina (K).** Kinetina pertenece al grupo de las citoquininas (reguladores de crecimiento implicados en respuesta a la senescencia, estrés, asimilación y movilización de nutrientes y la fotosíntesis), la cual promueve la división celular aplicado en el cultivo de tejidos vegetales con la finalidad de producir nuevas plantas a partir de estos tejidos. Se emplea generalmente junto con las auxinas y agregadas al medio de cultivos como Murashige y Skoog (MS, 1962). También gracias a su aplicación es posible inducir la formación de callos y mediante esto, regenerar tejidos de plantas a partir de estas estructuras callogénicas (GreenImport, 2021).

Además, se ha comprobado que la kinetina posee efectos de antienviejecimiento en las células de la piel humana y en otros sistemas, es por esto que actualmente se están realizando investigaciones para la aplicación de esta citoquinina en el cuidado de la piel y productos cosméticos (Senna, 2022).

**b. Zeatina (Z).** Zeatina es una de las fitohormonas pertenecientes al grupo de citoquininas que se aíslan de las plantas, esta es sintetizada desde la isopentil adenina. Su descubrimiento fue en el año de 1964, cuando se logró aislar desde las semillas del maíz la citoquinina natural más activa conocida hasta ahora (Azcón y Talón, 2013). Su aplicación es con el fin de inducir la división celular, también la ruptura de la dominancia apical, preformación de órganos en cultivos vegetales, acelerar su floración, el desarrollo de cloroplastos y mejora la germinación de las semillas mediante el contrarrestar de la dormancia de estas mismas (Biochemie, 2010).

**c. Benciladenina (BA).** Perteneciente al grupo de citoquininas, la benciladenina es comúnmente utilizada para lograr la brotación en numerosas especies gracias a que induce la pronta división celular, aumenta el contenido de clorofila por medio de la diferenciación de cloroplastos, incrementa la actividad fotosintética, así como también retrasa de senescencia y permite la pérdida de dominancia apical (Campos-Ruíz et al., 2014).

**4.7.4.3. Giberelinas (AG).** El descubrimiento de las giberelinas fue un inspirador hallazgo dentro del mundo de la ciencia, este descubrimiento se dio mientras se estudiaba una enfermedad vegetal que provocaba el excesivo crecimiento de los tallos en el arroz, donde identificaron que el causante era un hongo denominado *Giberella fujikuroi* (Martínez, 2017).

Estas son compuestos naturales que ayudan mediante su función de regulador endógeno, estos son esenciales para el correcto desarrollo y crecimiento en vegetales superiores. Estos

estimulan el crecimiento del tallo, así como en su etapa adulta, al desarrollo del fruto y germinación de semillas (Jordán y Casaretto, 2006).

#### **4.8. Condiciones ambientales que influyen en la micropropagación vegetal.**

Dentro de la micropropagación influyen varios factores, entre ellos los ambientales.

##### **4.8.1. Luz**

La luminosidad o luz, juega un papel importante en el proceso de micropropagación vegetal, ya que se toma en cuenta su calidad, intensidad y fotoperiodo, dado que estos influyen directamente en el metabolismo de los individuos vegetales y en la síntesis y posterior acumulación de sustancias. Para proporcionar luz artificial, se emplea luz blanca a través de tubos fluorescentes (Pierik, 1990).

##### **4.8.2. Fotoperiodo**

Como afirma Mendoza (2012), el individuo vegetal se ve en la necesidad de hacer fotosíntesis, si bien en varios cultivos *in vitro* depende de la calidad de la luz, así mismo su intensidad y el fotoperiodo de la luz, este fotoperiodo indica las horas de luz y oscuridad, siendo así la cantidad habitual utilizada son 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

##### **4.8.3. Intensidad lumínica**

Dadas las condiciones *in vitro* clásicas, la calidad de luz y su intensidad es baja, es por estos motivos que se recomienda hacer mezcla de varios tipos de luces en la misma sala de incubación, permitiendo así diferentes longitudes de ondas. Cabe recalcar que el espectro útil para organismos vegetales es de entre 400 hasta 700 nanómetros (Escalante y Morrone, 2002).

##### **4.8.4. Temperatura**

La temperatura no es general para todos los cultivos, esta depende de la especie con la cual se esté trabajando, para idealizar se aplica una temperatura de alrededor de 18 °C para especies bulbosas y cuando se trabaja con especies tropicales, la temperatura se aplica alrededor de 28°C (Serrano y Piñol, 1991).

##### **4.8.5. Humedad relativa**

En los cultivos *in vitro* la humedad relativa es alta, esto debido a la condensación de las paredes de los tubos o frascos en donde se encuentran y por lo general este explante *in vitro* no

desarrolla sistemas adecuados de regulación hídrica como pueden ser cutículas, ceras o estomas (Laya et al., 1994).

De acuerdo con Pierik, (1990) la humedad relativa del aire del área donde se incuban, únicamente influye en pérdida de agua en tubos o frascos, sin embargo, Roca y Mroginski (1991), opinan que la humedad en el área de incubación debería ser entre el 70 a 80 %.

#### **4.9. Formación de estructuras callogénicas**

Un callo se define como aquel conjunto de células que se originan a partir de una desorganización de un tejido vegetal, siendo esta una masa amorfa que mantiene su capacidad de dividirse (Laya et al., 1994). Para estos fines los explantes más utilizados han sido partes de hojas; cabe recalcar que pueden ser usada, cualquier parte de la planta, tomando en cuenta factores de la planta procedente o planta madre, como puede ser la edad de la misma y el sitio de donde procede (K. M. Lima, 2020).

La formación de estructuras callogénicas consiste en la producción de nuevo material vegetal, esto a partir de porciones pequeñas que material vegetal llamados explantes. Este proceso se debe llevar a cabo en un ambiente aséptico y en recipientes de vidrio y en una sala donde se controla de manera estricta las condiciones ambientales, nutrición y condiciones sanitarias (Beraud et al., 2014).

Esta técnica, permite conocer aspectos específicos como el comportamiento físico, bioquímico y metabólico, controlando y optimizando de esta manera sus condiciones para los diferentes fines. En procesos subsiguientes, es necesario conocer su cinética de crecimiento y su tipo de comportamiento en estas situaciones. Estas estructuras callogénicas son aplicadas generalmente a la para producción de embriones somáticos (K. M. Lima, 2020).

##### **4.9.1. Inducción del callo**

Se define como la multiplicación del material vegetal mediante la formación de una masa amorfa de células indiferenciadas, esto en un ambiente aséptico y en recipientes libres de contaminación. Por lo general, el propósito de la realización de estructuras callogénicas es para obtener a partir de este, muchos más individuos, también pudiendo aplicar mejoramiento genético. Esta inducción se la puede realizar en casi todas las especies vegetales (Laya et al., 1994).

Es de suma importancia que todo el procedimiento para la obtención de callos se lleve a cabo en un laboratorio con instalaciones adecuadas y llevando a cabo la aplicación de técnicas asépticas, un embrión somático es caracterizado por poseer estructura bipolar, desarrollada de manera precoz y simultáneamente los meristemas radiculares y apicales (Laya et al., 1994).

#### **4.9.2. Cultivo de callos**

De acuerdo con González, (2017) la formación del callo da su inicio en el aislamiento de un órgano o tejido definido. Gracias a la presencia de una auxina exógena encontrada en el medio de cultivo, el tejido se desdiferencia presentando una proliferación continua y acelerada, originando una masa de tejidos. Un callo es la muestra del proceso de indiferenciación y de división celular intensiva, generando todo tipo de órganos sin orden específico, estos dependen principalmente de la planta madre, el genotipo que esta posea, el medio de cultivo dónde sea puesto el explante, los reguladores de crecimiento aplicados en el medio de cultivo, la concentración de estos mismos y su combinación (Beraud et al., 2014)

La producción de callo necesita de un explante inicial, este puede tener alta diferenciación de sus tejidos, como raíz, tallo u hoja, o también tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Correia y Canhoto, 2010). En todos los casos, la inducción de callo representa un proceso de desdiferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento, así como su concentración y combinación. Existe tendencia a emplear tejidos más jóvenes posibles, esto ha permitido éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes especies consideradas “recalcitrantes”. El uso de diversas partes de plantas *in vitro*, así como el uso de órganos o fragmentos de órganos encerrados en los frutos o las inflorescencias, han permitido la reducción de la contaminación a niveles muy bajos (González, 2017).

Los callos pueden ser utilizados para hacer suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Por lo general, esta vía requiere la aplicación de elevadas concentraciones de auxinas en la etapa de inducción de las estructuras callogénicas (Sánchez y Alvarenga, 2015).

#### **4.9.3. Variables a tomar en cuenta en la fase de callogénesis**

##### a) Contaminación

Los contaminantes más comunes *in vitro* son hongos, bacterias y levaduras, conocidos como “vitropatógenos”, aunque tipos menos comunes incluyen virus, viroides y microorganismos (ácaros y trips) (Hernandez y Gonzalez, 2010).

##### b) Fenolización

De acuerdo con Pedroza et al (2010), la fenolización se da desde que los tejidos son dañados y estos liberan compuestos fenólicos, que se evidencian con el oscurecimiento del tejido y la subsiguiente muerte de los explantes; por cuanto, la oxidación fenólica de los explantes, es un fenómeno fotoactivo, que se da en presencia de la luz y del oxígeno, en dónde, las estructuras callogénicas tienden a oxidarse con mayor facilidad, presentando una coloración café oscura en sus tejidos.

##### c) Sobrevivencia

La sobrevivencia de los explantes inoculados *in vitro*, está condicionada a las condiciones ambientales de incubación, a la naturaleza del explante y a los componentes del medio de cultivo, que hacen posible la sobrevivencia de los mismos, para ser utilizados en las subsiguientes fases de la micropropagación.

##### d) Individuos con callos

Una estructura callogénica se entiende como una masa amorfa de células indiferenciadas que, gracias a la aplicación de auxinas y citoquininas, se puede inducir brotes y raíces *de novo*, que son órganos adventicios, con el propósito de incrementar la tasa de multiplicación potencial de las especies vegetales; así como también, contribuir a la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Los individuos con callos se representan como el porcentaje de los explantes que han desarrollado estructuras callogénicas.

##### e) Raíces por callo

La organogénesis del callo, permite formación de raíces por efecto de auxinas y citoquininas aplicadas o propias del material vegetal. La variable raíces por callo se expresa como el porcentaje de estructuras callogénicas donde se presencian raíces.

f) Brotes por callo

La organogénesis de las estructuras callogénicas, permite la aparición de brotes por el efecto de las hormonas auxinas y citoquininas, brotes por callo se expresa mediante el porcentaje de estructuras callogénicas que desarrollan pseudobrotes.

g) Color

El color que presentan las estructuras callogénicas, están estrechamente relacionadas con la vitalidad y proliferación de brotes *de novo* en las mismas. En orden de prioridad, las mejores coloraciones son: el color crema, carmelita y café oscuro, siendo esta última, en donde las células se encuentran en un estado de degradación, con la subsiguiente presencia de mortalidad de las mismas.

h) Friabilidad

Como afirma Rosales (2006), se entiende como friabilidad a la capacidad que tiene una estructura callogénica de disgregarse producto de la rápida multiplicación celular, es decir, la facilidad que posee esta para dividirse. Mientras más friable es el callo, más fácilmente se divide, por lo tanto, es posible obtener varios callos de un callo principal.

## 5 Metodología

### 5.1 Ubicación del sitio de estudio.

El presente trabajo de investigación, se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, perteneciente a la Universidad Nacional de Loja, mismo que se encuentra ubicado a 3 km al sur de la ciudad de Loja, entre las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S – 79° 12' 00" O (Figura 1) (Díaz, 2012).

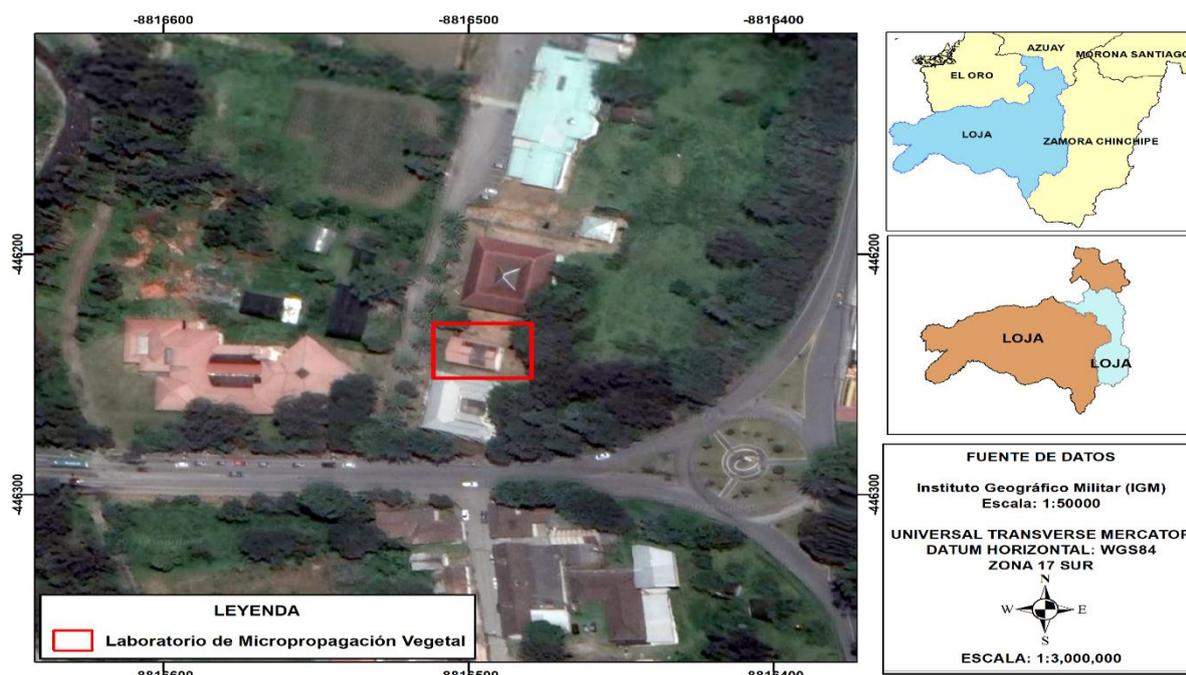


Figura 1. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.  
Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

### 5.2 Metodología para evaluar el desarrollo de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo.

Para el cumplimiento de este objetivo, se contó con material vegetal *in vitro*, el mismo que se viene desarrollando en condiciones de asepsia en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de acuerdo con el protocolo de Lima et al (2018), para lo cual se empleó la siguiente metodología:

#### 5.2.1 Germinación *in vitro* de semillas

A fin de contar con la suficiente cantidad de material vegetal necesario para establecer los ensayos, se procedió a realizar la siembra *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) con la finalidad de obtener vitroplantas.

### **5.2.2 Selección del material vegetal**

El material vegetal se obtuvo a partir de vitroplantas del Proyecto macro de Investigación *Cinchona*, que se desarrolla en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja.

Los explantes utilizados en la presente investigación, procedieron de vitroplantas del árbol semillero número 3, del relicto boscoso ubicado en el sitio Selva Alegre, perteneciente al cantón Saraguro, en la provincia de Loja. Para la inoculación *in vitro* de los explantes, se utilizaron secciones de: nudos, hojas, cotiledones, brotes axilares y terminales, con la mejor vitalidad y características morfológicas (coloración verde predominante, sin oxidación fenólica y órgano bien desarrollado), los cuales no requirieron desinfección, por tratarse de material aséptico.

### **5.2.3 Preparación del medio de cultivo**

El medio de cultivo basal, estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), al cual se adicionó el complejo vitamínico: Vitaminas B5, formado por: Tiamina 1 mg L<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, piridoxina 1,0 mg L<sup>-1</sup> y ácido nicotínico 2,0 mg L<sup>-1</sup>; más glicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>; ergostín 1,5 mg L<sup>-1</sup>; sacarosa 2 %; agar 0.6 %.

Los reguladores de crecimiento que se utilizaron, para inducir formación de estructuras callogénicas, estuvieron conformados por el balance hormonal auxina-citoquinina: ácido naftalenacético (ANA) + kinetina (KIN), en diferentes concentraciones, las cuales constituyeron los tratamientos a ser evaluados (Tabla 2). El Ph del medio de cultivo se ajustó en un rango de 5,8 ± 0,2; utilizando para ello NaOH o HCL.

Posteriormente, el medio de cultivo fue distribuido en frascos de vidrio, a razón de 25 ml por frasco; finalmente, fueron esterilizados en la autoclave, a una temperatura de 120 °C y presión de 1,5 kg/cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos (Figura 2).

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del fotoperíodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO	
		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	KINETINA (mg L <sup>-1</sup> )
1.	T0	0,0	0,0
2.	T1	1,0	0,0
3.	T2	2,0	0,0
4.	T3	1,0	0,5
5.	T4	2,0	0,5

T= Tratamiento ANA= Acido naftalenacético.

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

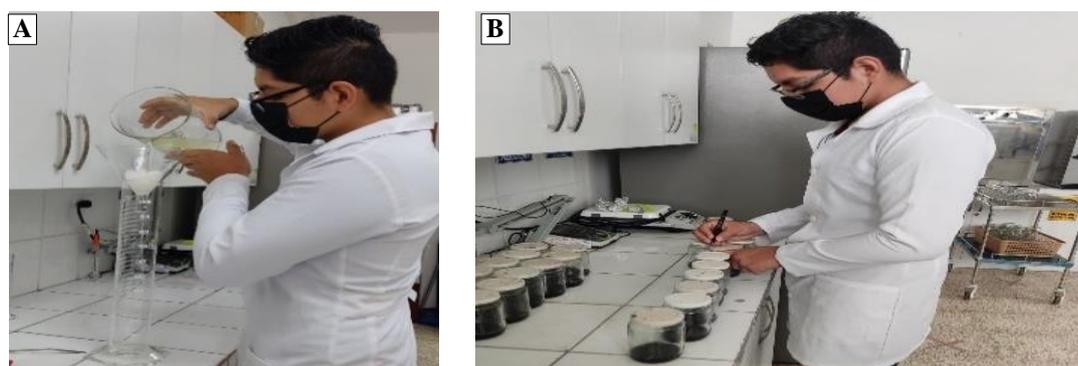


Figura 2. A= Preparación del medio de cultivo. B= Etiquetado de frascos.

#### 5.2.4 Inoculación de los explantes

El procedimiento de inoculación *in vitro*, se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, para lo cual, cerca del mechero bunsen y en condiciones de total asepsia se desinfectó externamente el frasco que contenía la vitroplanta, con algodón empapado en alcohol del 70 %. Luego de evaporado el alcohol, cada frasco fue flameado y se procedió a destaparlo, y con la ayuda de pinzas estériles se extrajo la vitroplanta, para finalmente con el uso del bisturí, se realizó la disección de la vitroplanta en explantes de 1 a 1,5 cm de longitud.

A continuación, los explantes fueron inoculados a razón de dos por cada frasco, constituyendo cada explante la unidad experimental. Finalizado el proceso de inoculación de los explantes, fueron etiquetados los frascos con su tratamiento respectivo, los cuales se trasladaron al cuarto de incubación, donde se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, durante 70 días de evaluación (Figura 3).

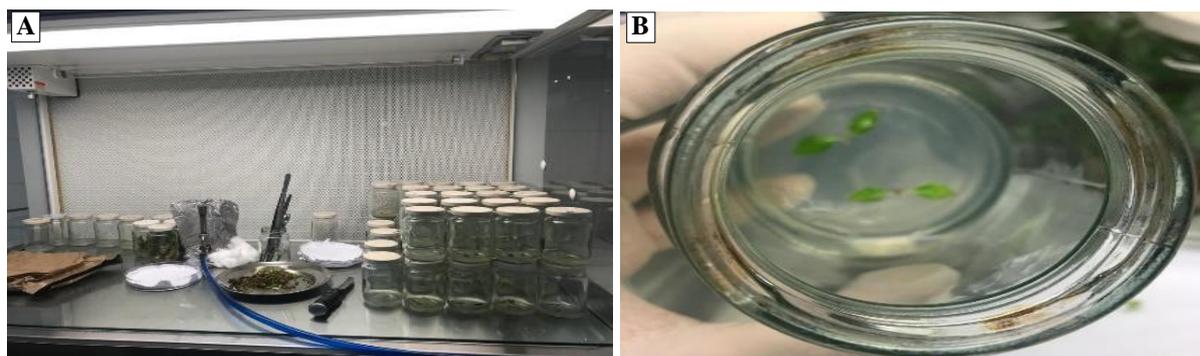


Figura 3. **A**= Inoculación de los explantes. **B**= Explantes inoculados en el medio de cultivo MS.

### 5.2.5 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos, fue completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial de 3 x 2, con 4 tratamientos más un testigo y 3 repeticiones, cada tratamiento estuvo conformado por 15 frascos de vidrio, con dos explantes por frasco (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos y su codificación, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO		CODIFICACIÓN
		ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	KINETINA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
1.	T0	0,0	0,0	T0FP
2.	T1	1,0	0,0	T1A1C0FP
3.	T2	2,0	0,0	T2A2C0FP
4.	T3	1,0	0,5	T3A1C1FP
5.	T4	2,0	0,5	T4A2C2FP

T= Tratamiento. ANA= Acido naftalenacético. A= Auxina. C=Citoquinina. FP=Fotoperíodo.

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

### 5.2.6 Factores y niveles

Los factores y niveles evaluados, para la obtención de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de vitroplantas, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores y niveles de concentración del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación *in vitro* de explantes sometidos en condiciones de fotoperiodo, para la obtención de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

Factores	Niveles ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Nivel de concentraciones de auxinas (A)	1. 0,0
	2. 1,0
	3. 2,0
Nivel de concentraciones de citoquininas (C)	1. 0,0

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

**5.2.6.1 Especificaciones del diseño experimental.** Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial, con 4 tratamientos y 3 repeticiones cada uno.

Tabla 5. Especificaciones del diseño experimental, utilizado para la inoculación *in vitro* de explantes sometidos en condiciones de fotoperiodo, para la obtención de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

DESCRIPCIÓN	UNIDAD
Unidad Experimental	Un explante
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos por tratamiento	15
Número de callos por frasco	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	30
Número de unidades experimentales (explantes) del ensayo	150
Número de frascos del ensayo	75

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

### 5.2.7. Hipótesis del modelo.

H0: El fotoperiodo y la combinación hormonal auxina – citoquinina no influyen en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

H1: El fotoperiodo y la combinación hormonal auxina – citoquinina influyen en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

### 5.2.8. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina.

A continuación, se detalla la distribución de los tratamientos y repeticiones, en el cuarto de incubación:

Tabla 6. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de explantes obtenidos de vitroplantas.

<b>TOFP (T0)</b>			<b>T1A1C0FP (T1)</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T2A2C0FP (T2)</b>			<b>T3A1C1FP (T3)</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T4A2C2FP (T4)</b>					
R1	R2	R3			

T= Tratamiento. FP= Fotoperiodo. R= Repetición. A= Auxina. C= Citoquinina.

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

### 5.2.9. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron en este objetivo, fueron las siguientes:

- Porcentaje de explantes contaminados
- Porcentaje de explantes fenolizados
- Porcentaje de explantes muertos
- Porcentaje de explantes con callo
- Porcentaje de raíces por callo
- Porcentaje de brotes por callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo

Las evaluaciones se realizaron a partir del tercer día de inoculación de los explantes, cada tres días, durante un tiempo de 70 días.

### 5.2.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad, luego de comprobar que los datos cumplieron con normalidad y homecedasticidad, con el objetivo de identificar y analizar la existencia de diferencias significativas en sus medias y varianzas.

### 5.3 Metodología para evaluar el desarrollo de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad total.

#### 5.3.1 Obtención del material vegetal

Para la obtención del material vegetal del segundo objetivo, se realizó el mismo procedimiento metodológico descrito en el primer objetivo.

#### 5.3.2 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), al cual se le adicionó el complejo vitamínico: Vitaminas B5, conformado por: Tiamina 1 mg L<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, piridoxina 1,0 mg L<sup>-1</sup> y ácido nicotínico 2,0 mg L<sup>-1</sup>; más glicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>; ergostín 1,5 ml L<sup>-1</sup>; sacarosa 2 %; agar 0,6 %. Los reguladores de crecimiento que se utilizaron para inducir formación de estructuras callogénicas, estuvieron conformados por el balance hormonal auxina y citoquinina: ácido naftalenacético (ANA) + kinetina (KIN) en diferentes concentraciones, las cuales constituyeron los tratamientos a ser evaluados (Tabla 7). El pH del medio de cultivo se ajustó en un rango de 5,8 ± 0,2; utilizando para ello NaOH o HCL, según el requerimiento.

Posteriormente, el medio de cultivo fue distribuido en frascos de vidrio tipo compota, a razón de 25 ml por frasco; finalmente, fueron esterilizados en autoclave, a una temperatura de 120 °C y una presión de 1,5 kg/cm<sup>2</sup>, durante un tiempo de 20 minutos.

Tabla 7. Tratamientos para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO		CODIFICACIÓN
		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	KINETINA (mg L <sup>-1</sup> )	
1.	T0	0,0	0,0	T0OS
2.	T1	1,0	0,0	T1A1C0OS
3.	T2	2,0	0,0	T2A2C0OS
4.	T3	1,0	0,5	T3A3C0OS
5.	T4	2,0	0,5	T4A1C1OS

T= Tratamiento. ANA= Acido Naftalenacético. OS= Oscuridad. A= Auxina. C= Citoquinina.

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

#### 5.3.3 Inoculación de explantes

El procedimiento de inoculación fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar, para lo cual, cerca del mechero bunsen y en condiciones de total asepsia, se desinfectó externamente

el frasco que contenía la vitroplanta con alcohol del 70 %, seguidamente y luego que se evaporó el alcohol, se flameo cada frasco al mechero y se procedió a destaparlos; con la ayuda de pinzas estériles se extrajo la vitroplanta, para posteriormente con el uso del bisturí, realizar la disección de la misma, en explantes de 1 a 1,5 cm de longitud.

A continuación, los explantes fueron inoculados a razón de dos por cada frasco, constituyendo cada explante la unidad experimental. Finalizado el proceso fueron etiquetados los frascos con su respectivo tratamiento y fecha de inoculación; finalmente, fueron trasladados al cuarto de incubación, donde permanecieron en condiciones de total oscuridad, durante 70 días de evaluación.

#### 5.3.4 *Diseño experimental*

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial de 3 x 2, con 5 tratamientos y 3 repeticiones, cada tratamiento estuvo conformado por 15 frascos de vidrio, con dos explantes por frasco, de acuerdo como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Tratamientos para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

No.	TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO		CODIFICACIÓN
		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	KINETINA (mg L <sup>-1</sup> )	
1.	T0	0,0	0,0	<b>T0OS</b>
2.	T1	1,0	0,0	<b>T1A1C0OS</b>
3.	T2	2,0	0,0	<b>T2A2C0OS</b>
4.	T3	1,0	0,5	<b>T3A1C1OS</b>
5.	T4	2,0	0,5	<b>T4A2C2OS</b>

T= Tratamiento. ANA= Acido naftalenacético. OS= Oscuridad. A= Auxina. C= Citoquinina.  
Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

#### 5.3.5 *Factores y niveles*

Los factores y niveles evaluados y sus concentraciones, se detallan a continuación:

Tabla 9. Factores y niveles de concentración del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación *in vitro* de explantes sometidos a oscuridad total, en la obtención de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

Factores	Niveles (mg L <sup>-1</sup> )
Nivel de concentraciones de auxinas (A)	1. 0,0
	2. 1,0
	3. 2,0
Nivel de concentraciones de citoquinina (C)	1. 0,0
	2. 0,5

**5.3.5.1 Especificaciones del diseño experimental.** Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo bifactorial, con 4 tratamientos y 3 repeticiones cada uno.

Tabla 10. Especificaciones del diseño experimental, utilizado para la inoculación *in vitro* de explantes sometidos a oscuridad total, para la obtención de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>UNIDAD</b>
Unidad Experimental	Un explante
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos por tratamiento	15
Número de callos por frasco	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	30
Número de unidades experimentales (explantes) del ensayo	150
Número de frascos del ensayo	75

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

Las unidades experimentales, fueron incubadas en total oscuridad.

### **5.3.6. Hipótesis del modelo**

H0: La oscuridad y la combinación hormonal auxina – citoquinina no influyen en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

H1: La oscuridad y la combinación hormonal auxina – citoquinina influyen en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

### **5.3.7. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina.**

A continuación, se presenta la distribución de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación:

Tabla 11. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L.

<b>T0OSC (T0)</b>			<b>T1A1C0OS (T1)</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T2A2C0OS (T2)</b>			<b>T3A1C1OS (T3)</b>		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>T4A2C2OS (T4)</b>					
R1	R2	R3			

T= Tratamiento. OS= Oscuridad. R= Repetición. A= Auxina. C= Citoquinina.

Fuente: Proyecto de Investigación *Cinchona*-UNL y Camacho, J. (2022)

### 5.3.8. Variables evaluadas

Se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de explantes contaminados
- Porcentaje de explantes fenolizados
- Porcentaje de explantes muertos
- Porcentaje de formación del callo
- Porcentaje de raíces por callo
- Porcentaje de brotes con callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo

Las evaluaciones se realizaron, a partir del tercer día de la inoculación de los explantes, cada tres días, durante un lapso de 70 días.

### 5.3.9. Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos, luego de comprobar que los datos siguieron una distribución normal y son homocedásticos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

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

Para la difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación, se realizaron las actividades que se describen a continuación:

- Socialización de los resultados obtenidos, ante el Equipo Técnico del Proyecto de investigación *Cinchona* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un poster y un tríptico, con los resultados del trabajo de investigación.
- Manual Técnico informativo con los resultados obtenidos en el trabajo de investigación.
- Elaboración y publicación del documento del Trabajo de Integración Curricular.
- Elaboración de un artículo científico, con los resultados del Trabajo de Integración Curricular.

## 6 Resultados

### 6.1 Efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

#### 6.1.1. Porcentaje de contaminación de los explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

Como se muestra en la figura 4, la contaminación promedio de los explantes, a los 70 días de evaluación, fue baja, encontrándose únicamente en el 3 % de los explantes contaminados en los tratamientos T1, y T4. Por otra parte, en los tratamientos T0 y T3 no se evidenció contaminación. Mediante la aplicación del test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad, se determinó que no existió diferencia significativa entre tratamientos. En la figura 5 se muestra el aspecto de los explantes contaminados en condiciones de fotoperíodo a los 70 días del experimento.

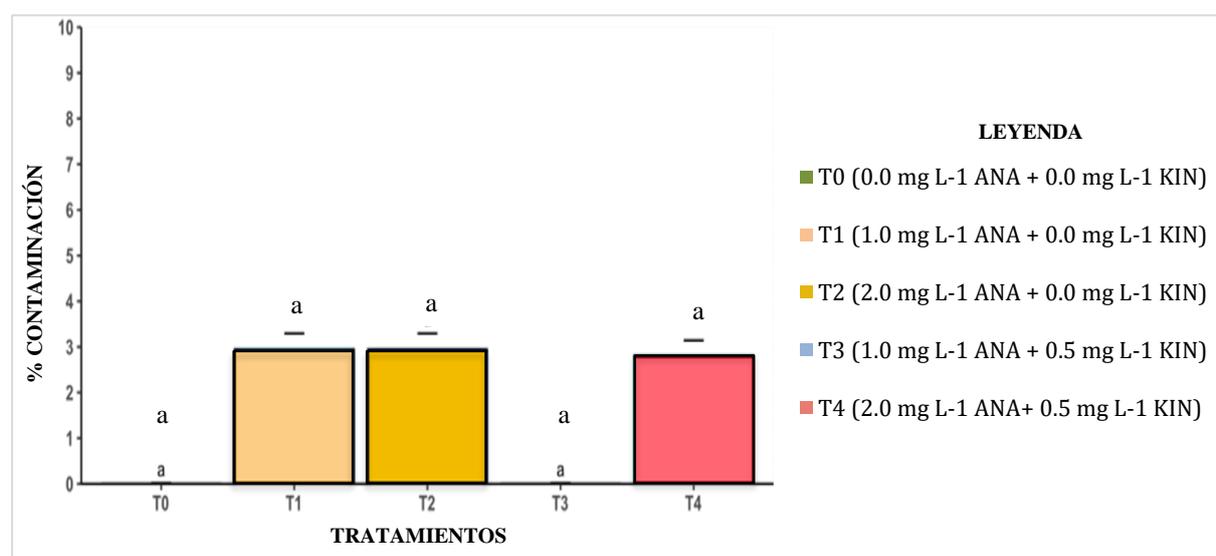


Figura 4. Porcentaje de contaminación de los explantes de cada uno de los tratamientos aplicados a explantes de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo, a los 70 días de evaluación.

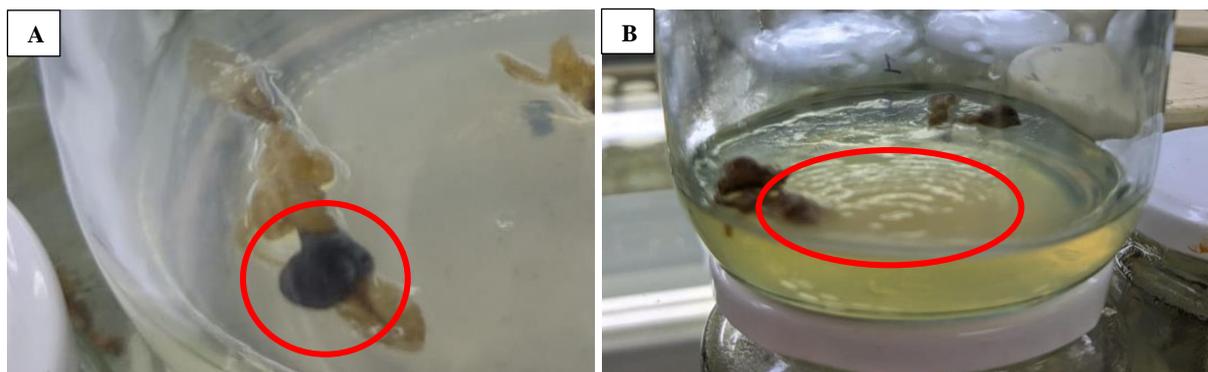


Figura 5. Explantes de *Cinchona officinalis* L. contaminados, en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

### 6.1.2. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

De acuerdo como se muestra en la figura 6, bajo el fotoperiodo y las combinaciones hormonales aplicadas, el T0 presentó el 6 % de sus explantes fenolizados, mientras que, el T1 y el T3, tuvieron un 4 % de oxidación fenólica respectivamente; y, el T4, presentó un 3 % de fenolización en sus estructuras calogénicas. Al aplicar el análisis estadístico, se determinó que no hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos ( $p > 0,05$ ; F: 0,4609). La figura 7 muestra el aspecto de los explantes con oxidación fenólica.

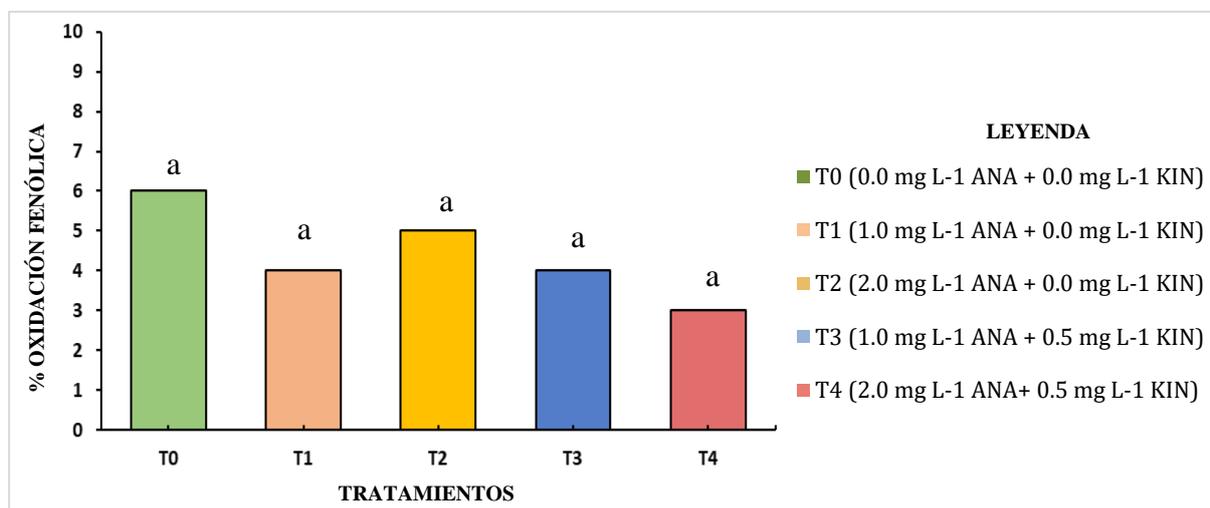


Figura 6. Porcentaje de oxidación fenólica en los tratamientos aplicados a los explantes de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.  
T: Tratamiento

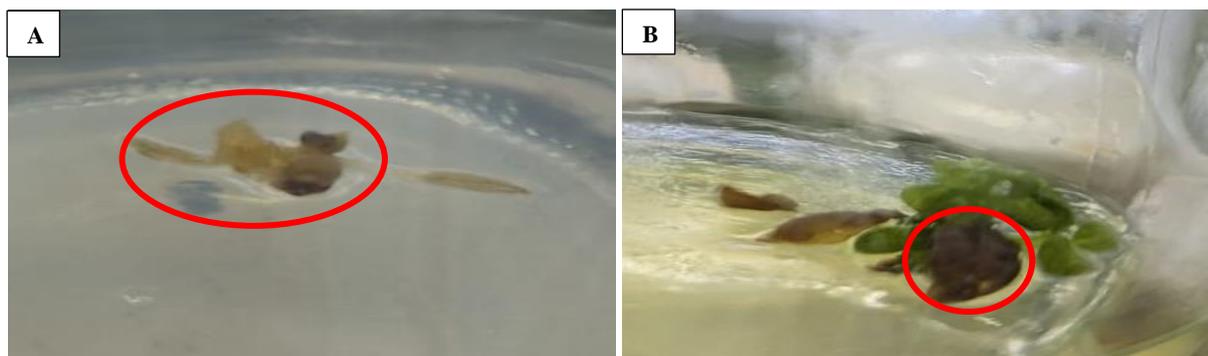


Figura 7. Explantes de *Cinchona officinalis* L. fenolizados, en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

### 6.1.3. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

Como se muestra en la figura 8, los explantes de *Cinchona officinalis* L., presentaron mortalidad a partir de los 16 días de evaluación, siendo el T2 el que presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes con el 90%; seguido del T3 y T4 con 87 % de sobrevivencia respectivamente; así, el tratamiento con menos porcentaje de sobrevivencia, se presentó en el T0, al cual no se le aplicaron auxinas ni citoquininas. Según el análisis estadístico de LSD Fisher y la prueba de significancia aplicada, se determinó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ; F: 0,01609).

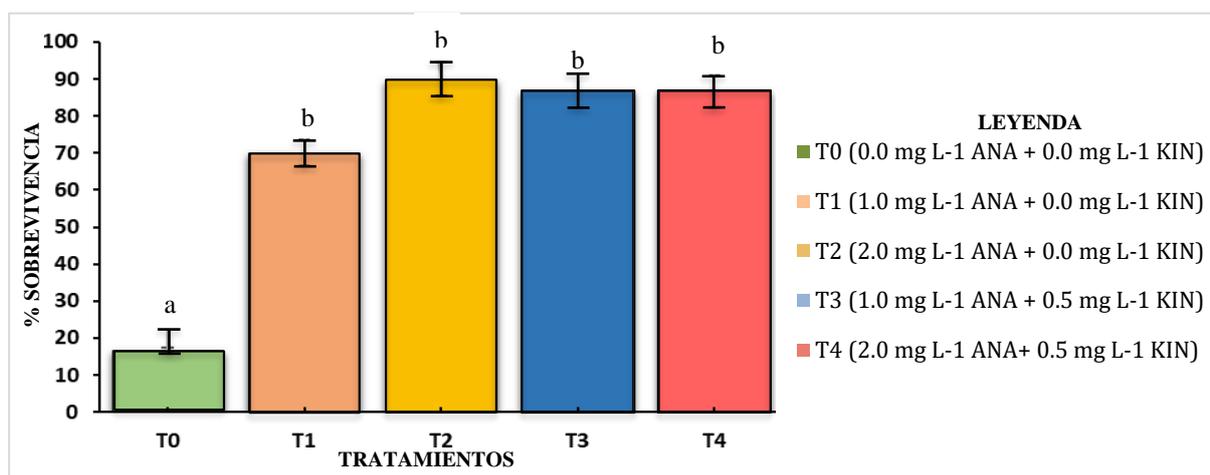


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia tras aplicar los tratamientos a los explantes de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

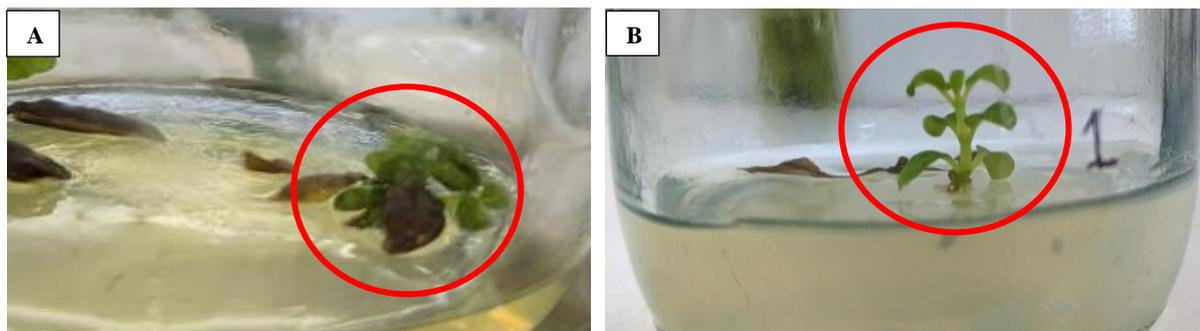


Figura 9. Explantes vivos de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo, a los 70 días de evaluación.

#### 6.1.4. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas, en explantes de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperíodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

En la figura 10, se muestran los porcentajes de formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cinchona officinalis* L., con sus respectivas combinaciones hormonales en condiciones de fotoperíodo, en donde el T4 presentó un porcentaje promedio de desarrollo de estructuras callogénicas del 69 %; mientras que, el T3 evidenció el menor porcentaje promedio de formación de estructuras callogénicas, con el 47 %; cabe resaltar, que T1 y T2, no presentaron desarrollo de estructuras callogénicas destacadas, siendo de 53 % y 64 %, respectivamente. Tras realizar el análisis de varianza y la prueba de LSD Fisher, se determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ;  $F: < 2e-16$ ). La figura 11 muestra el aspecto de las estructuras callogénicas de los explantes en condiciones de fotoperíodo.

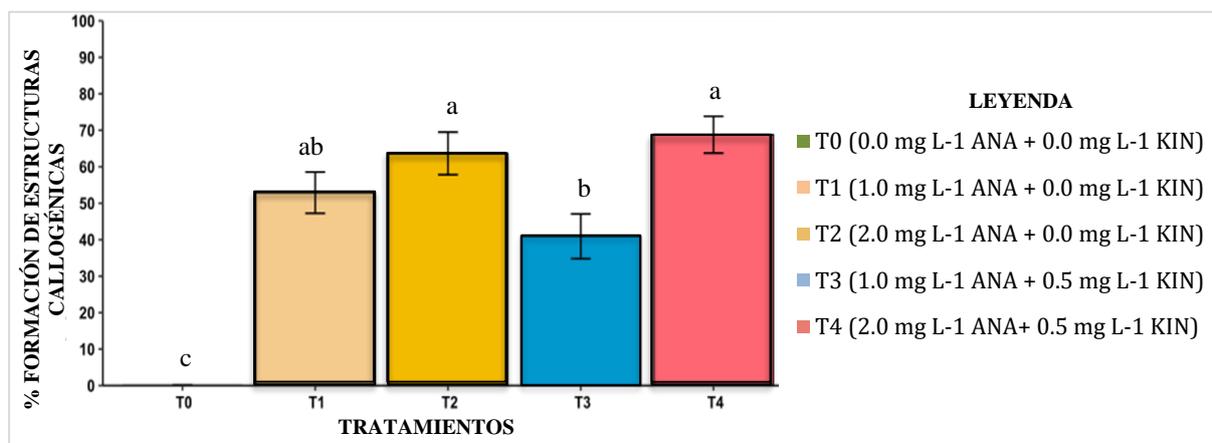


Figura 10. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas tras aplicar los tratamientos en los explantes de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo, a los 70 días de evaluación.

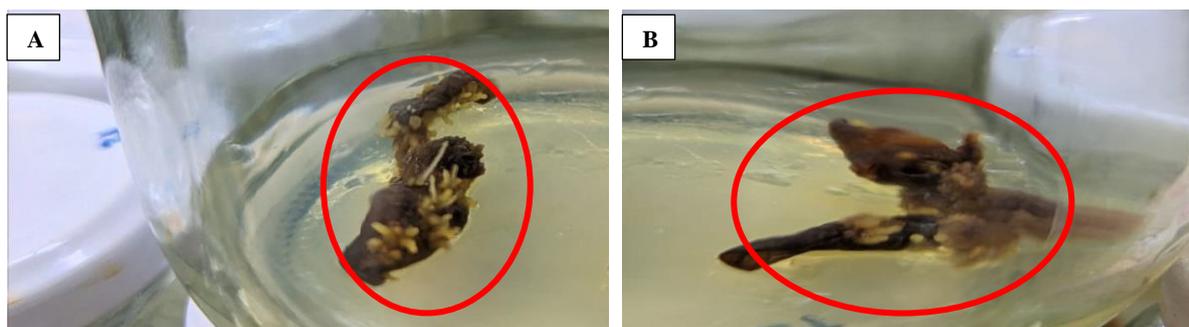


Figura 11. Estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., desarrolladas en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

### 6.1.5. Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

De acuerdo a lo que muestra la figura 12, el T1 y el T2 presentaron formación de raíces en estructuras callogénicas, a partir del día 19 después de implementar el ensayo, en un periodo de evaluación de 70 días; así, el T1 presentó mayor porcentaje de callos con formación de raíces, con un 40 %, seguido del T2 con 33 %; mientras que, el T4 presentó la menor formación de raíces por callo, con un 10 %. Al aplicar el análisis estadístico de LSD de Fisher y la prueba de significancia, se determinó diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ;  $F: 0,0006573$ ). La figura 13 muestra la aparición de raíces en los explantes sometidos a fotoperíodo luego de 70 días de evaluación.

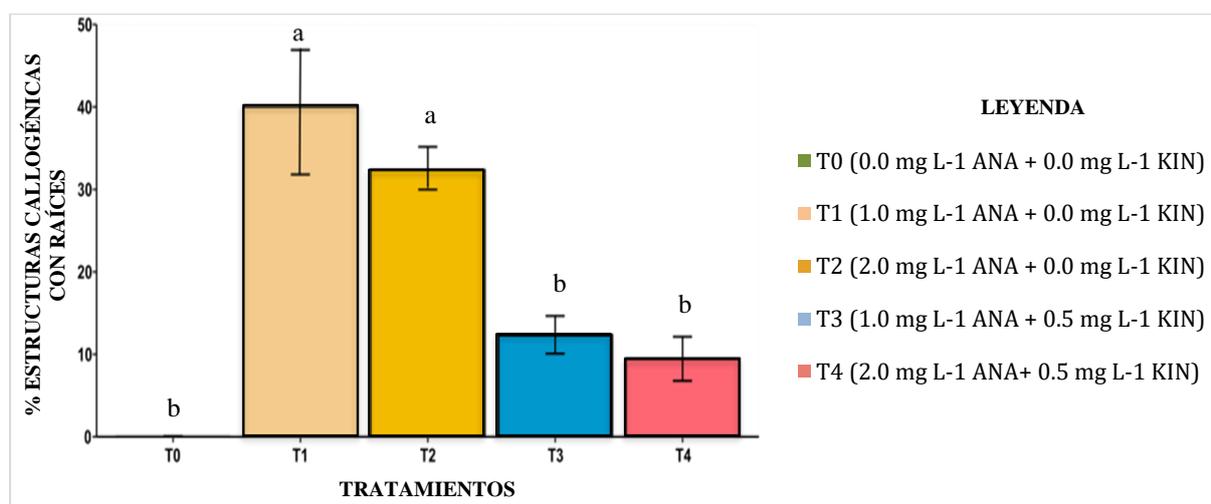


Figura 12. Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., luego de aplicar los tratamientos en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

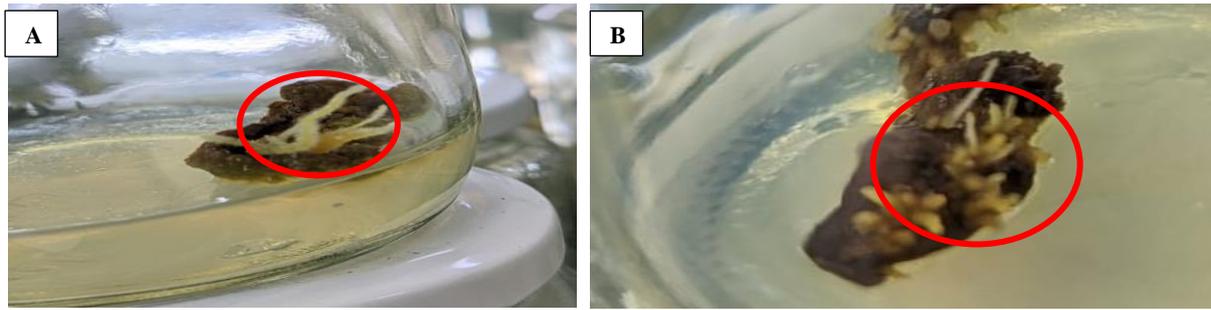


Figura 13. Raíces desarrolladas en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

**6.1.6. Porcentaje de formación de brotes en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.**

Como se muestra en la figura 14, el T0 no presentó formación de estructuras callogénicas, ya que no contenía la combinación hormonal auxina – citoquinina; sin embargo, el 20 % de sus explantes desarrollaron brotes adventicios; mientras que, el T3 y el T4 registraron el 10 % de formación de brotes en sus estructuras callogénicas; finalmente, el T1 y T2 desarrollaron brotes en el 7 % de sus estructuras callogénicas, respectivamente. Al aplicar el análisis estadístico LSD de Fisher y la prueba de significancia, se determinó que no existió diferencia significativa entre tratamientos ( $p > 0,05$ ; F: 0,1991). La figura 15 muestra la aparición de brotes en las estructuras callogénicas sometidos a fotoperíodo luego de 70 días de evaluación.

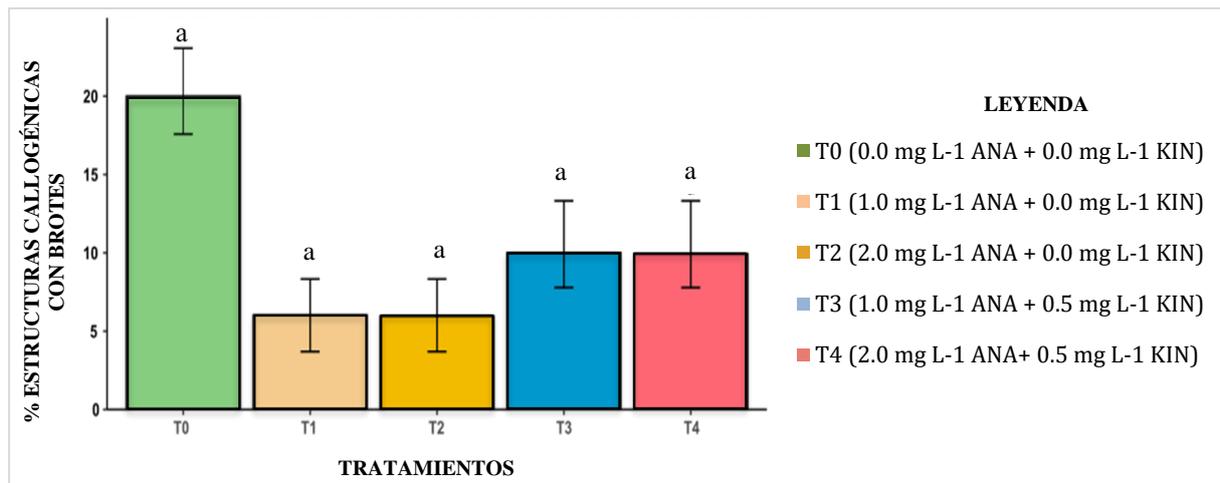


Figura 14. Porcentaje de estructuras callogénicas con brotes de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

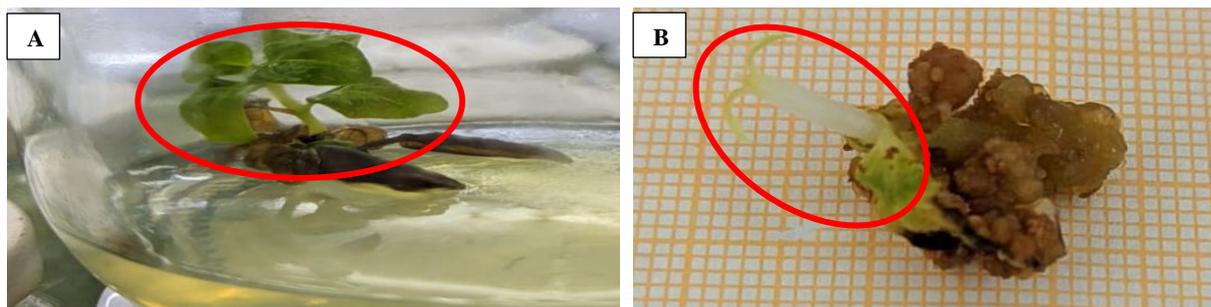


Figura 15. Brotes de *Cinchona officinalis* L., desarrollados en estructuras callogénicas, en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

**6.1.7. Color de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.**

Al finalizar el ensayo, en los callos de *Cinchona officinalis* L, se presentaron 3 tonalidades de coloración; crema, carmelita y café. De acuerdo con la figura 16, en el T1 las coloraciones fueron equitativas entre el 30 y 40 %, predominando el color crema y con menor presencia del color café, mismo color que en los T2, T3 y T4 estuvo poco presente. En el T2, predominó la coloración crema, en el T3 se evidenció mayor presencia de la coloración carmelita; y finalmente, en el T4 se evidenció igualdad de porcentaje entre las coloraciones crema y carmelita, respectivamente. La figura 17 muestra dos estructuras callogénicas con coloraciones diferentes luego de 70 días de observación bajo fotoperíodo.

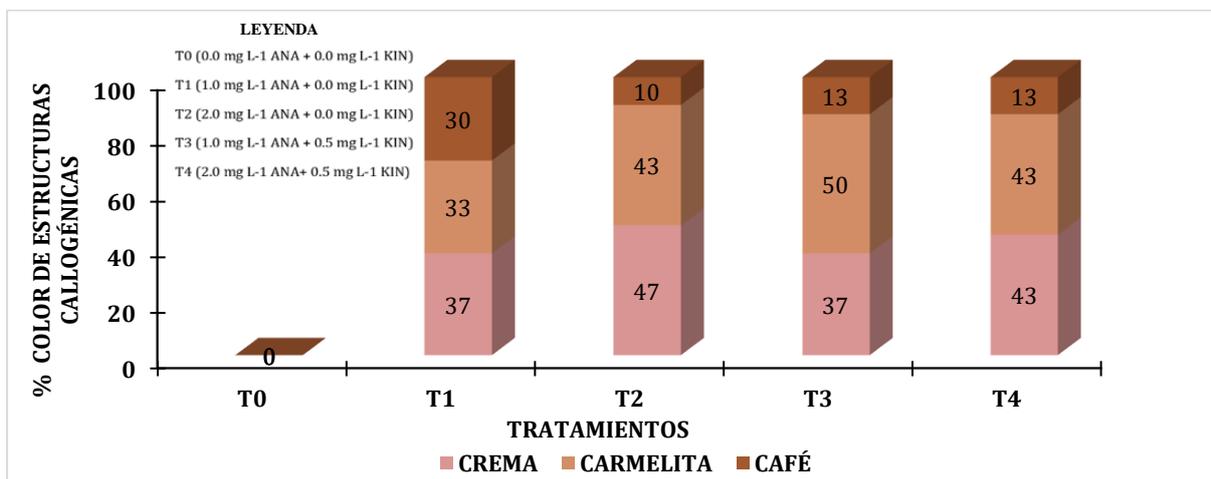


Figura 16. Porcentaje de coloración de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

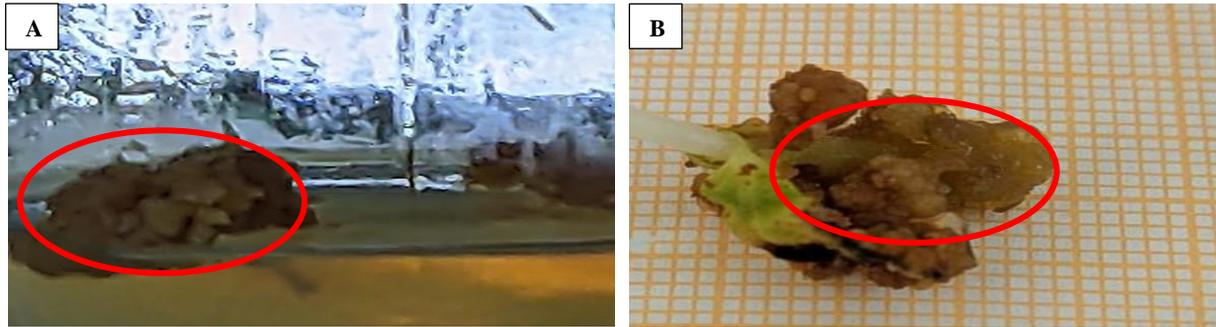


Figura 17. Color de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación. A= Color café. B= Color carmelita.

### 6.1.8. Friabilidad de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., bajo el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina-citoquinina, a los 70 días de evaluación.

De acuerdo a lo indicado, la figura 18 muestra que, la friabilidad de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., fue ligeramente similar en todos los tratamientos donde se aplicó la combinación hormonal auxina - citoquinina, siendo el T2 el que presentó el mayor porcentaje de callos friables, con el 67 %, seguido del T4 con el 57 %; mientras que, los tratamientos donde las estructuras callogénicas presentaron menor friabilidad fueron T1 y T3 con 33 y 27 % de callos no friables, respectivamente. La figura 19 muestra el estado de friabilidad de las estructuras callogénicas sometidos a fotoperíodo luego de 70 días de evaluación.

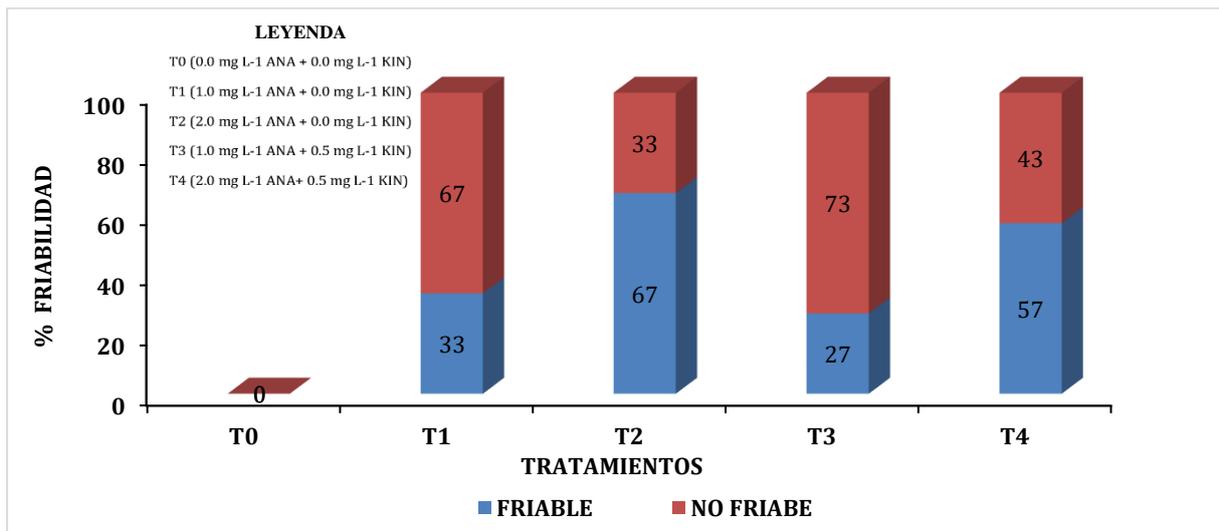


Figura 18. Porcentaje de friabilidad de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

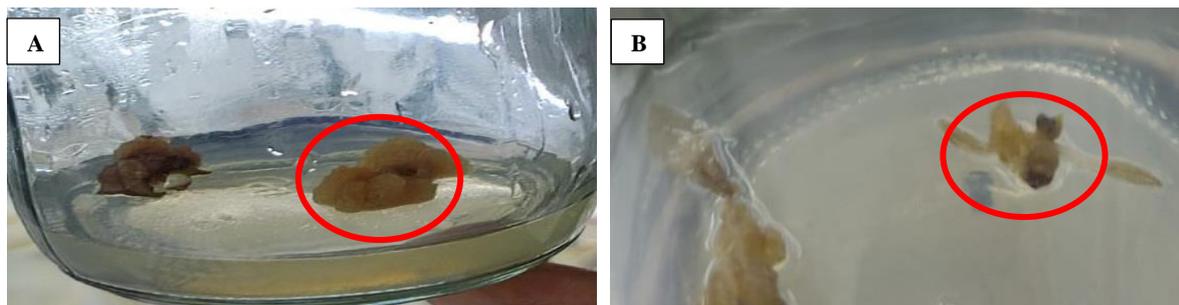


Figura 19. Friabilidad de las estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo, a los 70 días de evaluación.

## 6.2. Efecto de la oscuridad total y la combinación hormonal auxina – citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

### 6.2.1. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

En la figura 20 se muestra el porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de *Cinchona officinalis* L., donde se observó que, el T0 presentó el mayor valor con el 70 %; mientras que, en los tratamientos T1, T2, T3 y T4, alcanzaron un porcentaje promedio de oxidación fenólica de 22,25 %. Cabe resaltar que en los explantes inoculados no se presentó contaminación en los mismos, por tratarse de material vegetal aséptico que se ha desarrollado a nivel de laboratorio. Según el análisis de varianza y la prueba significativa de LSD de Fisher, se demostró que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos ensayados ( $p < 0,05$ ;  $F: 0,000389$ ). La figura 21 muestra el aspecto de los explantes fenolizados luego de ser sometidos a 70 días de evaluación bajo condiciones de oscuridad.

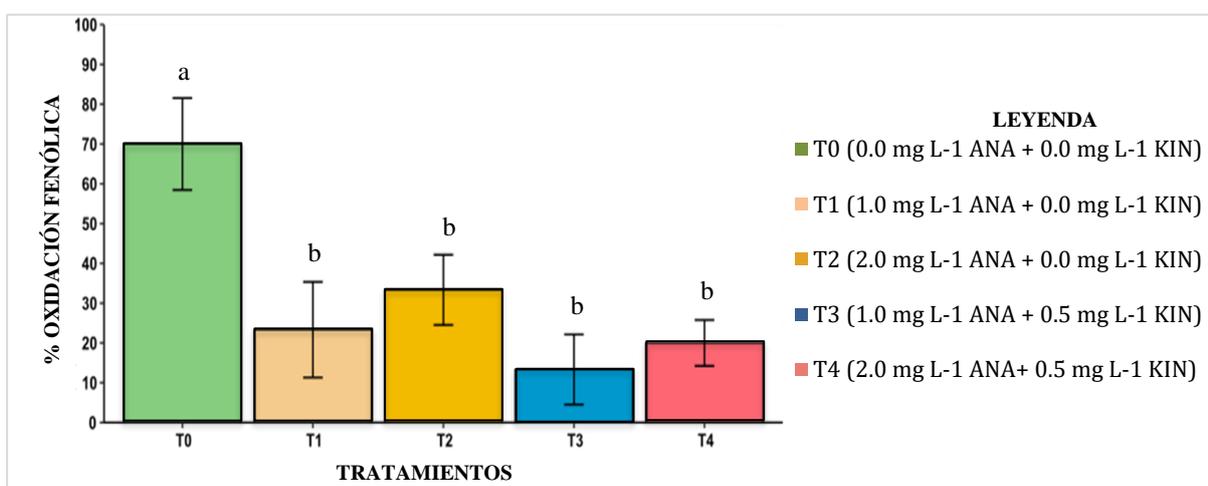


Figura 20. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a 70 días de evaluación.

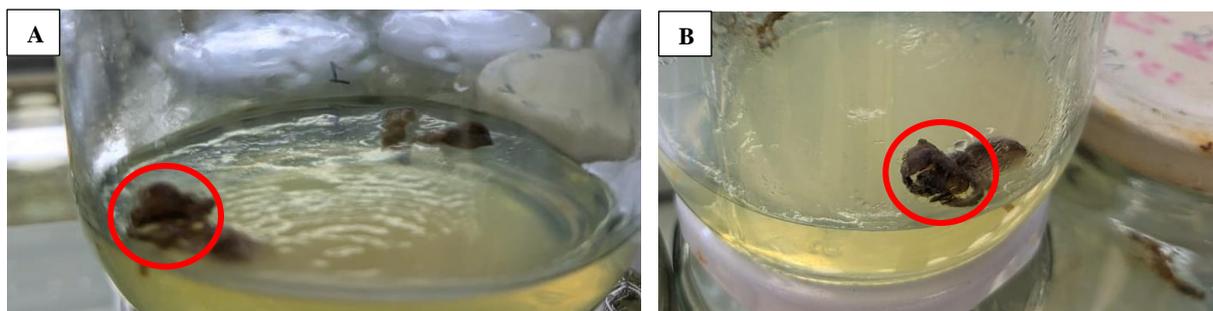


Figura 21. Explantes de *Cinchona officinalis* L. fenolizados, en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.2.2. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes en *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

La mortalidad de los explantes de *Cinchona officinalis* L, se presentó a partir del día 16 y se estabilizó a los 52 días de evaluación. De acuerdo como se muestra en la figura 22, el T3 presentó la más alta sobrevivencia, con el 87 %, seguido del T4 con 80 %; mientras que, el tratamiento que presentó menor porcentaje de sobrevivencia en sus explantes fue el T0, el cual no contuvo ninguna combinación hormonal y presentó una sobrevivencia de 30 %. Al realizar el análisis estadístico y la prueba LSD de Fisher, se demostró que existió diferencia significativa entre los tratamientos aplicados ( $p < 0,05$ ; F: 0.004866). La figura 22 muestra el aspecto de los explantes que han sobrevivido en condiciones de oscuridad al finalizar el experimento.

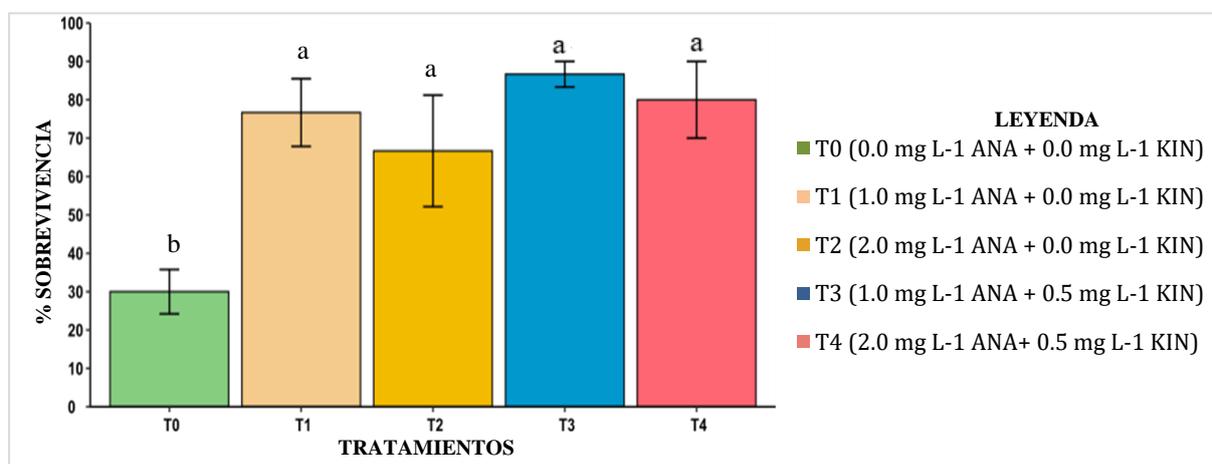


Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

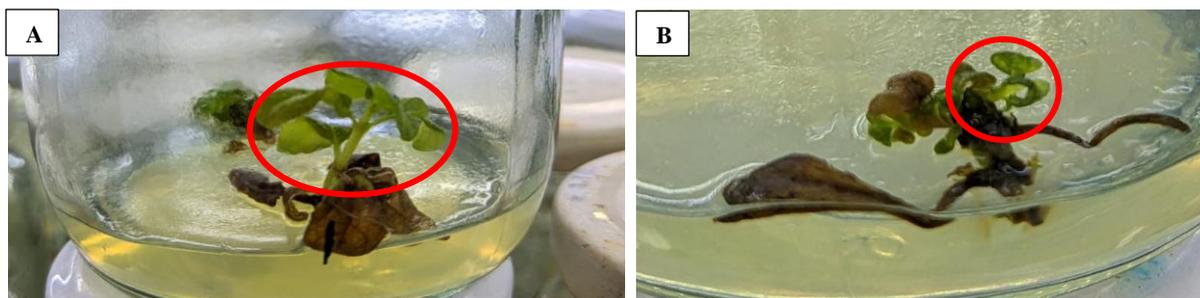


Figura 23. Supervivencia de explantes de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.2.3. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas en explantes de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

La fase de formación de estructuras callogénicas en la especie *Cinchona officinalis* L., se caracterizó por la homogeneidad, hasta los 4 días de evaluación, al finalizar la presente investigación, el T4 presentó mayor desarrollo en sus estructuras callogénicas, con un promedio de 86,5 %, seguido por el T3 que alcanzó un desarrollo promedio de 83,63 %; mientras que, el T1 tuvo el menor porcentaje de formación de callos, con el 53,32 %. Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher, se demostró que si existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos ensayados ( $p < 0,05$ ;  $F: < 2^e-16$ ). La figura 24 muestra la formación de estructuras callogénicas en explantes sometidos a oscuridad durante 70 días de evaluación.

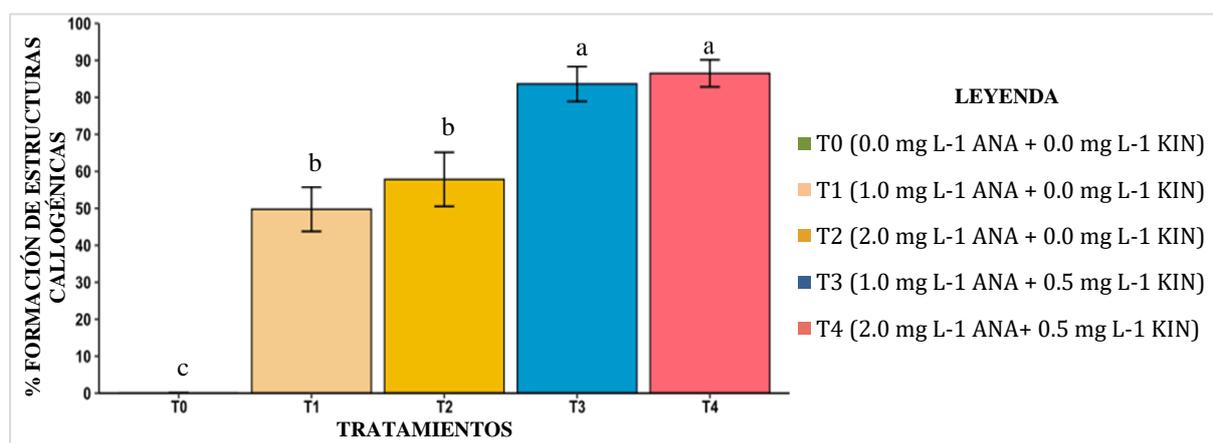


Figura 24. Porcentaje de formación de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

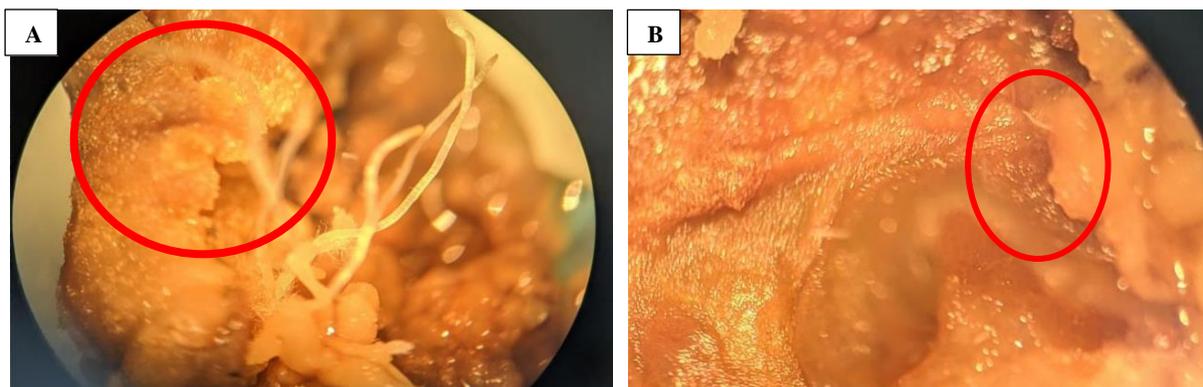


Figura 25. Estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., desarrolladas en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

#### 6.2.4. Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

En las condiciones en las que se llevó a cabo el presente trabajo de investigación, se registró que, el tratamiento 3 y en el tratamiento 4, fueron los que registraron mayor porcentaje de estructuras callogénicas con raíces, con el 37 %; mientras que, por el contrario, en el T2 se evidenció la formación de raíces en el 7 % de sus estructuras callogénicas; y, finalmente, en el T0 no se evidenciaron callos con raíces, esto por no contener ninguna combinación hormonal. Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher, se demostró que si existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos aplicados ( $p < 0,05$ ;  $F: 9,64E-02$ ). La figura 27 muestra la aparición de raíces en los explantes luego de 70 días de ser sometidos a oscuridad.

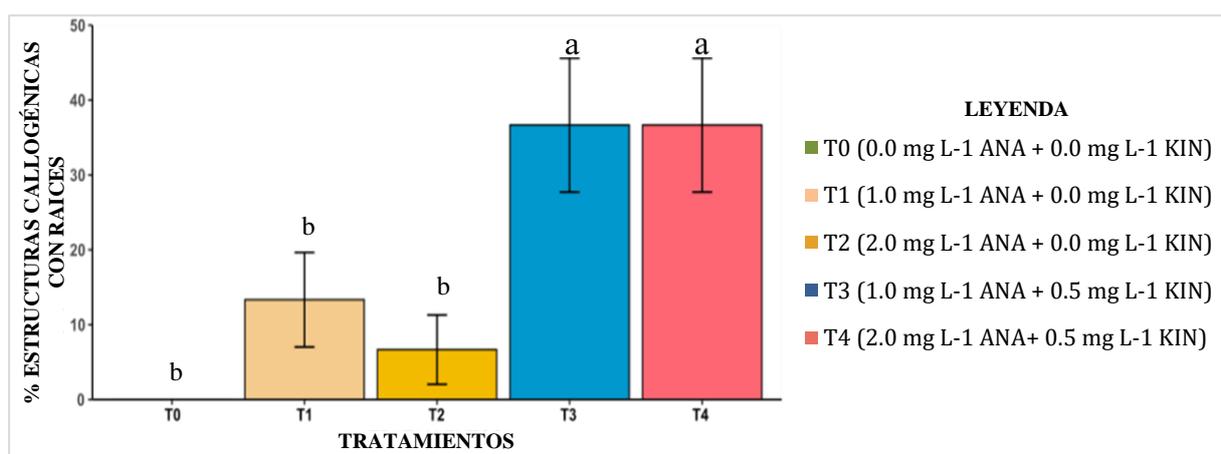


Figura 26. Porcentaje de formación de raíces en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

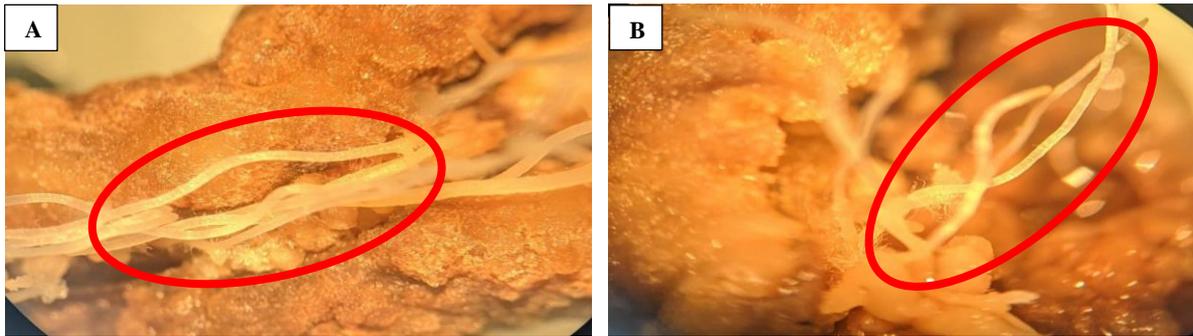


Figura 27. Raíces desarrolladas en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.2.5. Porcentaje de formación de brotes en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

En la figura 28 se muestran los resultados de formación de brotes en estructuras calogénicas de *Cinchona officinalis* L, donde el tratamiento T0 que no tuvo en su composición, ni auxinas ni citoquininas, si bien no se desarrollaron estructuras calogénicas, el 23 % de los explantes, presentaron brotes adventicios; mientras que, en los tratamientos que si contenían la combinación hormonal auxina – citoquinina, los T4 y T1 desarrollaron brotes en tan solo el 3 % de sus estructuras calogénicas, por el contrario, los tratamientos T2 y T3, presentaron brotes en el 10 y 7 % de sus estructuras calogénicas, respectivamente. Al aplicar el análisis estadístico y la prueba significativa de LSD de Fisher, se demostró la existencia de diferencia estadística significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; F: 0.03887). La figura 29 muestra la aparición de brotes en explantes sometidos a 70 días de oscuridad.

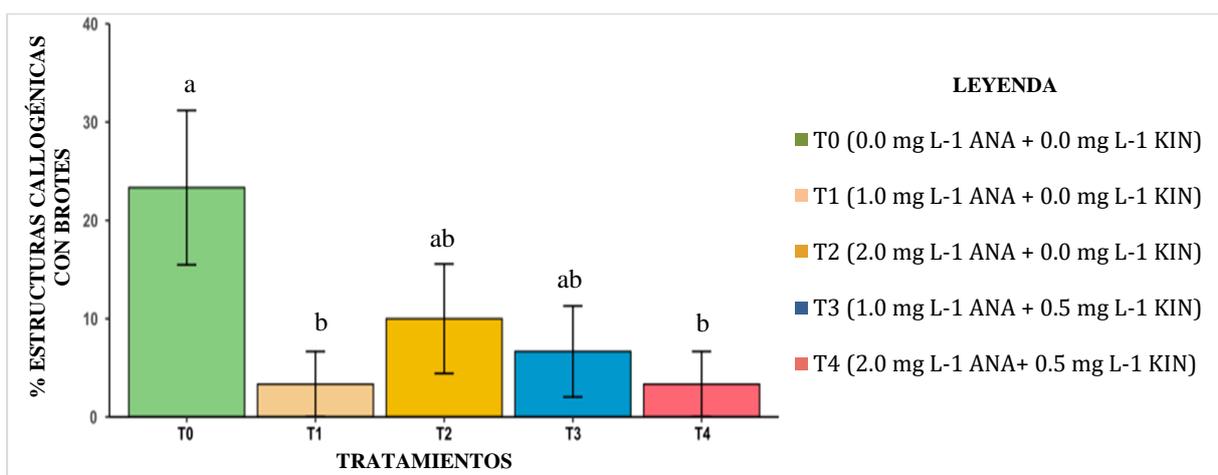


Figura 28. Porcentaje de estructuras calogénicas con brotes de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

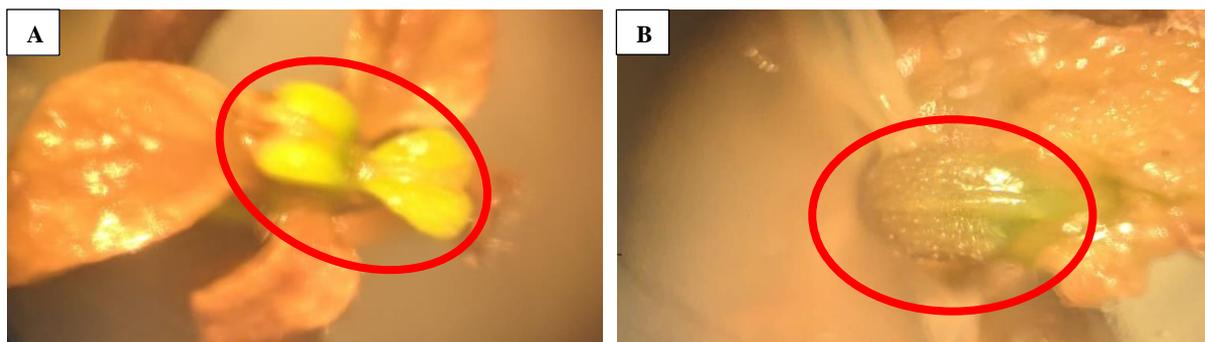


Figura 29. Brotes *de novo* en *Cinchona officinalis* L., desarrollada en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.2.6. Color de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

Como se muestra en la figura 30, al finalizar los 70 días de evaluación, se evidenció la presencia de los colores crema, carmelita y café en las estructuras callogénicas, en todos los tratamientos aplicados. Los T1, T2 y T4, presentaron un bajo porcentaje de coloración crema, siendo menor a 20 %, mientras que, en el T3, fue del 33 %. El color carmelita tuvo menor presencia en el T2 (17 %) y T4 con el 50%. Finalmente, el color café predominó en el T2, con 73 %; sin embargo, en el T3 únicamente se encontró presente en el 23 % de las estructuras callogénicas. La figura 31 muestra el color de dos estructuras callogénicas luego de 70 días de oscuridad.

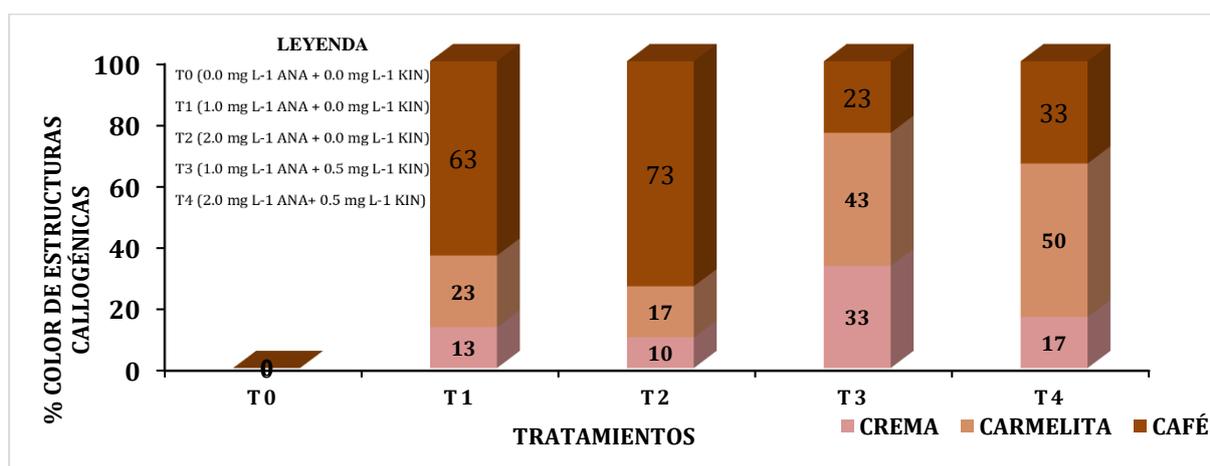


Figura 30. Porcentaje de coloración de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

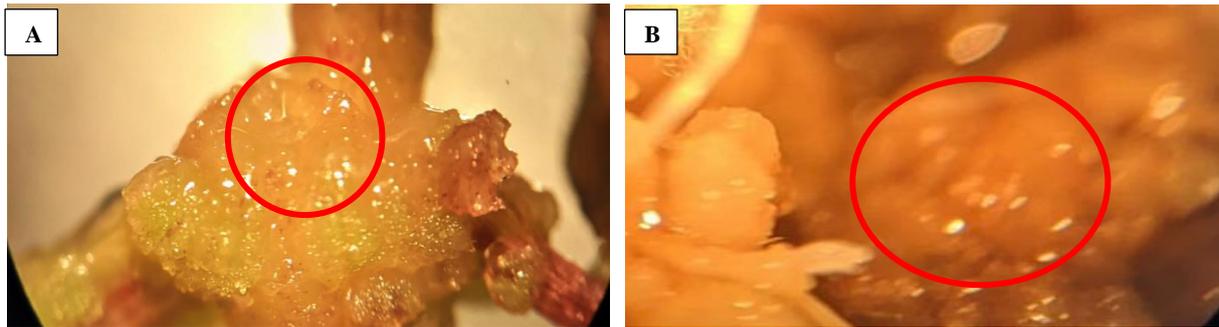


Figura 31. Estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L. de color crema, en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.2.7. Friabilidad de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

La friabilidad de las estructuras callogénicas en el presente estudio, se ven reflejadas en la figura 32, donde, el tratamiento 3, y el tratamiento 1, presentaron mayor friabilidad en sus callos, con 60 % y 50 %, respectivamente; sin embargo, el T2 presentó el porcentaje más bajo de estructuras callogénicas friables, con 37 %. La figura 33 muestra la friabilidad de las estructuras callogénicas luego de 70 días de oscuridad.

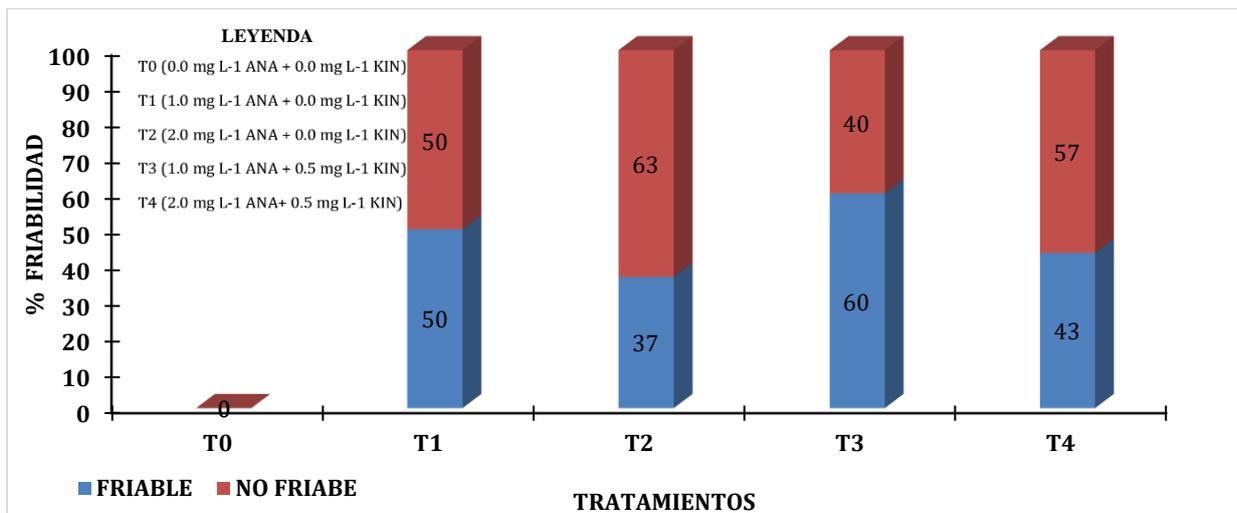


Figura 32. Porcentaje de estructuras callogénicas friables de acuerdo a los tratamientos aplicados en explantes de *Cinchona officinalis* L., luego de la aplicación de los tratamientos en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

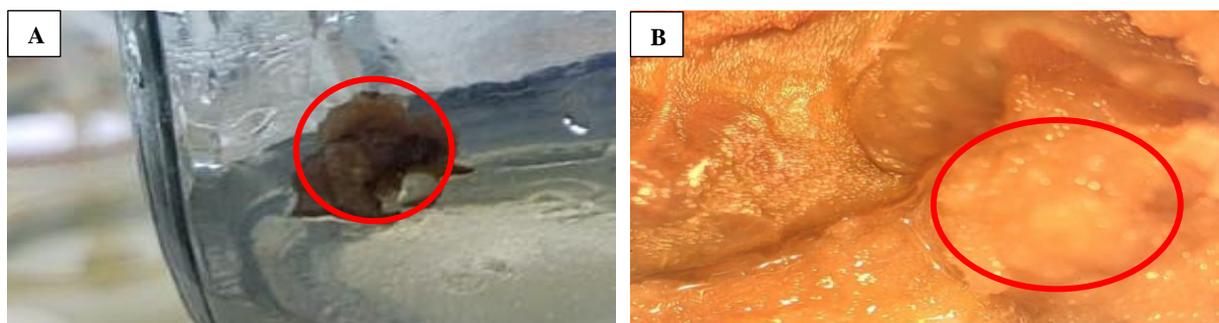


Figura 33. Estructuras callogénicas friables de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

### 6.3. Difusión de los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

Para la difusión de resultados de la investigación realizada y por la relevancia de generar información sobre la formación de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad, se realizaron las siguientes actividades:

- Socialización de los resultados obtenidos, ante el Equipo Técnico del Proyecto de Investigación *Cinchona* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja.
- Elaboración de un poster y un tríptico, para la difusión de los resultados del trabajo de investigación.
- Exposición de resultados en casa abierta de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.



Figura 34. Difusión de resultados de investigación: **A**= Exposición de resultados en casa abierta **B**= Socialización de resultados ante el equipo técnico del proyecto *Cinchona*. **C**= Entrega de trípticos.

## 7. Discusión

### **7.1. Contaminación de los explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación**

Tras la investigación, únicamente se registró contaminación en los tratamientos sometidos a las condiciones de fotoperiodo, siendo esta de 3 % en los tratamientos 1 y 4. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Guartanza (2019) quien obtuvo un porcentaje de contaminación de entre 40 y 86 %; mientras que al probar la auxina ANA y la citoquinina BAP, Mendez (2018) obtuvo porcentajes de contaminación similares a la presente investigación (entre 0 y 3 %), cabe recalcar que estos fueron en condiciones de fotoperiodo. La contaminación del tejido vegetal que tiene origen de vitroplantas, es debido a la baja sanidad de la cámara de inoculación o no seguir correctamente los protocolos de elaboración del medio de cultivo, empezando la contaminación en este mismo y extendiéndose hasta el tejido o liberando metabolitos tóxicos en este (Hernandez y Gonzalez, 2010).

### **7.2. Oxidación fenólica de los explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

En la presente investigación, la fenolización de los explantes, se evidenció desde el día 19 de haber inoculado los mismos. Dentro de los tratamientos de fotoperiodo y la combinación hormonal, los callos fenolizados alcanzaron un porcentaje mínimo de 3 %, en el T4 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN), resultado que fue inferior a los inoculados en oscuridad total, en donde en el T3 (2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN), los callos fenolizados alcanzaron un valor mínimo de 13 %. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Eras et al (2019) quienes en su estudio, para la formación de callos y estructuras de *novo* de *Cinchona officinalis* L., utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP y en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, obtuvieron una fenolización mínima de 6,67 %. Esto es debido a que, según lo afirmado por Hernandez y Gonzalez (2010) la fenolización es un fenómeno fisiológico fotoactivo, es decir, se manifiesta en presencia de la luz y el oxígeno, contradiciendo el presente estudio, esto pudo haberse debido a las condiciones del estudio y la especie estudiada.

### **7.3. Supervivencia de los explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

Con respecto a la variable de supervivencia, se determinó que, en el caso del fotoperiodo, en el T2, conformado por 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, presentó el 90 % de

sobrevivencia de los explantes, que fue superior a los explantes inoculados en total oscuridad, en donde en el T3, formado por  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, presentó el 87 % de sobrevivencia. Los resultados de sobrevivencia de los explantes registrados en la presente investigación, son inferiores a los reportados en la investigación realizada por Rueda (2020) quién indujo estructuras callogénicas a partir de explantes de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., donde, en condiciones de fotoperiodo 16/8, en todos los tratamientos obtuvo sobrevivencia de los explantes del 100 %, de igual manera, como afirma Orantes y López, (2019) la sobrevivencia alcanzada en su estudio sobre callos de *Annona diversifolia* fue de 46,66 %. La deferencia en los resultados se pudo haber debido a la especie de estudio en cuestión, esto debido que cada especie es más o menos propensa a contaminarse dependiendo de las condiciones de asepsia y de las condiciones intrínsecas de las especies (Cuevas y Salaverría, 2004).

#### **7.4. Formación de estructuras callogénicas en explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

En lo relacionado a la variable de formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y en total oscuridad, se evidenció que, la combinación hormonal de auxinas y citoquinina, es necesaria para la formación de dichas estructuras. De esta manera, en el caso de los explantes inoculados en condiciones de fotoperiodo, la combinación de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN (T4) registró un desarrollo promedio de sus estructuras callogénicas del 69 %, siendo inferior a los tratamientos en total oscuridad, que, en la misma combinación hormonal, se obtuvo un promedio de 86,5 %, evidenciándose de esta manera que, el desarrollo de las estructuras callogénicas fue mayor en condiciones de total oscuridad; resultados que son superiores a los obtenidos por Guartanza (2019) quien en su estudio sobre la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., al término de 50 días de evaluación, usando la combinación hormonal de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  2, 4-D +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, obtuvo en promedio 73,30 % de desarrollo de callos. Córdova et al (2014) menciona que al inducir callos en *Myrciaria dubia* obtuvo estas estructuras en más del 70 % de sus explantes habiéndose desarrollado estas mismas hasta el 100 %. En base a los resultados obtenidos, se pudo evidenciar que, se obtienen mejores estructuras callogénicas utilizando la hormona auxina en altas concentraciones, al igual que lo menciona Roca y Mroginski (1991).

### **7.5. Raíces en estructuras callogénicas en explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

En cuanto a la variable raíces en estructuras callogénicas, para los tratamientos que estuvieron incubados en condiciones de fotoperiodo (16/8), la aparición de raíces en las estructuras callogénicas se evidenció desde el día 22 de evaluación, al finalizar el estudio se observó el 40 % de estructuras callogénicas con raíces, en el T1 (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN), resultado que es ligeramente superior a los tratamientos incubados en total oscuridad, en donde las raíces empezaron a desarrollarse a partir del día 25, con el 37 % de raíces en sus estructuras callogénicas, en el T3 y T4, que estuvieron conformados por 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN y 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN, respectivamente. Estos resultados son inferiores a los reportados por Preciado et al (2015), quienes en su investigación sobre enraizamiento *in vitro* a partir de callos de *Jatropha cuneata* (Wiggins y Rollins), utilizando el medio de cultivo MS, en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad) y añadiendo 1 mg L<sup>-1</sup> y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, obtuvieron el 100 % de raíces adventicias en todas sus estructuras callogénicas. Mientras que, con la aplicación de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB + 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, en la investigación de Cueva (2020) se alcanzó enraizamiento del 70 % de las unidades experimentales. Los resultados inferiores en la presente investigación se debe a que, de acuerdo con lo que afirman, las raíces tienden a aparecer por organogénesis directa, es decir, se desarrollan sin ser necesario la aparición de callo en el individuo vegetal (Litz y Jarret, 1991).

### **7.6. Brotes en estructuras callogénicas en explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

En lo relacionado a la variable de formación de brotes por estructuras callogénicas, de acuerdo a las evaluaciones periódicas realizadas a cada tratamiento en condiciones de fotoperiodo, el T0 en el cual no se le aplicó ninguna combinación hormonal, los explantes no formaron callo; sin embargo, se formaron brotes adventicios en un 20 % de los mismos, resultados que son inferiores a los tratamientos sometidos a total oscuridad, donde el T0 presentó un 23 % de brotes adventicios en sus explantes, evidenciándose en este caso, que en los tratamientos que no se utilizó la combinación hormonal auxina – citoquinina, se provocó la mayor formación de brotes adventicios directamente en los explantes, sin que los mismos formen estructuras callogénicas. Estos resultados son superiores a los registrados por Mendez (2018), quien en su estudio relacionado con la formación de callos y estructuras *de novo* de *Cinchona officinalis* L., probando la combinación hormonal 0,3 mg/l ANA + 1,0 mg/l BAP,

reportó un porcentaje de formación de brotes del 20 %. Bernal et al (2007) afirma que en su estudio, al utilizar 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1 g.l<sup>-1</sup> de hidrolizado de caseína, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 50 mg.l<sup>-1</sup> de higromicina, 250 mg.l<sup>-1</sup> de cefotaxima, y solidificado con 3 g.l<sup>-1</sup> de fitagel, se logró brotación en el 67,77 % de las unidades experimentales. La facilidad para la obtención de brotes se debió a la aplicación de citoquininas y la influencia del fotoperiodo, donde se mostraron los brotes más vigorosos, esto debido al fototropismo de los brotes, la facilidad para realizar fotosíntesis gracias a la luz y la fotoactividad de las células vegetales (Raya, 1991).

#### **7.7. Color de las estructuras callogénicas en explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

En lo referente a la variable color de las estructuras callogénicas, las coloraciones observadas en la presente investigación fueron: Crema, carmelita y café; así, la coloración crema tuvo mayor presencia en condiciones de fotoperiodo, siendo predominante en el T2 con 47 %; mientras que, en total oscuridad, este color no estuvo presente en mayor escala en ningún tratamiento. La coloración carmelita tuvo relevancia en ambas condiciones de estudio; así, en el caso del fotoperiodo, estuvo más presente en el T3 con 50 % y en condiciones de total oscuridad, este color predominó en el T4, con el 50 %. Finalmente, el color café, en fotoperiodo se vio mayormente presente en el T1 con el 30 % y en el caso de total oscuridad, se presentó en el T2, con el 73 %. Estos resultados son similares a los reportados en la investigación realizada por Eras et al (2019), quienes en su investigación para inducir la formación de callos, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., obtuvieron en condiciones de fotoperiodo (16/8) y utilizando la concentración hormonal de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, una coloración crema en el 78 % de sus callos; mientras que, el 22 % de los mismos presentaron coloración carmelita. Según González (2017), al utilizar 2-4-D y BAP alcanzó el 100 % de sus estructuras callogénicas con coloración crema. La dominancia de colores como el crema y carmelita en los tratamientos sometidos al fotoperiodo, demuestran que la luz es determinante para la vitalidad de las estructuras callogénicas (Pierik, 1990).

#### **7.8. Friabilidad en estructuras callogénicas en explantes en *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.**

Los resultados obtenidos en la presente investigación en condiciones de fotoperiodo, mostraron que, los callos friables fueron predominantes en el T3 con 73 %; mientras que los no friables sobresalieron en el T1 (67 %); en tanto que, en los ensayos sometidos a total oscuridad, en el T3, estuvieron más presentes los callos friables, con 60 %, mientras que, en el T2, fue

mayor la presencia de callos no friables, con 63 %. Estos resultados, son inferiores a los reportados por Guartanza (2019), quien en un estudio para la inducción de callos en *Cinchona officinalis* L., a partir de plántulas de invernadero, probando concentraciones entre 0,0 y 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y entre 0,0 y 0,5 mg L<sup>-1</sup> de KIN, en condiciones de fotoperiodo (16/8), el 100 % de las estructuras callogénicas fueron friables. Armijos (2016) afirma que al utilizar 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP sobre *Cinchona officinalis* L., es posible obtener hasta el 91,7 % de callos friables. La alta friabilidad es debido a la aplicación de las auxinas en relativas altas concentraciones y que es aún más efectiva cuando se la combina con KIN (Koblitz et al., 1983)

## 8. Conclusiones

El porcentaje de sobrevivencia de las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., tanto en condiciones de fotoperiodo como de oscuridad, alcanzó un promedio alto de 87 %, por tratarse de vitroplantas que se desarrollan en condiciones de asepsia.

Las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), se presentaron en su mayoría en el T1 y T2 estando presente en el 100 % de los explantes, mientras que, en condiciones de oscuridad, en el T3 (1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) y T4, alcanzaron una presencia del 97 %.

La formación de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L., se consiguió en mayor proporción en condiciones de incubación en total oscuridad, bajo concentración de 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN con un promedio de 86,5 %; en tanto que, en presencia del fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), la misma concentración de auxinas y citoquininas fue menor.

Las estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., que se obtuvieron en condiciones de total oscuridad, presentaron en su mayoría las mejores coloraciones, siendo la concentración 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN la que presentó mejores porcentajes de coloración adecuada de los explantes (crema 33%, carmelita 43% y café 23 %).

La friabilidad de las estructuras callogénicas, se presentaron en mejores condiciones en la concentración hormonal de 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN, en fotoperiodo, con un 67 %; mientras que, en oscuridad la concentración de hormonas 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN presentó similar friabilidad de sus estructuras callogénicas (60%).

## 9. Recomendaciones

- Probar diferentes condiciones de incubación de los explantes, en fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad) y total oscuridad, para evaluar el efecto de la luz, en la oxidación fenólica de las estructuras callogénicas.
- Probar concentraciones hormonales de auxinas y citoquininas superiores a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, y someterlas a las mismas condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, con el propósito de definir el balance hormonal auxina - citoquinina y el ambiente más favorable, para obtener el mayor desarrollo de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.
- Para la formación de raíces adventicias en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., probar en condiciones de fotoperiodo y total oscuridad, diferentes concentraciones de ANA, que sean inferiores a las probadas en la presente investigación ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), debido a que las auxinas en bajas concentraciones, inducen la mayor formación de raíces.
- Para la inducción de un mayor número de brotes adventicios en estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., se recomienda utilizar concentraciones inferiores a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y superiores a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN, debido a que, en esta concentración se registraron los mejores resultados de brotación en estructuras callogénicas.

## 10. Bibliografía

- AgroActivo. (2022). *BIOESTIMULANTE ÁCIDO NAFTALENACETICO*.  
<https://agroactivocol.com/producto/sanidad-vegetal-alimentos-saludables/coadyuvantes-y-reguladores-fisiologicos/bioestimulante-acido-naftalenacetico/>
- Alcantara, J., Acero, G., Alcantara, J., & Sánchez, M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Aldaz, L., & Ochoa, I. (2011). *Propagación asexual de diez especies forestales arbustivas en el jardín botánico "Reinaldo Espinosa"*. 113.  
[http://dspace.unl.edu.ec/bitstream/123456789/5348/1/PROPAGACIÓN\\_ASEXUAL\\_DE\\_DIEZ\\_ESPECIES\\_FORESTALES\\_Y\\_ARBUSTIVAS\\_EN\\_EL\\_JARDÍN\\_BOTÁNICO.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/bitstream/123456789/5348/1/PROPAGACIÓN_ASEXUAL_DE_DIEZ_ESPECIES_FORESTALES_Y_ARBUSTIVAS_EN_EL_JARDÍN_BOTÁNICO.pdf)
- Andersson, L. (1998). *A revision of the genus Cinchona (Rubiaceae-Cinchoneae)*. 40.  
[https://books.google.com/books/about/A\\_Revision\\_of\\_the\\_Genus\\_Cinchona\\_Rubiace.html?hl=es&id=g681tQEACAAJ](https://books.google.com/books/about/A_Revision_of_the_Genus_Cinchona_Rubiace.html?hl=es&id=g681tQEACAAJ)
- Armijos, G. R. (2016). *Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de Cinchona officinalis, Linneo*. [Universidad Politécnica de Madrid].  
<http://oa.upm.es/39541/>
- Azcón, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*.  
[https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/46663/mod\\_resource/content/1/Fundamentos de Fisiologia Vegetal-Azcón Bieto 2ed %281%29.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/46663/mod_resource/content/1/Fundamentos_de_Fisiologia_Vegetal-Azcón_Bieto_2ed_%281%29.pdf)
- Barrero, D., Camelo, D., Ovalle, A., Rozo, A., & Mahecha, G. (2012). *Vegetación del territorio CAR: 450 especies de sus llanuras y montañas*.  
<https://sie.car.gov.co/handle/20.500.11786/34055>
- Beraud, R., Vidal, L., Fuentes, C., & Brevis, A. (2014). *Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en Ugni molinae*. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Bernal, M. P., Rigo, M. D., Hernandez, C. A., & Armas, R. (2007). Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz ( variedad IACuba-28 ) resistentes a higromicina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX, 35–40.
- Biochemie, D. (2010). *Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemicals*.

www.duchefa.com

Bisang, R., Campi, M., & Cesa, V. (2009). Biotecnología y desarrollo. In *Naciones Unidas* (p. 107).

[http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/3650/1/S2009064\\_es.pdf%0Ahttp://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Biodesint.pdf](http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/3650/1/S2009064_es.pdf%0Ahttp://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Biodesint.pdf)

Brinkman, R. (2020). *Tipos de reguladores de crecimiento*. <https://royalbrinkman.es/centro-de-conocimiento/proteccion-de-cultivo-y-desinfeccion/que-tipos-de-reguladores-de-crecimiento-hay>

BUDDENHAGEN, C. E., RENTERIA, J. L., GARDENER, M., WILKINSON, S. R., SORIA, M., YÁNEZ, P., TYE, A., & VALLE, R. (2004). The Control of a Highly Invasive Tree *Cinchona pubescens* in Galapagos 1. *Weed Technology*, 18, 1194–1202.

Buitron, X. (1999). *Ecuador, Uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación*. <https://www.traffic.org/site/assets/files/9729/ecuador-uso-y-comercio-de-plantas-medicinales.pdf>

Campos-ruíz, J., Chico, L. C. De, & Chico-ruíz, J. (2014). *Efecto del ácido giberélico , nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina , Cinchona pubescens seed germination of Cinchona pubescens*. 2(1).

Cóndor, E., Oliveira, B., Loayza, K., & Reyna, V. (2009). Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens* Vahl. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 75(1), 54–63. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2009000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2009000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Conger, B. V. (2018). Cloning Agricultural Plants Via *In Vitro* Techniques. In *Cloning Agricultural Plants Via In Vitro Techniques*. <https://doi.org/10.1201/9781351070706>

Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh “Camu Camu.” *Scientia Agropecuaria*, 5, 25–34. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>

Correia, S. M., & Canhoto, J. M. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 242(1–4), 95–107. <https://doi.org/10.1007/S00709-010-0130-Z>

- Cruz, F. (2012). *Micropropagación (Manual de prácticas)*. 36.
- Cueva, M. C. (2020). *PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN IN VITRO DE RAÍCES A PARTIR DE EXPLANTES OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE Cinchona officinalis L., PROVENIENTES DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA*. Universidad Nacional de Loja.
- Cuevas, M. C. ., & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Cuvi, N. (2010). Ciencia e imperialismo en América Latina: la Misión de *Cinchona* y las estaciones agrícolas cooperativas (1940-1945) [Universitat Autònoma de Barcelona]. In *Tesis Doctoral*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/5182>
- Diaz, G. del C. (2012). *Procesos morfogénicos in vitro de Cedro ( Cedrela montana Moritz ex Turcz.) Inducidos a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma*. 141. [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5343/1/PROCESOS MORFOGÉNICOS in vitro DE CEDRO %28Cedrela montana Moritz ex Turcz.%29.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5343/1/PROCESOS_MORFOGÉNICOS_in_vitro_DE_CEDRO_%28Cedrela_montana_Moritz_ex_Turcz.%29.pdf)
- Eras, V., Moreno, J., Mendez, K., & Poma, R. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 20–28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/682>
- Escalante, T., & Morrone, J. (2002). Métodos para medir la biodiversidad. *Acta Zoológica Mexicana*, 85, 195–196.
- Figuroa, R. (2015). *EFFECTOS DE DIFERENTES DOSIS DE CITOQUININA EN INTERACCIÓN CON UN COMPUESTO ORGÁNICO EN LA GERMINACIÓN IN VITRO DE SEMILLA DE MORINGA (Moringa oleifera Lam.) [UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA]*. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1087/7/CD325\\_TESIS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1087/7/CD325_TESIS.pdf)
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp.) : distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. 187. [https://books.google.com/books/about/El\\_árbol\\_de\\_la\\_quina\\_Cinchona\\_spp.html?hl=es&id=lnMgPQAACAAJ](https://books.google.com/books/about/El_árbol_de_la_quina_Cinchona_spp.html?hl=es&id=lnMgPQAACAAJ)
- Garmendia Salvador, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp.) : distribución,*

- caracterización de su hábitat y arquitectura* (1. ed.). Universidad Técnica Particular de Loja.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture : handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Ltd.
- Godoy, L., Hector, E., Valera, E., & Torres, A. (2006). CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN *In Vitro* DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CON LOS BIOESTIMULANTES CUBANOS BIOSTAN Y LIPLANT. *Oryza Sativa L.) CON LOS BIOESTIMULANTES CUBANOS BIOSTAN Y LIPLANT Cultivos Tropicales*, 27(3), 31–36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825004>
- González, K. (2017). “*PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE Cinchona officinalis L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA.*” 3–4. [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/19942/1/Karina Cecibel Gonzalez Valdiviezo.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/19942/1/Karina%20Cecibel%20Gonzalez%20Valdiviezo.pdf)
- GreenImport Solutions. (2021). *KINETINA*. <https://www.greenimportsol.com/producto/kinetina-kineti-green-rg-99/>
- Guamán, P. del C. (2014). *Identificación de Hongos Micorrizicos Arbustales en plantas de Cinchona spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja*. [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9108/1/PAOLA DEL CISNE GUAMAN ALVAREZ.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9108/1/PAOLA%20DEL%20CISNE%20GUAMAN%20ALVAREZ.pdf)
- 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*. 118. [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22640/1/JESSICA ALEJANDRA GUARTANZA LOJA.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22640/1/JESSICA%20ALEJANDRA%20GUARTANZA%20LOJA.pdf)
- Hernandez, Y., & Gonzalez, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias (INCA)*, 31, 88–100. <https://doi.org/0258-5936>
- Jacques, M. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: los Meristemas y la Organogénesis*. Madrid. [http://documentacion.ideam.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=12058&shelfbrowse\\_itemnumber=12721](http://documentacion.ideam.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=12058&shelfbrowse_itemnumber=12721)

- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. 15, 28. <https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Koblitz, H., Koblitz, D., Schmauder, H. P., & Gröger, D. (1983). Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. : *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports*, 2(2), 95–97. <https://doi.org/10.1007/BF00270175>
- Laya, A., Gómez Aparicio, P., Yacuzzi, F. M. E., & Manuel, J. (1994). Conceptos Basicos del cultivo de tejidos vegetales. In *CIRIEC - España. Revista de economía pública, social y cooperativa: Vol. XXII* (Issue 45, pp. 653–673). <https://ucema.edu.ar/publicaciones/download/documentos/224.pdf>
- Levitus, G., Echennique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski. (2010). Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 3, 26–33.
- Lima, K. M. (2020). *INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS DE NOVO, A PARTIR DE CALLOS OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE Cinchona officinalis L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA*. 108. [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS WILSON FERNANDO.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_WILSON_FERNANDO.pdf)
- Lima, N. R., Anto, M. J., Eras, V. H., Minchala, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M., & Valarezo Ortega, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169–178. <https://doi.org/10.18271>
- Litz, R. ., & Jarret, R. . (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y orgnogénesis. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. (p. 1039).
- Lojan, L. (1992). *El verdor de Los Andes. Arboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal altoandino*. <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/286>
- Lucero, D. E. (2013). *ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CAFÉ VARIEDAD ROBUSTA Coffea canephora*. Universidad técnica de Ambato.

- Martínez, J. C. (2017). *Fisiología Vegetal*.  
<https://georgiusm.files.wordpress.com/2017/11/tema-9-auxinas.pdf>
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., & Gutierrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 9(1), 17–34. <https://www.redalyc.org/pdf/629/62990103.pdf>
- Mendez, 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* [Universidad Nacional de Loja].  
[http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS WILSON FERNANDO.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_WILSON_FERNANDO.pdf)
- Mendoza, M. (2012). *EFEECTO DEL FOTOPERÍODO SOBRE LA DURACIÓN DE LA FASE VEGETATIVA EN TRES ACCESIONES CHILENAS DE QUÍNOA (Chenopodium quinoa willd.)*. Universidad de Chile.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.  
<https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>
- Narváez, S. (2009). REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO ( Rosa sp. Var Akito). *Escuela Politecnica Del Ejército – Espe*, 75.
- Núñez, L., & Gago, J. (2007). *Micropropagación Vegetal*. 7.  
[http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo\\_2008\\_07.pdf](http://revbigo.webs.uvigo.es/images/revbigo/2008/Rebigo_2008_07.pdf)
- Orantes, H. Á., & López, Y. E. (2019). Evaluación de medios de inducción *in vitro* a callo vegetal en explantes foliares de *Annona diversifolia* Safford (Magnoliales: Annonaceae). *Revista Minerva*, 2(1), 22–30. <https://doi.org/10.5377/revminerva.v2i1.12522>
- Pedroza-Manrique, J. A., & Serrato-Muñoz, Lina Constanza Castaño-Robayo, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl . y *Maxillaria* Lindl . *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 86–102.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*.  
<https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/1516>

- Pohanish, R. (2015). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals - Richard P. Pohanish* (2nd ed.). [https://books.google.com.ar/books?id=-rEAgAAQBAJ&pg=PA493&dq=%22Indole-3-butyrac+acid%22+indole+butanoic+acid+butyrac+indolebutyrac+%22Plant+growth+regul+ator%22+%22Used+as+a+growth+hormone+and+stimulant+for+root+cuttings%22+%22Not+listed+for+use+in+EU+countr+ies%22+%22Registered+for+use+in+the+U.S.+and+other+countr+ies%22&hl=es&sa=X&ei=Ood\\_VLbWCIKR0QT8mYGwBQ#v=onepage&q=%22Indole-3-butyrac+acid%22+indole+butanoic+acid+butyrac+indolebutyrac+%22Plant+growth+regul+ator%22+%22Used+as+a+growth+hormone+and+stimulant+for+root+cuttings%22+%22Not+listed+for+use+in+EU+countr+ies%22+%22Registered+for+use+in+the+U.S.+and+other+countr+ies%22&f=false](https://books.google.com.ar/books?id=-rEAgAAQBAJ&pg=PA493&dq=%22Indole-3-butyrac+acid%22+indole+butanoic+acid+butyrac+indolebutyrac+%22Plant+growth+regul+ator%22+%22Used+as+a+growth+hormone+and+stimulant+for+root+cuttings%22+%22Not+listed+for+use+in+EU+countr+ies%22+%22Registered+for+use+in+the+U.S.+and+other+countr+ies%22&hl=es&sa=X&ei=Ood_VLbWCIKR0QT8mYGwBQ#v=onepage&q=%22Indole-3-butyrac+acid%22+indole+butanoic+acid+butyrac+indolebutyrac+%22Plant+growth+regul+ator%22+%22Used+as+a+growth+hormone+and+stimulant+for+root+cuttings%22+%22Not+listed+for+use+in+EU+countr+ies%22+%22Registered+for+use+in+the+U.S.+and+other+countr+ies%22&f=false)
- Preciado, P. M., Ayala, G. I., & Martínez, D. (2015). Enraizamiento a partir de callos de *Jatropha cuneata* (Wiggins & Rollins) *in vitro*. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 4(8), 58. <https://doi.org/10.23913/ciba.v4i8.34>
- Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S., & Kloepper, J. W. (1997). Salicylic Acid Produced by *Serratia marcescens* 90-166 Is Not the Primary Determinant of Induced Systemic Resistance in Cucumber or Tobacco. In *761 MPMI* (Vol. 10, Issue 6).
- Raya, J. C. (1991). El fototropismo en plantas. *Acta Universitaria*, 13(2), 47–52. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613206>
- Redagrícola. (2017, November). *Fitohormonas: reguladores de crecimiento y bioestimulantes - Redagrícola Chile*. <https://www.redagricola.com/cl/fitohormonas-reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/>
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2018). Manual de medios de cultivo. *BioCen*, 183.
- Rosales, A. (2006). *Establecimiento de células en suspensión de Erythrina herbacea para la producción de alcaloides*. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA.
- Rueda, J. (2020). *PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS CALLOGÉNICAS, A PARTIR DE EXPLANTES OBTENIDOS DE*

VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., DE RELICTOS BOSCOSOS DE LA PROVINCIA DE LOJA. [Universidad Nacional de Loja]. [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS WILSON FERNANDO.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_WILSON_FERNANDO.pdf)

Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa*(Willd.) D.C. (uña de gato). *Revista Tecnología En Marcha*, 28, 105–120. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt)

Sasson, A. (1994). Biotechnologies in developing countries: present and future. In *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (Vol. 10).

SENNA. (2022). *Reguladores de crecimiento – Científica Senna*. <https://www.cientificasenna.com/producto/reguladores-de-crecimiento/>

Serrano, M., & Piñol, M. (1991). Biotecnología Vegetal. In V. Zapata (Ed.), *Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF)*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=89113>

Soto, B., Valverde, L., Rojas, A., & Hine, A. (2010). *Establecimiento in vitro de Cedrela salvadorensis Standl* (Vol. 23). [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/51/50](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/51/50)

Srivastava, L. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. [https://books.google.com.ar/books?id=wXLBKdncciQC&pg=PA167&dq=%22indole-3-butyric+acid%22+%22as+we+know+now,+indole-3-butyric+acid+occurs+naturally+in+many+plants,+but+for+a+long+time+it+was+known+as+a+synthetic+auxin+only%22&hl=es&sa=X&ei=B45\\_VMftLoq1oQTegILgBg&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=%22indole-3-butyric acid%22 %22as we know now%2C indole-3-butyric acid occurs naturally in many plants%2C but for a long time it was known as a synthetic auxin only%22&f=false](https://books.google.com.ar/books?id=wXLBKdncciQC&pg=PA167&dq=%22indole-3-butyric+acid%22+%22as+we+know+now,+indole-3-butyric+acid+occurs+naturally+in+many+plants,+but+for+a+long+time+it+was+known+as+a+synthetic+auxin+only%22&hl=es&sa=X&ei=B45_VMftLoq1oQTegILgBg&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=%22indole-3-butyric%20acid%22%20as%20we%20know%20now%2C%20indole-3-butyric%20acid%20occurs%20naturally%20in%20many%20plants%2C%20but%20for%20a%20long%20time%20it%20was%20known%20as%20a%20synthetic%20auxin%20only%22&f=false)

Ulloa, C. (2006). *Aromas y sabores andinos*. <http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/staff/PDFs/ulloa/Aromas.pdf>

Vertedor, D. M., Perez N., F., & Jonatha, D. A. (2016). LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA DE DESARROLLO DEL SECTOR AGROALIMENTARIO DE

EXTREMADURA. *Universidad de Extremadura*, 223–236.

Villalobos, M. V., & Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In *Ciat* (pp. 127–142).

## 11. Anexos

Anexo 1. Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas, bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y el fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 70 días de evaluación.

Tratamientos	Repeticiones	Mortalidad (%)	Contaminación (%)	Explantos fenolizados (%)	Explantos con callo (%)	Brote por callo (%)	Raíces por callo (%)
T0	1	50	0	50	0	50	0
T0	2	100	0	100	0	0	0
T0	3	100	0	100	0	10	0
T1	1	60	0	60	100	0	10
T1	2	10	0	10	100	20	50
T1	3	20	0	20	100	0	60
T2	1	30	0	30	100	10	30
T2	2	0	0	0	100	0	50
T2	3	0	0	0	100	10	20
T3	1	10	0	10	70	20	10
T3	2	10	0	10	80	0	0
T3	3	20	0	20	90	10	30
T4	1	30	0	30	90	10	10
T4	2	0	0	0	100	10	20
T4	3	10	10	10	100	10	0

Leyenda: T= Tratamiento. T0= 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T1= 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T2= 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T3= 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN. T4= 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN.

Anexo 2. Fotografías registradas en la inducción de estructuras callogénicas, bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y el fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 70 días de evaluación.

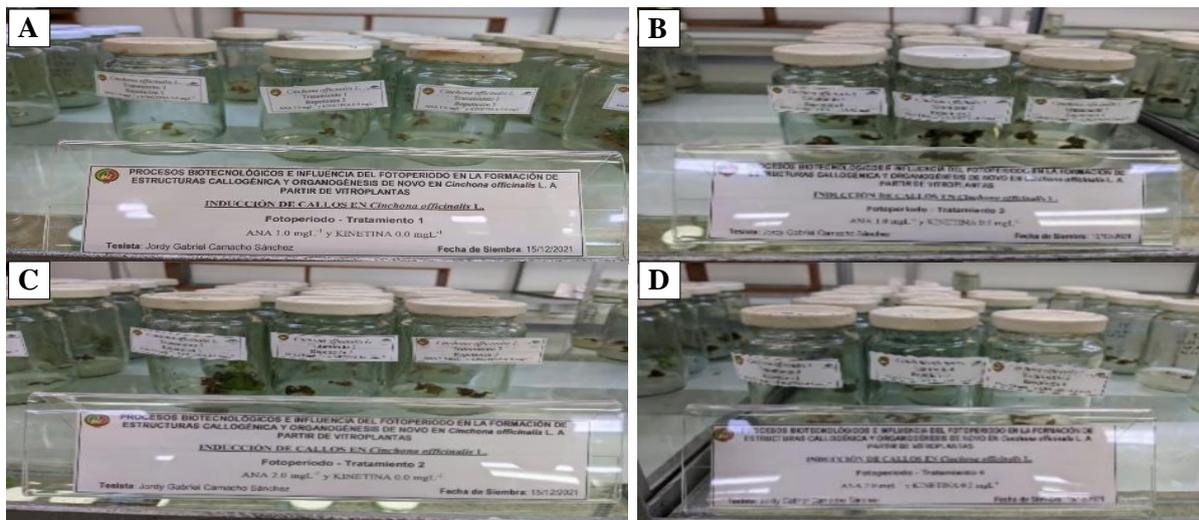


Figura 35. Tratamientos en fotoperiodo en el cuarto de incubación: A= Tratamiento 1. B=Tratamiento 2. C= Tratamiento 3. D= Tratamiento 4.

Anexo 3. Datos obtenidos en la inducción de estructuras callogénicas, bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina y total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

Tratamientos	Repeticiones	Mortalidad %	Contaminación %	Explantos fenolizados %	Explanse con callo %	Brote por callo %	Raíces por callo %
T0	1	50	0	50	50	30	0
T0	2	70	0	70	50	30	0
T0	3	90	0	90	50	10	0
T1	1	60	0	60	100	0	20
T1	2	70	0	70	90	0	0
T1	3	60	0	60	100	10	20
T2	1	80	0	80	100	0	20
T2	2	80	0	80	100	20	0
T2	3	70	0	70	90	10	0
T3	1	30	0	30	100	10	50
T3	2	10	0	10	100	10	60
T3	3	30	0	30	100	0	0
T4	1	30	0	30	100	0	40
T4	2	20	0	20	100	10	50
T4	3	50	0	50	100	0	20

Leyenda: T= Tratamiento. T0= 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T1= 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T2= 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,0 mg L<sup>-1</sup> KIN. T3= 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN. T4= 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN

Anexo 4. Fotografías registradas en la inducción de estructuras callogénicas, bajo la aplicación de la combinación hormonal auxina – citoquinina en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.



Figura 36. Medio de cultivo contaminado, incubado en condiciones de fotoperiodo a los 70 días de evaluación.



Figura 37. Presencia de callo en explantes incubados en condiciones de total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

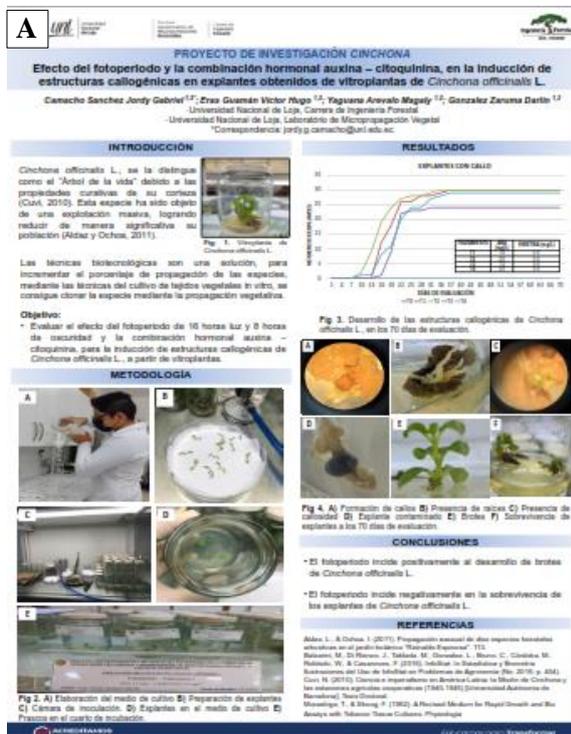


Figura 38. Brote *de novo* presente en el T3, incubado en total oscuridad a los 70 días de evaluación.

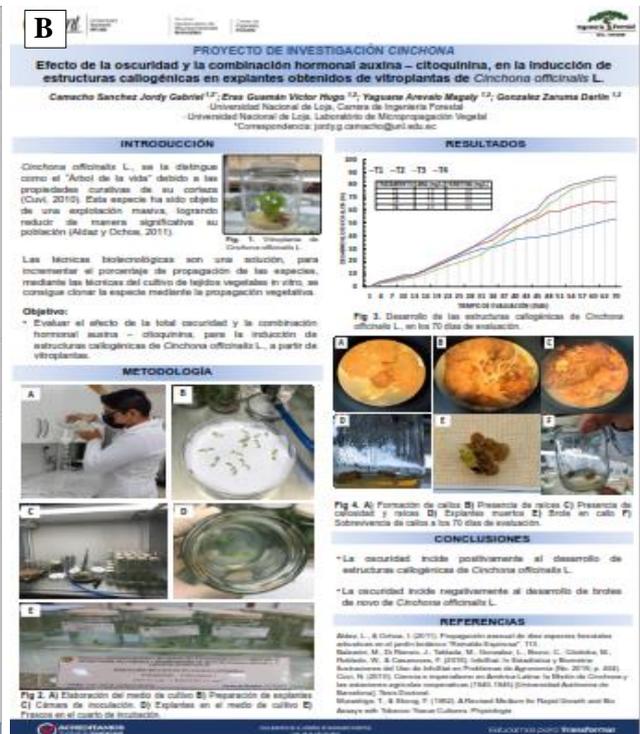


Figura 39. Frasco de vidrio con brote *de novo* presente en el T3, incubado en total oscuridad a los 70 días de evaluación.

Anexo 5. Poster científico presentado, para la difusión de resultados a actores sociales interesados.



A: Poster científico con los resultados obtenidos en fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a los 70 días de evaluación.



B: Poster científico con los resultados obtenidos en total oscuridad, a los 70 días de evaluación.

## Anexo 6. Tríptico para la difusión de resultados con actores sociales interesados.

### RESULTADOS

1. Resultados del efecto de la oscuridad y la combinación hormonal Auxina- Citoquinina

**1.1. Supervivencia de los explantes**

Tratamiento	Supervivencia (%)
T0	30
T1	77
T2	67
T3	97
T4	80

**1.2. Porcentaje de explantes con callo**

Tratamiento	Porcentaje (%)
T0	0
T1	90
T2	77
T3	97
T4	97

**1.3. Curva de desarrollo de callos**

**1.3. Friabilidad de los callos**

Tratamiento	Friabilidad (%)
T0	0
T1	50
T2	43
T3	60
T4	57

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Las condiciones de incubación de los explantes, en oscuridad y la combinación hormonal auxina- citoquinina, influyen en la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis*
- La mayor sobrevivencia de los explantes con callo de *Cinchona officinalis* L., es al bajo condiciones de fotoperiodo y con la combinación hormonal de 2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN.

Para la obtención de brotes, el fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad registro fue el adecuado, debido a que, por ser brotes, es necesaria la intensidad luminica, por su fototropismo positivo.

Realizar siembras sucesivas in vitro de *Cinchona officinalis* con el fin de contar con material vegetal suficiente para inducir estructuras callogénicas.

Probar diversas combinaciones de concentraciones hormonales de la auxina ANA (ácido naftalacético) y la citoquinina KIN (kinetina) con el fin de inducir estructuras callogénicas en las mismas condiciones de fotoperiodo y en total oscuridad para aumentar la probabilidad de conseguir estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN VEGETAL

**“FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS CALLOGÉNICAS EN EXPLANTES OBTENIDOS DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., EN CONDICIONES DE FOTOPERIODO Y OSCURIDAD”**

**Equipo de investigación:**

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán  
Ing. Magaly Yaguana Arévalo  
Ing. Darlín González Zaruma  
Jordy Gabriel Camacho Sanchez

Loja— Ecuador  
2022

### INTRODUCCIÓN

*Cinchona officinalis* L., conocida comúnmente como cascarilla, quina, quina quina, polvos de la condesa, se considera “Planta Nacional del Ecuador”, se la distingue como el “Árbol de la vida” debido a las propiedades curativas de su corteza (Cuví, 2010). Esta especie ha sido objeto de una explotación masiva, logrando reducir de manera significativa su población (Aldaz y Ochoa, 2011).

Las técnicas biotecnológicas son una solución, para incrementar el porcentaje de propagación de las especies, mediante las técnicas del cultivo de tejidos vegetales in vitro, se consigue clonar la especie mediante la propagación vegetativa.

En el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, se lleva a cabo el proyecto “Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis de novo, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.”. Por lo cual, los resultados de la presente investigación, contribuyen en la generación de información científica para la inducción de estructuras callogénicas, probando concentraciones hormonales de auxinas citoquinas y la influencia de la luz.

### OBJETIVO GENERAL:

Contribuir a la generación de información científica relacionada con la influencia de la luz, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto del fotoperiodo y la combinación hormonal auxina- citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Evaluar el efecto de la oscuridad y la combinación hormonal auxina- citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación.

**1. Ubicación del sitio de estudio.**

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, perteneciente a la Universidad Nacional de Loja.

### 2. Metodología para evaluar el desarrollo de estructura callogénica en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

**2.1. Selección del material vegetal**

Los explantes provinieron de vitroplantas del árbol semillero número 3, se utilizaron secciones de nudos, hojas, cotiledones, brotes axilares y terminales

**2.2. Preparación del medio de cultivo**

El medio de cultivo basal, estuvo constituido por sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), al cual se adicionó el complejo vitamínico: Vitaminas B5. Se les aplicó el balance hormonal auxina-citoquinina: ácido naftalenacético (ANA) + kinetina (KIN), en diferentes concentraciones.

**2.3. Inoculación de los explantes**

Dentro de la cámara de flujo laminar, los explantes fueron inoculados 2 por frasco, siendo cada explante la unidad experimental. Los mismos fueron trasladados al cuarto de incubación, donde se sometieron a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, mientras que en el caso de oscuridad, se cubrieron totalmente con cartulina negra durante 70 días de evaluación.

**2.4. Variables evaluadas**

Explantes contaminados, Explantes fenolizados, Explantes muertos, Explantes con callo, Raíces por callo, Brotes por callo, Color del callo, Friabilidad del callo.

**2.4. Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA); y, la prueba estadística con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias y varianzas.

Anexo 7. Certificado de traducción.



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

Celular: +593989805087  
Email: [yaniges@icloud.com](mailto:yaniges@icloud.com)  
Loja, Ecuador 110104

Loja, 11 de enero de 2023

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

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del trabajo de integración curricular **Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad**, de autoría del estudiante Jordy Gabriel Camacho Sánchez, con cédula 0705284305, es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente

YANINA  
BELEN  
QUIZHPE  
ESPINOZA

Firmado digitalmente por  
YANINA BELEN  
QUIZHPE ESPINOZA  
Fecha: 2023.01.11  
23:16:47 -05'00'

Yanina Quizhpe Espinoza.

**Traductora**