



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal

Implantación de tejidos e inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Trabajo de Integración Curricular
previo a la obtención del título de
Ingeniera Forestal

AUTORA:

Marcia Janina Manchay Loaiza

DIRECTOR:

Ing. Andrés Roosevelt Armijos Montaña, Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 02 de abril de 2024

Ing. Andrés Roosevelt Armijos Montaña, Mg. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: “**Implantación de tejidos e inducción de estructuras callogénesis, a partir de explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.**” previo a la obtención del título de **Ingeniera Forestal**, de la autoría de la estudiante **Marcia Janina Manchay Loiza**, con cédula de identidad **Nro. 1105479503**, 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. Andrés Roosevelt Armijos Montaña, Mg. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Marcia Janina Manchay Loaiza**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular 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: 1105479503

Fecha: 30 de abril del 2024

Correo electrónico: marcia.manchay@unl.edu.ec

Teléfono: 0959465468

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

Yo, **Marcia Janina Manchay Loaiza**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: Implantación de tejidos e inducción de estructuras callogénesis, a partir de explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L., como requisito para optar al título de Ingeniera Forestal, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los treinta días del mes de abril de dos mil veinticuatro.

Firma:



Autora: Marcia Janina Manchay Loaiza

Cédula: 1105479503

Dirección: Loja, Los Ciprés

Correo electrónico: marcia.manchay @unl.edu.ec

Teléfono: 0959465468

Dedicatoria

Dedico la presente investigación con todo mi cariño a Dios y a mi querida familia, en especial a mi abuelito Albino Loaiza quien me ha apoyado y brindado su amor a lo largo de mi vida, también a mi mami Delia Loaiza quien a pesar de las dificultades siempre ha estado a mi lado dándome fuerzas. A mi querido padre Carlos Manchay por apoyo incondicional durante todo el proceso y por ultimo y no menos importante a mis tíos quienes han sido un pilar fundamental en mi vida. A todos ellos por los valores inculcados en mí, en especial el esfuerzo y valentía; por sus consejos y palabras de aliento que me han inspirado hacer la persona que soy hoy en día.

Marcia Janina Manchay Loaiza

Agradecimiento

Expreso mi más sincero agradecimiento al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc, por la confianza depositada en mí, sus enseñanzas y apoyo brindado durante todo el proceso de desarrollo de mi trabajo de investigación. De igual forma, a mi director de Trabajo de Integración Curricular (TIC) Ing. Andrés Armijos por su orientación y paciencia, además, de ser mi guía durante el proceso de plasmar mis resultados. A la ing. Magaly Yaguana por brindarme su conocimiento y apoyo, quien fue de vital importancia durante la fase de laboratorio de la presente investigación.

De forma especial, quiero expresar mi profundo agradecimiento al Ing. Darlin González y la Ing. Deicy Lozano, quienes fueron parte fundamental para fortalecer la redacción del TIC y artículo científico, respectivamente. Además, a toda la planta docente de Ingeniería Forestal por los conocimientos impartidos durante los 9 ciclos académicos; y a la Ing. Jenny Peña por su tiempo y paciencia durante todos los tramites desarrollados a lo largo de la carrera.

Finalmente manifiesto mi más sincero agradecimiento a mis amigos quienes me han ayudado en el proceso de mi carrera, especialmente a mi amiga Abigail González, quien ha estado presente en los momentos buenos y malos brindándome su apoyo incondicional.

Marcia Janina Manchay Loaiza

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiv
Índice de anexos	xviii
1. Titulo	1
2. Resumen	2
Abstract	3
3. Introducción.....	4
4. Marco teórico	6
4.1. Descripción del género <i>Cinchona</i>	6
4.2. Descripción taxonómica de <i>Cinchona officinalis</i> L.	6
4.3. Ubicación y distribución geográfica de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	7
4.4. Importancia de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	8
4.5. Utilización de <i>Cinchona officinalis</i> L.	8
4.6. Características de la biotecnología vegetal	8

4.7.	Métodos de propagación <i>in vivo</i>	9
4.7.1.	Propagación sexual por semilla.....	9
4.7.2.	Multiplicación vegetativa o asexual.....	9
4.8.	Métodos de propagación <i>in vitro</i>	9
4.8.1.	Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	9
4.9.	Medio de cultivo.....	10
4.9.1.	Sales minerales para el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962).....	11
4.10.	Vitaminas.....	12
4.11.	Auxinas.....	12
4.12.	Citoquininas.....	13
4.13.	Fases de la micropropagación <i>in vitro</i>	13
4.13.1.	Preparación de la planta madre.....	14
4.13.2.	Desinfección del material vegetal.....	14
4.13.3.	Introducción del material <i>in vitro</i>	14
4.13.4.	Multiplicación de brotes.....	15
4.13.5.	Elección de un medio de cultivo para enraizamiento de los explantes.....	15
4.13.6.	Aclimatación de los explantes.....	15
4.14.	Callo.....	16
4.14.1.	Cultivo de callos.....	16
4.15.	Trabajos realizados en biotecnología vegetal con la especie <i>Cinchona officinalis</i> L.....	17
5.	Metodología.....	18
5.1.	Área de estudio.....	18
5.2.	Metodología para evaluar la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> , durante la fase de implantación de los tejidos	18

5.2.1.	Colecta de material vegetal	18
5.2.2.	Desinfección de material vegetal	19
5.2.3.	Preparación del medio de cultivo	20
5.2.4.	Aislamiento, inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes	21
5.2.5.	Diseño experimental.....	22
5.2.6.	Variables evaluadas	24
5.2.7.	Identificación de agentes contaminantes	25
5.2.8.	Análisis estadístico	25
5.3.	Metodología para determinar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> o vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad	26
5.3.1.	Desinfección de los explantes	26
5.3.2.	Aislamiento, inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes	27
5.3.3.	Diseño experimental.....	29
5.3.4.	Distribución espacial de los tratamientos	30
5.3.5.	Variables evaluadas	31
5.3.6.	Análisis estadístico	32
5.4.	Metodología para la difusión de resultados.....	33
6.	Resultados	34
6.1.	Desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> , durante la fase de implantación de los tejidos	34
6.1.1.	Porcentaje de contaminación.....	34
6.1.2.	Días a la contaminación	35
6.1.3.	Porcentaje de fenolización.....	36
6.1.4.	Días a la fenolización	36
6.1.5.	Sobrevivencia de explantes	37

6.2.	Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> y vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad.....	38
6.2.1.	Porcentaje de contaminación en explantes <i>ex vitro</i>	38
6.2.2.	Porcentaje de fenolización en explantes <i>ex vitro</i>	38
6.2.3.	Número de explantes <i>ex vitro</i> con callo	39
6.2.4.	Días a la formación del callo en explantes <i>ex vitro</i>	40
6.2.5.	Color del callo en explantes <i>ex vitro</i>	41
6.2.6.	Friabilidad del callo en explantes <i>ex vitro</i>	42
6.2.7.	Numero de raíces por callo en explantes <i>ex vitro</i>	42
6.2.8.	Porcentaje de contaminación en explantes <i>in vitro</i>	43
6.2.9.	Porcentaje de fenolización en explantes <i>in vitro</i>	44
6.2.10.	Número de explantes <i>in vitro</i> con callo.....	45
6.2.11.	Días a la formación del callo en explantes <i>in vitro</i>	46
6.2.12.	Color del callo en explantes <i>in vitro</i>	47
6.2.13.	Friabilidad del callo en explantes <i>in vitro</i>	48
6.2.14.	Número de raíces por callo en explantes <i>in vitro</i>	49
6.3.	Difusión de resultados de la investigación a los actores sociales interesados, para su conocimiento y aplicación	50
6.3.1.	Socialización de los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC) a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de Loja	50
6.3.2.	Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte de la Socialización de los Proyectos Integradores de Saberes organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal	50

6.3.3.	Socialización de resultados en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán de bosques.	51
7.	Discusión	52
7.1.	Contaminación.....	52
7.2.	Fenolización	53
7.3.	Formación de estructuras callogénicas <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i>	54
8.	Conclusiones	59
9.	Recomendaciones	60
10.	Bibliografía.....	61
11.	Anexos	69

Índice de tablas

Tabla 1.	Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	10
Tabla 2.	Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962).	11
Tabla 3.	Fases de la micropropagación <i>in vitro</i>	13
Tabla 4.	Tratamiento para la desinfección de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i> , para la implantación de los tejidos.	20
Tabla 5.	Especificaciones del Diseño experimental, para la evaluar la desinfección de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes del invernadero, en la implantación de los tejidos	23
Tabla 6.	Factores y niveles de concentración de hipoclorito de sodio, para la inoculación <i>in vitro</i> de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i>	23
Tabla 7.	Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar la desinfección de explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes del invernadero.....	24
Tabla 8.	Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y oxidados, obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	24
Tabla 9.	Tratamientos para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i> o vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.	29
Tabla 10.	Tratamientos para evaluar, el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i> y vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.	29

Tabla 11. Especificaciones del diseño experimental, para la evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción <i>in vitro</i> de estructuras callogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i> o vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.	29
Tabla 12. Factores y niveles de concentración de balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación <i>in vitro</i> de los explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., provenientes de plántulas <i>ex vitro</i> y vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.	30
Tabla 13. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i> o vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de oscuridad.	31
Tabla 14. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas en <i>Cinchona officinalis</i> L.....	32
Tabla 15. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número raíces por callo, número de brotes por callo, número de días a la formación de callo por explante, en la inducción de estructuras callogénicas, utilizando diferentes concentraciones del balance hormonal auxina-citoquinina.	32

Índice de figuras

Figura 1. A) Árbol de <i>C. officinalis</i> ; B) Hojas de <i>C. officinalis</i> ; C) Frutos de <i>C. officinalis</i> ; D) Flores de <i>C. officinalis</i> ; y E) Semillas de <i>C. officinalis</i>	7
Figura 2. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.	18
Figura 3. Preparación y colecta del material vegetal: A) Aplicación del fungicida (Benomil 2,0 g L-1) y bactericida (Kasumin 1,0 g L-1); B) Colecta de hojas jóvenes; C) Cámara húmeda.	19
Figura 4. Desinfección del material vegetal: A) Lavado de hojas con agua corriente más detergente; B) Explantes sumergidos en solución fungicida; C) Explantes en solución antioxidante; D) Enjuague con alcohol al 90 %; E) Aplicación de diferentes concentraciones de NaClO; y, F) Aclareos para retirar residuos.	20
Figura 5. Preparación del medio de cultivo de MS (1962): A) Macro y micronutrientes; B) Medición de las soluciones madre; C) Depuración del medio basal; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 20 ml por cada frasco.	21
Figura 6. Aislamiento del tipo de explantes, a obtener de la hoja de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	21
Figura 7. Aislamiento, inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes A) Corte en las hojas para obtener los explantes; B) Implantación de los tejidos; C) Etiquetación de los frascos por tratamiento y repetición; D) Distribución espacial de los frascos en el cuarto de luces; y, E) Ensayo cubierto con cartulina para generar cámara oscura.	22
Figura 8. Identificación de hongos y bacterias en explantes de <i>Cinchona officinalis</i> L., A) Cultivo de agente contaminante; B) Pruebas catalasa; y C); Pruebas bioquímicas.	25

Figura 9. Desinfección del material vegetal: A) Aplicación del fungicida-bactericida; B) Colecta de hojas jóvenes; C) Cámara húmeda; D) Explantes en solución fungicida; E) Aplicación de NaClO; y, F) Aclareos para retirar residuos.	27
Figura 10 . Aislamiento, inoculación e incubación <i>in vitro</i> de los explantes de los explantes obtenidos <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> : A) Obtención de explantes de 1 cm ² en material; B) Implantación de los tejidos en material; y, C) Distribución espacial de los frascos en el cuarto de luces.	27
Figura 11. Preparación del medio de cultivo de MS (1962): A) Macro y micronutrientes; B) Medición de las soluciones madre; C) Medición de ANA y KIN; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 20 ml por cada frasco.....	28
Figura 12. Porcentaje de contaminación por tratamiento en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	34
Figura 13. A) y B) <i>Alternaria</i> sp vista macro y microscópica; C) y D) Vista macro y microscópica de <i>Collectotrichum</i> sp; C) y D) Vista macro y microscópica de la bacteria <i>Bacillus</i> spp; y, G) y H) Vista macro y microscópica de la bacteria <i>cocobacilos</i> gram positivos..	35
Figura 14. Porcentaje de contaminación según los días de evaluación en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	35
Figura 15. Porcentaje de explantes <i>ex vitro</i> fenolizados de <i>Cinchona officinalis</i> L., por cada tratamiento.....	36
Figura 16. Porcentaje de fenolización según los días de evaluación en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	37
Figura 17. Número de explantes <i>ex vitro</i> vivos de <i>Cinchona officinalis</i> L.	37
Figura 18. Porcentaje de contaminación en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	38

Figura 19. Porcentaje de fenolización en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	39
Figura 20. Estructuras callogénicas en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L en los cuatro tratamientos. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); C): Tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L);y, D): Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).....	39
Figura 21. Porcentaje de estructuras callogénicas en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	40
Figura 22. Porcentaje de callos según los días de evaluación en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	40
Figura 23. Color del callo en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. A): Callo color café; y, B): Callo color crema.	41
Figura 24. Color del callo en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	41
Figura 25. Friabilidad del callo en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	42
Figura 26. Raíces del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L por cada tratamiento. A): Tratamiento 1 (5,00 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 3 (5,00 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, C): Tratamiento 4 (10,00 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).....	43
Figura 27. Número de raíces por callo en explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	43
Figura 28. Porcentaje de contaminación en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	44
Figura 29. Porcentaje de fenolización en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	44
Figura 30. Estructuras callogénicas en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L en los cuatro tratamientos. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); C): Tratamiento 3	

(5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, D) Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).....	45
Figura 31. Porcentaje de estructuras callogénicas en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	45
Figura 32. Porcentaje de callos según los días de evaluación en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	46
Figura 33. Color del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. A): Callo color crema; B): Callo color café; y, C): Callo color café claro.....	47
Figura 34. Color del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	47
Figura 35. Friabilidad del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L. A): Callo friable; y, B):Callo no friable.	49
Figura 36. Friabilidad del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	48
Figura 37. Raíces del callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L por cada tratamiento. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, D): Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).....	49
Figura 38. Número de raíces por callo en explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	49
Figura 39. Socialización del Trabajo de Integración Curricular a estudiantes de: A) Noveno ciclo, asignatura Trabajo de Integración Curricular; y, B) Estudiantes de sexto ciclo de Biotecnología Forestal.	50
Figura 40. Socialización del Trabajo de Integración Curricular. A) Poster científico; B) Actores interesados; C) Socialización a técnicos y docentes interesados; y, D) Socialización a estudiantes interesados.....	51
Figura 41 Socialización del Trabajo de Integración Curricular en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán: A) presentación oral; y, B): Presentación del poster.....	51

Índice de anexos

Anexo 1.	Proyectos de investigación realizados en biotecnología vegetal con la especie <i>Cinchona officinalis</i> L.....	69
Anexo 2.	Script de análisis de varianza.	70
Anexo 3.	Análisis de datos de explantes <i>ex vitro</i> contaminados de <i>Cinchona officinalis</i> L., primer objetivo.	71
Anexo 4.	Análisis de datos de explantes <i>ex vitro</i> fenolizados de <i>Cinchona officinalis</i> L., primer objetivo.	72
Anexo 5.	Análisis de datos de explantes <i>ex vitro</i> contaminados de <i>Cinchona officinalis</i> L., segundo objetivo.....	73
Anexo 6.	Análisis de datos de explantes <i>ex vitro</i> fenolizados de <i>Cinchona officinalis</i> L., segundo objetivo.....	74
Anexo 7.	Análisis de datos de explantes con callo <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	75
Anexo 8.	Análisis de datos del número de raíces por callo explantes <i>ex vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	76
Anexo 9.	Análisis de datos de explantes contaminados <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.	77
Anexo 10.	Análisis de datos de explantes fenolizados <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	78
Anexo 11.	Análisis de datos de explantes con callo <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	79
Anexo 12.	Análisis de datos del número de raíces por callo explantes <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> L.....	80
Anexo 13.	Análisis de información.....	81
Anexo 14.	Días a la contaminación segundo objetivo.	82
Anexo 15.	Días a la fenolización segundo objetivo.	83
Anexo 16.	Certificación de la traducción del Abstrac.	84

1. Título

Implantación de tejidos e inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

2. Resumen

Cinchona officinalis L, es una especie nativa de la provincia de Loja distribuyéndose en un rango altitudinal desde los 700 hasta los 2,900 m s.n.m. Desde su descubrimiento ha sido ampliamente utilizada en el ámbito medicinal debido a su alto contenido de alcaloides en la corteza, provocando que la especie sea objeto de sobreexplotación, esto acompañado de que la especie presenta una baja tasa de propagación; lo cual, conlleva a que en la actualidad las poblaciones naturales se encuentren reducidas a relictos boscosos y árboles aislados en potreros. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo la implantación de tejidos provenientes del invernadero e inducción de estructuras callogénicas de explantes *ex vitro* e *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. Para ello, se recolectaron explantes de hojas de plántulas de invernadero (*ex vitro*), los cuales fueron previamente tratados con fungicida-bactericida y luego trasladados al laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja. Estos explantes fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones (10, 15, 20 y 25 %) durante 10 minutos. Posteriormente, fueron inoculados en medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con vitaminas (tiamina, mio-inositol, piridoxina, ácido nicotínico, sacarosa, agar, ácido ascórbico, ácido cítrico y cisteína), así como concentraciones hormonales de ANA (5 y 10 mg/L) y KIN (0,5 mg/L) en condiciones de oscuridad. Durante los 45 días de evaluación, los explantes *ex vitro* registraron el 31 % de contaminación y un 55 % de fenolización posterior a los 10 días de inoculación; por lo cual, el material *ex vitro* no fue suficiente para el ensayo de formación de estructuras callogénicas y se tomó la decisión de utilizar material *in vitro*. Además, la formación de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* fue del 71,33 % con promedio de 24 raíces por explante; y, para explantes *ex vitro* fue del 26,67 % de formación de callos con 13 raíces en promedio. Finalmente, en la fase de desinfección de explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L., el tratamiento 3 con 20 % de NaClO demostró un control efectivo sobre la contaminación, considerando su optimización durante la fase inicial en la implantación de tejidos. Sin embargo, respecto a la formación de estructuras callogénicas en explantes *ex vitro* y en explantes *in vitro* la combinación de auxinas y citoquinas con la que se obtuvo mayor porcentaje fue la combinación de 10 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de KIN durante 90 días de evaluación.

Palabras clave: *Cinchona officinalis*, biotecnología forestal, desinfección, auxina-citoquinina, Murashige y Skoog.

Abstract

In the province of Loja, *Cinchona officinalis* L. is a native species that is distributed in an altitudinal range between 700 and 2,900 meters above sea level. Since its discovery it has been widely used in the medicinal field due to its high content of alkaloids in the bark, causing the species to be subject to overexploitation. Additionally, due to its low rate of propagation, the species at present consists primarily of wooded remnants and isolated trees in pastures. Therefore, the present study aims at the implantation of greenhouse tissues and induction of callogenic structures of *ex vitro* and *in vitro* explants of *Cinchona officinalis* L. For this purpose, leaf explants were collected from greenhouse seedlings (*ex vitro*), which were previously treated with a fungicide-bactericide and then transferred to the Plant Micropropagation Laboratory of the National University of Loja. These explants were disinfected with sodium hypochlorite (NaClO) at different concentrations (10, 15, 20 and 25%) for 10 minutes. The cells were then inoculated in Murashige and Skoog (MS, 1962) basal culture medium supplemented with vitamins (thiamine, myo-inositol, pyridoxine, nicotinic acid, sucrose, agar, ascorbic acid, citric acid and cysteine), along with hormonal concentrations of ANA (5 and 10 mg/L) and KIN (0.5 mg/L). During the 45 days of evaluation, the *ex vitro* explants recorded 31 % contamination and 55 % phenolization after 10 days of inoculation; therefore, the *ex vitro* material was not sufficient for the callogenic structure formation assay and the decision was made to use *in vitro* material. Furthermore, *in vitro* explants exhibited a 71.33% callus formation rate with an average of 24 roots per explant; in *ex vitro* explants, a 26.67% callus formation rate with an average of 13 roots per explant was observed. Finally, in the disinfection phase of *ex vitro* explants of *Cinchona officinalis* L., treatment 3 with 20 % NaClO showed an effective control of contamination, considering its optimization during the initial phase of tissue implantation. As a result, when evaluating callogenic structures in *ex vitro* and *in vitro* explants, the combination of auxins and cytokines which produced the highest percentage was a combination of 10 mg/L ANA and 0.5 mg/L KIN during 90 days of evaluation.

Key words: Quina, forest biotechnology, disinfection, auxin-cytokinin, Murashige and Skoog.

3. Introducción

El Ecuador es un país megadiverso, que presenta una gran variabilidad de especies de fauna y flora, gracias a la combinación de diversos factores tanto astronómicos, geológicos, biogeográficos, ecológicos y evolutivos en todas sus regiones (Burneo, 2009). Uno de los principales factores es la presencia de la cordillera de los Andes en el Ecuador, la cual tiene influencia directa a lo largo de la región central de todo el país, dando como resultado una gran variedad de pisos altitudinales y ecosistemas, que al acoplarse con los vientos alisios y las corrientes frías y cálidas, dan origen a la presencia de una gran biodiversidad que alberga el 7,6 % a nivel mundial (4 500 especies endémicas en las cuatro regiones del Ecuador) (León-Yáñez et ál., 2019).

Dentro de esta riqueza biológica, la presencia de especies endémicas y emblemáticas como *Cinchona officinalis* L., conocida generalmente como cascarilla, quina o polvos de la condesa, es una especie endémica de la provincia de Loja, que se distribuye desde la zona tropical y hasta la ecuatorial, en un rango altitudinal que va desde los 700 a 2 900 m s.n.m. (Garmendia, 2005). Esta especie es conocida por sus propiedades medicinales presentes en la corteza y raíz, debido a que poseen un alto contenido de alcaloides, entre los que se destacan la quinina, quinidina dihidroquinina, dihidroquinidina, las cuales fueron utilizadas para tratar la malaria y el paludismo en los siglos XVII y XIX (Medina et al., 2022); sin embargo, estas propiedades han llevado a una extracción masiva de la especie en su hábitat natural, superando los tiempos de regeneración. Esto ha resultado en que los individuos de la especie se encuentren dispersos en pequeños fragmentos o relictos boscosos, así como en áreas de pendientes pronunciadas o degradadas en la actualidad, estos cambios se deben principalmente a factores como la expansión de la frontera agrícola, crecimiento urbanístico e infraestructura y los incendios forestales (López, 2016).

Pese a estos antecedentes, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [UICN], *C. officinalis* no consta en la lista de especies en peligro de extinción; sin embargo, por su importancia histórica a nivel de la provincia de Loja las poblaciones han sido severamente explotadas, y por tanto se encuentra amenazada en su hábitat natural (Huamán et al., 2019). Otro aspecto importante a resaltar es que *C. officinalis* en su hábitat natural, tiene un crecimiento lento (González et ál., 2018) y una tasa de germinación reducida al propagarse mediante semillas (41,1 a 74,4 %) (Lima et al., 2018); siendo, el viento el principal medio de dispersión y las aves su agente polinizador (Caraguay et al., 2016).

Con lo cual, frente a esta problemática de la baja tasa de propagación de *C. officinalis* por métodos tradicionales, diversos estudios realizados en la provincia de Loja han abordado esta alternativa a nivel de laboratorio. Por ejemplo, Guartanza (2019) ha investigado la implantación de tejidos a partir de plántulas que se desarrollan en invernadero; mientras, que otros estudios han abordado la inducción de estructuras callogénicas tanto *ex vitro* como *in vitro* (Camacho, 2023; Rueda, 2020). Estos trabajos previos señalan la relevancia y la viabilidad de la aplicación de la biotecnología vegetal, específicamente la micropropagación mediante técnicas de cultivo *in vitro*, como una solución alternativa para aumentar la tasa de multiplicación de *C. officinalis*, ofreciendo plántulas libres de plagas y enfermedades producidas en condiciones controladas y en un tiempo reducido (Castillo, 2004).

Finalmente, cabe mencionar que la presente investigación formó parte del Proyecto de Investigación titulado: “**Procesos biotecnológicos e influencia del fotoperiodo en la formación de estructuras callogénicas y organogénesis *de novo*, a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L.**”, periodo 2021 – 2023; el cual, se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, con el propósito de generar información científica en la reinserción de la cascarilla en el hábitat natural, planteándose los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Contribuir a la generación de información científica, para la implantación de tejidos provenientes del invernadero e inducción de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L.

Objetivos específicos:

- Evaluar la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de plántulas *ex vitro*, durante la fase de implantación de los tejidos.
- Determinar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* o vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad.
- 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*

La cascarilla *C. officinalis* es una especie de gran importancia tanto en el campo forestal como medicinal; puesto que, fue considerada como “Árbol de la vida” por sus propiedades curativas contenidas en la corteza (Madsen, 2002). Desde el descubrimiento de las propiedades medicinales de esta especie se ha venido utilizando para contrarrestar los efectos de la malaria y el paludismo (Aymard, 2019). La provincia de Loja fue pionera en dar a conocer el género *Cinchona* y se considera que su origen se encuentra en el nudo de Cajanuma, esta área se convirtió en un centro de alta producción para tratar el paludismo (Tapia, 2013).

Según Camacho (2023), se plantea que alrededor de 24 especies del género *Cinchona* pertenecen a *C. officinalis* de las 40 reconocidas, alcanzando un rango desde 15 a 20 m de altura las plantas adultas, sus flores son de color rosa, blanco o amarillo logrando alcanzar hasta 40 cm de diámetro, la copa es globosa irregular. Se ha determinado que aproximadamente el 60 % de la corteza extraída es dedicada a la producción de medicamentos y en menores proporciones en la industria de alimentos y bebidas; los cuales, son comercializados en mercados europeos (Ulloa, 2006). El género se lo puede encontrar en la zona tropical y ecuatorial de la cordillera andina, esto desde los 12° en latitud norte hasta los 20° en latitud sur, el rango altitudinal donde se encuentra este género es de entre los 700 hasta 2 900 m s.n.m. (Garmendia, 2005; Pucha et al., 2020).

4.2. Descripción taxonómica de *Cinchona officinalis* L.

La descripción taxonómica de *C. officinalis* según Zevallos, (1989) se enmarca:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiácea

Género: *Cinchona*

Especie: *officinalis*

Nombre científico: *Cinchona officinalis* L.

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

C. officinalis es un árbol que puede alcanzar una altura de 15 a 20 m, con diámetros que varían entre 30 y 40 cm, la copa de esta especie es densa, globosa e irregular, debido a sus ramificaciones simpodiales y presenta un fuste cilíndrico. Las hojas son de forma elíptica ovalada, con variaciones a lanceoladas, pueden llegar a medir 27 cm de largo y de ancho de 7 a 18 cm con un borde entero. La corteza se manifiesta con algunas fisuras, siendo de color café oscuro y se desprende cierto porcentaje según temporada del año. Las flores se exponen en panículas terminales con pubescencias, son actinomorfas y sus pétalos fundidos (Guamán, 2014). Los frutos color café oscuro miden de 0,8 a 2,5 cm de largo y de 0,4 a 0,8 cm de ancho de tipo capsula dehiscente elipsoide, dentro de esta se pueden encontrar alrededor de 90 semillas, la cual presenta tricomas en tonos blancos y tiene consistencia leñosa (Rodrigues et al., 2014; Romero, 2015). Las semillas de esta especie son fusiformes, presentan una testa suave y presencia de alas, que con facilidad tienden a romperse de forma sencilla, son de tamaño muy reducido con largo promedio de 5,01 mm y 2,46 mm de ancho (Marcelo-Bazán et al., 2022; Romero, 2015) (Figura 1).

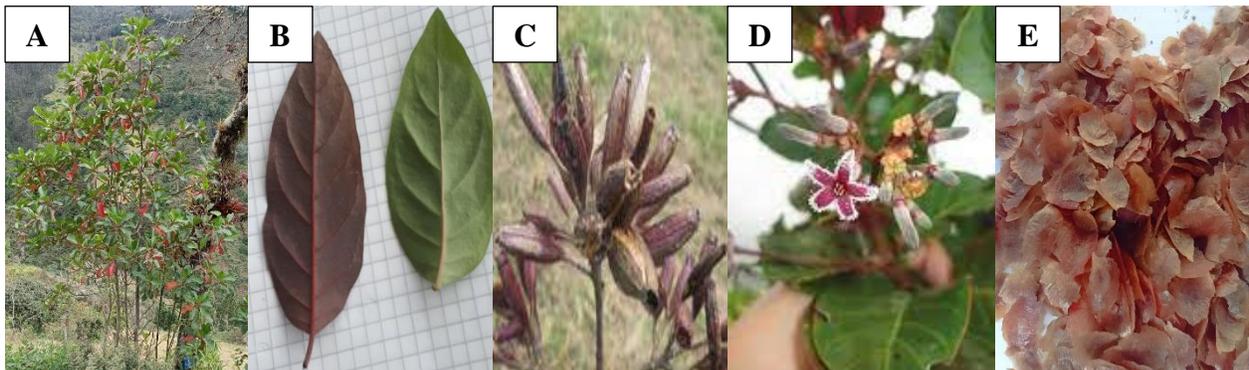


Figura 1. A) Árbol de *C. officinalis*; B) Hojas de *C. officinalis*; C) Frutos de *C. officinalis*; D) Flores de *C. officinalis*; y E) Semillas de *C. officinalis*.

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

La especie es nativa de los valles interandinos de Sudamérica, las poblaciones de *C. officinalis* se pueden encontrar en un rango altitudinal entre los 700 y 2 900 m s.n.m. es propia del valle de Loja, convirtiéndose en una especie emblemática de la provincia; sin embargo, se ha evidenciado presencia de esta en diferentes provincias como Chimborazo, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Bolívar, Azuay y Cañar (Guamán, 2014).

4.4. Importancia de *Cinchona officinalis* L.

C. officinalis es una especie endémica de los bosques nublados andinos, contribuye con la regulación de los ciclos biológicos y otorga un alto valor, en cuanto a calidad ambiental en los bosques que se evidencie presencia de la misma (Garmendia, 2005). Por otro lado, la especie destaca en el campo de la medicina por su alto contenido de quinina en la corteza, empleada en medicamentos farmacéuticos y alternativos preparados naturalmente; por ende, su sobreexplotación aumento (Muñoz, 2021).

4.5. Utilización de *Cinchona officinalis* L.

Principalmente destaca por el uso medicinal a lo largo de la historia por contener quinina en la corteza, también como tónico medicinal andino y para realizar cócteles (Ulloa, 2006). Otro uso empleando *C. officinalis* es su madera ya sea para postes, leña, vigas e inclusive carbón y de igual forma para curar neumonías, se deriva el hecho de que es empleado como tónico capilar para reducir la caída del cabello, combate los calambres y ayuda a regular el ritmo cardiaco (Galeano, 2009; Feijoó et al., 2019).

En la industria de alimentos es empleada como agua tónica “gin tonic” teniendo mayor apertura en el mercado europeo, según Ulloa (2006) para la elaboración de cocteles al mezclar con agua tónica aporta un sabor amargo y único.

4.6. Características de la biotecnología vegetal

La biotecnología es la ciencia aplicada al incremento de ventajas competitivas e innovadoras actuales en organismos vivos para obtener productos mejorados. Comprende diversos conocimientos en bioquímica, agronomía, biología celular y genética; obteniendo productos resistentes tanto a hongos como condiciones climáticas (Gutiérrez-Mora, 2021). Esta técnica ha incrementado en los últimos años por la producción a gran escala y en espacios reducidos, por ello, constituye una herramienta de suma importancia para procesos productivos, debido a la obtención de plántulas mejoradas y variedades adaptables a condiciones adversas tanto de suelo como climáticas (García et al., 2004; Duque, 2010).

Las grandes industrias cuentan con el respectivo asesoramiento y apoyo tanto de organismos públicos y privados dentro de este campo de investigación; dado que, de esta forma

logran aumentar la productividad y contribuyen al desarrollo de especies seleccionadas e implementadas en bosques naturales para protección o conservación (García et al., 2004).

4.7. Métodos de propagación *in vivo*

4.7.1. *Propagación sexual por semilla*

El órgano que permite la propagación de una especie es la semilla, logrando que el nuevo individuo se establezca con éxito y vigor en el tiempo y espacio. Se debe tomar en cuenta los diversos factores externos (favorables y no favorables) como el suelo, clima, competencia, depredación, entre otros. Las condiciones y sustancias que se encuentran en las semillas son primordiales para lograr establecer con éxito la plántula hasta que esta pueda realizar las funciones y convertirse en autótrofa (Osuna et al., 2016). Se establecen tres métodos de siembra directa como al voleo, surcos y hoyos (Petit et al., 2005).

4.7.2. *Multiplicación vegetativa o asexual*

Esta técnica consiste en adquirir plántulas con la misma genética de la planta madre. Con ello, incrementar la producción de forma natural, a través de los tejidos del progenitor o planta madre (Osuna et al., 2016). En este tipo de propagación es indispensable contar con ciertas características para obtener excelentes resultados como es la calidad del material siendo el punto de partida clave del cual dependerá el resto del proceso productivo (Reyes, 2015), las formas más usadas en esta técnica son: por secciones de tallo, rizomas y por plántulas (Takahashi y del Bambú—PERUBAMBU, 2006).

4.8. Métodos de propagación *in vitro*

4.8.1. *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*

A través de este método se obtendrá plantas en un medio artificial, las cuales estarán contenidas en un frasco de vidrio y su fuente de alimento suplementada, en este ambiente la asepsia es una característica primordial para evitar la contaminación y muerte de la planta; ya sea, por hongos o bacterias y se debe tener un estricto control de los factores que pueden afectar su crecimiento, como el fotoperiodo (Castillo, 2004; Pierik 1990). Desde otra perspectiva, Miguel-Luna et al. (2022) afirman que la totipotencia presente en las células juega un papel fundamental para lograr reproducir bajo estas circunstancias y tener éxito con las nuevas plántulas.

La micropropagación es una técnica *in vitro* cada día más frecuente para replicar de forma asexual plantas a partir de un explante del progenitor y con ellos las plántulas se obtendrán en menor tiempo y espacio y se denominan clones de la planta madre (Vertedor et al., 2017).

La micropropagación es una de las aplicaciones más amplias del cultivo *in vitro*; donde, a partir de una parte de la planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas idénticas genéticamente que también se las denomina clones. Para este tipo de cultivos se puede utilizar las hojas, tallos, semillas y principalmente las yemas vegetativas que contienen mayor número de células para ser reproducidas (Castillo, 2004).

Esta técnica es aplicada tanto para cultivos como especies leñosas, de manera más frecuente es especies de importancia económica para la agricultura y especies en amenazadas por factores naturales o antrópicos, la producción bajo este método es masiva en menor tiempo y espacio. En los últimos años las especies hortícolas, aromáticas, medicinales y forestales son las más representativas en propagarse por este medio (Segretín, 2006).

4.8.1.1. Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

Se presenta en la Tabla 1 las ventajas y desventajas del cultivo *in vitro* basada en Segretín (2006); Rodrigues (2014) y Solbrig (2004):

Tabla 1. Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*.

Ventajas	Desventajas
Plantas en tiempo y espacio reducido	Suministros y mantenimiento elevados
Se mantiene control de las condiciones ambientales	Perdidas masivas por condiciones no adecuadas
Los nuevos individuos crecerán idénticos a la planta madre	Mantener personal profesional
El transporte de estos individuos será más sencillo	Se puede tener pérdidas en los reactivos y materiales
Transferir genes	

4.9. Medio de cultivo

El medio de cultivo es el resultado de la mezcla de nutrientes sólidos o líquidos, adicionalmente agua y vitaminas, sales inorgánicas, aminoácidos y carbohidratos según sea el objetivo. También, denominado medio basal; al cual, se puede adicionar auxinas y citoquininas ya sea combinadas o por separado que ayudan con la elongación de los tejidos (Ochoa, 2014). La

funcionalidad del medio de cultivo es proporcionarle a la planta estabilidad a través del sustrato y como su única fuente de energía para lograr el correcto desarrollo de los tejidos (Suarez, 2020).

El cultivo de células y tejidos vegetales es menos exigente en sus medios nutricionales, siendo más sencillos que los microbianos, ya que son formulados de manera empírica (Rosales et al., 2006). Son el resultado de una combinación de sales minerales, vitaminas, auxinas, cotocininas, agua, sacarosa y agar; sin embargo, los suplementos dependerán del objetivo, de la especie y la etapa en la que se encuentre el proceso (Castillo, 2004).

Los medios de cultivos se pueden encontrar en diferentes estados según sea el requerimiento, como semisólidos sin la adición de elementos termolábiles, también en estado líquido, haciendo uso de un caballete para dar soporte al tejido o semilla y finalmente semisólidos en el cual se agregó algún tipo de sustancias termolábiles para llegar a ese estado (Roca y Mroginski, 1991).

4.9.1. Sales minerales para el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS-1962)

Las sales minerales que componen el medio de cultivo están divididas en dos grandes grupos; macro y micro nutrientes como los nitratos, sulfatos, haloides, fosfato di básico de potasio, ácido etildiaminotetraacético, entre otros (Tabla 2). Las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) presentan dosis exactas para su medio de cultivo, también se lo conoce como medio MS.

Tabla 2. Composición química del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS-1962).

N°	Solución madre	Componentes	Concentración (mg/L)
1	Nitratos	Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1 650,00
		Nitrato de potasio (NO_3K)	1 900,00
		Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370,00
2	Sulfatos	Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22,3
		Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	8,60
		Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025
		Cloruro de potasio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440,00
3	Haloides	Yoduro de potasio (KI)	0,83
		Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025
4	P, B, Mo	Fosfato di básico de potasio ($\text{KH}_2 \cdot \text{PO}_4$)	170,00

N°	Solución madre	Componentes	Concentración (mg/L)
		Ácido bórico ($H_3 \cdot BO_3$)	6,20
		Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,25
5	Na, Fe, EDTA	Sulfato ferroso ($FaSO_4 \cdot 7H_2O$)	27,81
		Ácido Etildiaminotetraacético (Na_2EDTA)	37,31

4.10. Vitaminas

Las vitaminas son parte fundamental en el cultivo *in vitro* de las plantas; ya que, en el estado natural, estas se encuentran en el suelo y las plantas las absorben para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Para el correcto inicio del desarrollo del tejido *in vitro* se debe suplementar el medio de cultivo con las vitaminas adecuadas y agregar otras sustancias en extractos para asegurar el éxito. En la actualidad, las vitaminas son adicionadas de manera individual y en cantidades precisas (Suarez, 2020). Algunas de las vitaminas más utilizadas en el cultivo *in vitro* son:

La tiamina (vitamina B1) actúa en el ciclo de Krebs como cofactor y por lo general está en la mayoría de los medios de cultivos ensayados.

El ácido nicotínico (Niacina o Vitamina B3) participa en reacciones activadas por la luz; debido a que, es un componente de las enzimas a pesar de ellos, su uso es más reducido en comparación con la tiamina.

El mio-inositol es una vitamina complementaria del complejo B, utilizada para estimular el crecimiento de los tejidos y siempre está presente en los medios de cultivo; sin embargo, se ha comprobado que en su ausencia el desarrollo del tejido es mejor.

El ácido ascórbico (Vitamina C) se emplea como antioxidante para controlar la liberación de fenoles de los tejidos para cultivo *in vitro*, dependiendo de la especie.

Estas vitaminas son esenciales para el desarrollo adecuado de los cultivos de tejidos; puesto que, al no poder obtenerlas directamente del ambiente, son agregadas a los medios de cultivo para asegurar el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas en el laboratorio (Suarez, 2020).

4.11. Auxinas

Son reguladores de crecimiento que ayudan con la estimulación para el crecimiento, división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de callos; posteriormente la inducción de raíces adventicias y culmina con la formación de embriones somáticos. Las plantas en su estado

natural producen el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los cuales son sintetizados en el ápice foliar de la planta y se desplazan hacia la parte radical (Suarez, 2020).

A nivel de laboratorio los compuestos que reemplazan a las auxinas naturales es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y picloram.

Entre los compuestos similares a las auxinas a nivel del laboratorio, están ANA, el 2,4-D, y el picloram. Los más utilizados son el AIB y el ANA en la micropropagación *in vitro* de meristemas y organogénesis. El 2,4-D y el picloram tienden a presentar efectos mayores, por lo que son utilizados en la inducción de tejidos embriogénicos. El AIA por su facilidad para ser degradado enzimáticamente es menos utilizado (Suarez, 2020).

4.12. Citoquininas

Las citoquininas estimulan la división celular y promueven el desarrollo de yemas axilares, son sintetizadas en diferentes partes de la planta como raíces, flores, hojas jóvenes y principalmente en los ápices, trasladándose a las yemas apicales y axilares (Borjas-Ventura et al., 2020). De forma natural se encuentra la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) que son sintetizadas por la planta; por consiguiente, a nivel comercial y de laboratorio se sustituyen por benzilaminopurina (BAP o BA), kinetina y tidiazuron (TDZ) (Suarez, 2020). El compuesto más utilizado es BA en cultivo *in vitro*, especialmente en la multiplicación de meristemas preexistentes y organogénesis; también, se debe considerar que los efectos dependen mayormente del tipo de citoquinina empleada y la especie a multiplicar (Suárez et al., 2013).

4.13. Fases de la micropropagación *in vitro*

Según Castillo (2004) propone el orden de las fases como de observa en la tabla 3:

Tabla 3. Fases de la micropropagación *in vitro*.

Número de fase	Tipo de fase
Fase 0	Preparación de la planta madre
Fase 1	Desinfección del material vegetal
Fase 2	Introducción del material <i>in vitro</i>
Fase 3	Multiplicación de brotes
Fase 4	Elección de un medio de cultivo para enraizamiento de los explantes
Fase 5	Aclimatación de los explantes

4.13.1. Preparación de la planta madre

Es fundamental obtener explantes con un nivel de desarrollo nutricional adecuado antes de establecer el cultivo en condiciones de asepsia. Para mejores resultados se debe mantener la planta madre bajo los respectivos cuidados en invernadero, por un tiempo mayor a una semana, según las condiciones en que se encuentra y como será tratadas por productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos particularmente los hongos para obtener una planta vigorosa y libre de enfermedades y proceder con la inoculación (Castillo, 2004).

4.13.2. Desinfección del material vegetal

La desinfección de explantes en el laboratorio es un paso fundamental en la propagación *in vitro* de especies vegetales. Este proceso busca eliminar microorganismos y contaminantes presentes en la superficie de los explantes para asegurar un cultivo limpio y libre de patógenos (Castillo, 2004). Los explantes pueden ser segmentos de hojas, brotes, yemas o meristemos apicales en los cuales se realizan enjuagues con alcohol etílico al 70 % y se sumergen por un tiempo determinado en solución de hipoclorito de sodio al 1 – 2 % (blanqueador comercial sin aditivos ni fragancias) y se enjuaga en agua destilada o estéril.

Es importante que este proceso de desinfección se realice en un espacio libre de gérmenes y en una cámara de flujo laminar para disminuir el nivel de contaminación. Además, la concentración y tiempo de exposición a los agentes desinfectantes pueden variar dependiendo de las características específicas de los explantes y las condiciones del laboratorio (Castillo, 2004).

4.13.3. Introducción del material *in vitro*

Los explantes desinfectados se colocan en un medio de cultivo *in vitro* que contiene nutrientes y hormonas vegetales específicas. Este medio proporciona los nutrientes y las condiciones adecuadas para que los explantes crezcan y se multipliquen.

Multiplicación o brotación: Los explantes se dividen y subcultivan en medios frescos para promover la multiplicación y crecimiento.

Enraizamiento: Los brotes generados en la fase de multiplicación dependiendo del caso deben ser inducidos a enraizar para desarrollar sistemas radiculares sanos.

Aclimatación: Finalmente, las plántulas desarrolladas en el cultivo *in vitro* se transfieren a condiciones *ex vitro* (fuera del ambiente de laboratorio) para aclimatarse a las condiciones naturales.

La micropropagación se utiliza extensamente en la multiplicación de plantas ornamentales, cultivos agrícolas, especies herbáceas o leñosas en peligro de extinción y en general a mejorar la genética de múltiples plantas. Es una técnica útil para mantener la uniformidad y la calidad genética de las plantas obtenidas, lo que contribuye a la conservación y propagación de especies importantes para la agricultura y la conservación de la biodiversidad (Castillo, 2004).

4.13.4. Multiplicación de brotes

Posterior a la fase 1 y 2 donde se originaron brotes con presencia de hojas, se identifica la yema axilares o adventicias para ser colocada en un nuevo medio de cultivos. Para subcultivar los brotes se debe seguir el protocolo manteniendo las condiciones de asepsia, asegurando el mayor número de plántulas en cada repique. Es importante tener claro que el resultado en el número de plantas a obtener varía según la especie vegetal y los suplementos adicionados al medio de cultivo basal (Castillo, 2004).

4.13.5. Elección de un medio de cultivo para enraizamiento de los explantes

Para dar paso al enraizamiento en explantes, se los subdivide en plántulas individuales con un tamaño considerable de 2 centímetros; por lo tanto, los brotes obtenidos en la fase anterior son transferidos a un nuevo medio de cultivo basal, sin ningún tipo de regulador de crecimiento o en tal caso solo debe contener hormonas de tipo auxinas (Andrade et al., 2021). Debe señalarse que algunas especies tienen brotamiento de raíces en el medio de cultivo suplementado y no deben pasar por esta fase (Castillo, 2004).

4.13.6. Aclimatación de los explantes

Los explantes enraizados que se vienen desarrollando en el laboratorio bajo un ambiente controlado, con la humedad relativa alta y generalmente poseen estomas son susceptibles a los cambios ambientales y con ellos se enfrentan a diversas alteraciones como la capacidad fotosintética y el tipo sustrato, de este paso dependerá el éxito o fracaso de la supervivencia de la planta; sin embargo, al atravesar estos cambios las plántulas se adaptarán a vivir en condiciones naturales y posteriormente ser llevadas a campo (Castillo, 2004). Para asegurar la aclimatación de las plántulas es indispensable que cuenten con una buena cantidad de hojas y las raíces tengan un tamaño considerable; en este sentido el ambiente del invernadero juega un papel fundamental en su adaptación controlando la humedad relativa; cabe considerar, que llevar un control de las condiciones en este medio son mínimas y limitadas (Campos et al., 2020).

4.14. Callo

Es la formación de una masa amorfa de células indiferenciadas que permite la multiplicación del material vegetal, tomando en cuenta las condiciones asépticas tanto del ambiente como de los recipientes para controlar los niveles de contaminación y lograr de forma exitosa la inducción de estructuras callogénicas a para obtener a partir de explante un mayor número de individuos, también aplicando el mejoramiento genético (Suarez, 2020). Esta inducción se la puede realizar en varias de las especies vegetales; sin embargo, se debe conocer la ecología de la especie que se busca reproducir a través de esta técnica (Laya et al., 1994). Es fundamental llevar a cabo todo el procedimiento para la obtención de callos en un laboratorio con instalaciones adecuadas y aplicando las técnicas asépticas.

Por medio de este tipo de técnicas se logra identificar aspectos específicos como los diferentes comportamientos del material vegetal y los suplementos en el mismo (físico, bioquímico y metabólico) verificando y optimizando las diferentes condiciones. Para continuar con el proceso se debe conocer el comportamiento y tipo de crecimiento para la producción de embriones somáticos a partir de estructuras callogénicas (Lima, 2018).

4.14.1. Cultivo de callos

De acuerdo con González (2018) la formación de una estructura callogénica inicia cuando el tejido fue aislado y por la presencia de alguna auxina incorporada al medio de cultivo, el tejido presenta diferencias como la proliferación continua y acelerada que forma una masa amorfa de células indiferencias. Un callo es el resultado de la división celular masiva con células indiferenciadas impidiendo determinar un orden específico; no obstante, la reacción de los tejidos depende en un alto porcentaje de la planta madre, el genotipo y el medio de cultivo al que este expuesto el explante.

Los callos se han formado utilizando cada parte de una planta e independientemente del tipo de tejido tomado de la planta, es importante tener en cuenta la edad del material vegetal para una mejor respuesta *in vitro*. Solo un porcentaje de las células contenidas en un explante, ayudan a la formación del callo, el comienzo de la proliferación de los callos se sitúa en la superficie. Por lo general, se utilizan tejidos jóvenes; lo que permite un mayor porcentaje de éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes especies consideradas “recalcitrantes”. Tomar de diversas partes de plantas *in vitro*, así como el uso de órganos o fragmentos de órganos ubicados en los frutos o inflorescencias,

han permitido reducir los niveles de contaminación y por ende se sitúa como tendencia actual, para obtener los mejores resultados en cultivos *in vitro* (González, 2018). Una de las características destacadas del callo es el poder totipotente de las células y el control de las condiciones nutricionales, ambientales y hormonales, para la obtención de raíces, brotes y embriones somáticos, dependiendo del balance hormonal aplicado al medio de cultivo (Camacho, 2023).

4.15. Trabajos realizados en biotecnología vegetal con la especie *Cinchona officinalis* L.

En la región sur del Ecuador, específicamente en la provincia de Loja se han desarrollado múltiples estudios a nivel de laboratorio en *C. officinalis* sobre la implantación de tejidos a partir de plántulas que crecen en invernadero (Guartanza, 2019). Consecuentemente, se ha trabajado en inducción de estructuras callogénicas tanto *ex vitro* como *in vitro* (Rueda, 2020; Camacho, 2023).

También, se ha realizado enraizamiento hidropónico e *in vivo* de *Cinchona officinalis* L., a partir de plántulas *ex vitro* (Minga, 2023) y en procesos morfológicos para la inducción de estructuras de *novo*, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperiodo y oscuridad (Camacho, 2023).

5. Metodología

5.1. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, perteneciente a la Universidad Nacional de Loja (Figura 2), el cual, se encuentra ubicado a 3 km en dirección sur del centro de la ciudad de Loja, vía que conduce a Malacatos, entre las coordenadas: Latitud: 04° 00' 00" S y longitud: -79° 12' 00" O (Díaz, 2012).

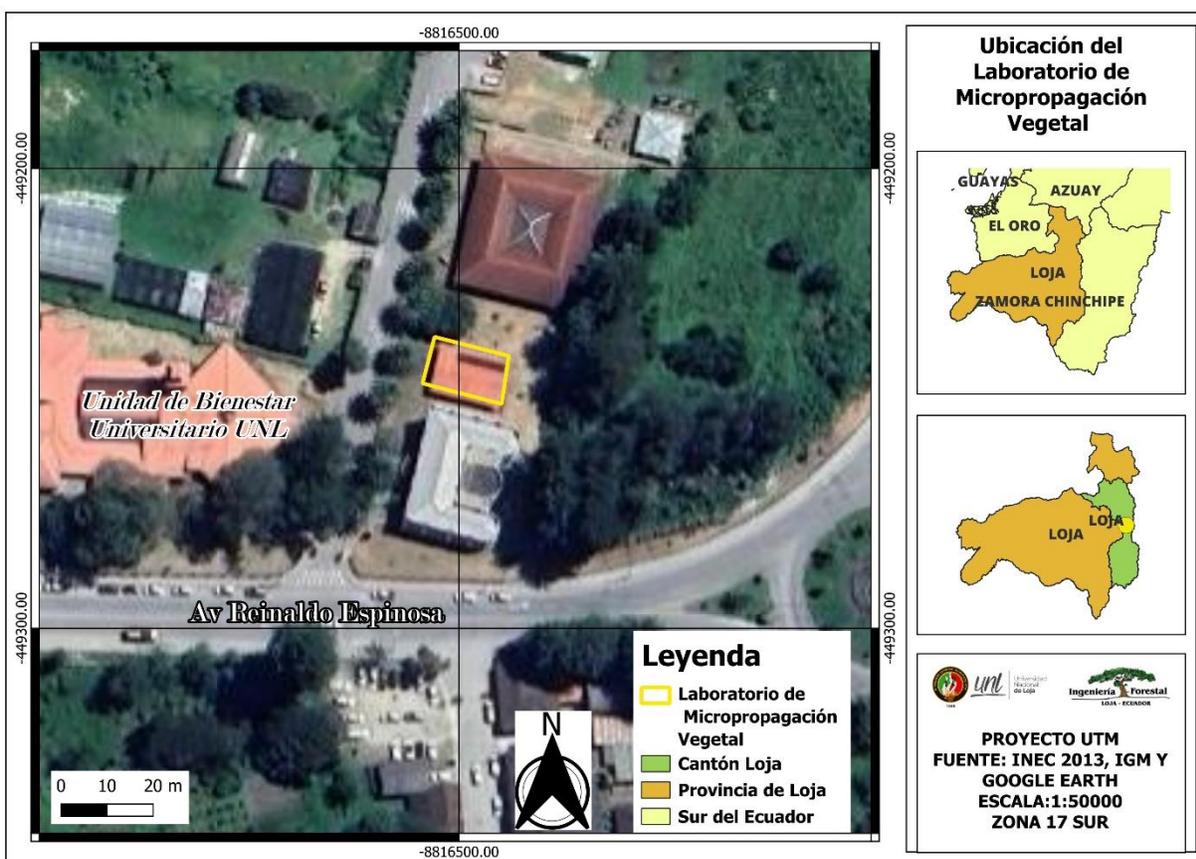


Figura 2. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

5.2. Metodología para evaluar la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de plántulas *ex vitro*, durante la fase de implantación de los tejidos

5.2.1. Colecta de material vegetal

Se seleccionó plántulas *ex vitro* de *C. officinalis*, procedentes del invernadero del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, estas plántulas fueron tratadas con un fungicida (Benomil 2,0 g/L) y un bactericida (Kasumin 1,0 g/L), durante un período de 30 días antes de la

colecta del material vegetal. El intervalo de aplicación de estos tratamientos fue de 8 días. El propósito de estos tratamientos fue reducirla contaminación endógena y exógena antes de la inoculación en condiciones de laboratorio.

Posteriormente, de las plántulas seleccionadas se colectaron las hojas jóvenes, las cuales fueron obtenidas con la ayuda de tijeras, y luego colocadas en un recipiente con agua destilada y jugo de limón. Esto con la finalidad de generar una cámara húmeda y evitar la deshidratación de los tejidos, previo a su traslado hacia el laboratorio (Figura 3).



Figura 3. Preparación y colecta del material vegetal: A) Aplicación del fungicida (Benomil 2,0 g L⁻¹) y bactericida (Kasumin 1,0 g L⁻¹); B) Colecta de hojas jóvenes; C) Cámara húmeda.

5.2.2. *Desinfección de material vegetal*

Una vez recolectado el material vegetal, se procedió a la desinfección de los explantes en la cámara de flujo laminar. Para ello, se realizó el lavado de las hojas en una solución de agua corriente más detergente, con la finalidad de retirar los residuos de tierra. Además, los explantes fueron sumergidos en una solución fungicida de 2,0 g/L de Benomil por un tiempo de 30 minutos; luego, se enjuagaron los explantes con agua destilada a fin de retirar residuos de la solución. Finalmente, los explantes se sumergieron por 5 minutos en una solución antioxidante, preparada en 250 mg/L de ácido ascórbico más 200 mg/L de ácido cítrico, para evitar la oxidación fenólica.

Posteriormente, se realizó un enjuague con alcohol al 70 %, en la cámara de flujo laminar donde se aplicaron diversas concentraciones de la solución desinfectante compuesta de hipoclorito de sodio (NaClO), por un tiempo de 10 minutos (Tabla 4); finalmente, la solución desinfectante fue eliminada mediante 2 a 3 aclareos, con agua destilada estéril enriquecido con 250 mg/L de ácido ascórbico más 200 mg/L de ácido cítrico (Figura 4).

Tabla 4. Tratamiento para la desinfección de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro*, para la implantación de los tejidos.

Tratamiento	T1	T2	T3	T4
Concentración del desinfectante NaClO (%)	10,00	15,00	20,00	25,00
Tiempo de inmersión (minutos)	10	10	10	10
Simbología	C1	C2	C3	C4

Leyenda: C = Concentración del NaClO.

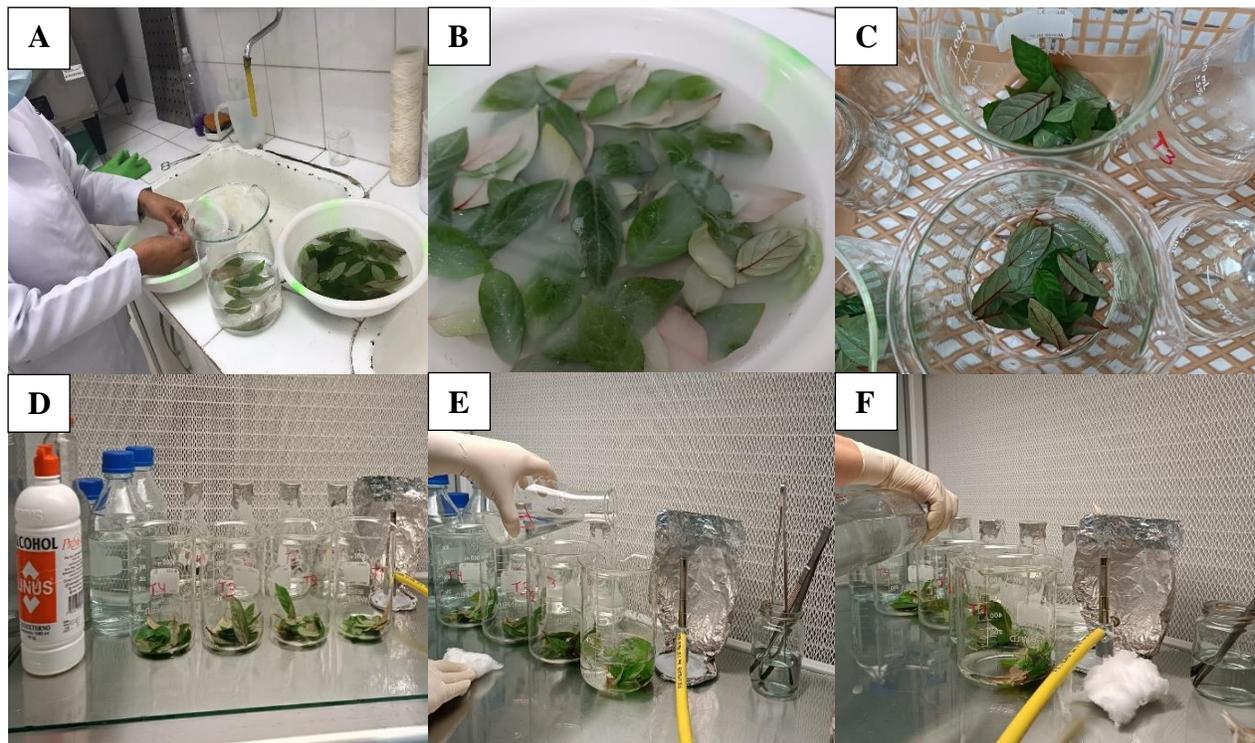


Figura 4. Desinfección del material vegetal: A) Lavado de hojas con agua corriente más detergente; B) Explantes sumergidos en solución fungicida; C) Explantes en solución antioxidante; D) Enjuague con alcohol al 90 %; E) Aplicación de diferentes concentraciones de NaClO; y, F) Aclareos para retirar residuos.

5.2.3. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal, se constituyó por las sales minerales Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con vitaminas B5 (Tiamina 1,0 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, piridoxina 1,0 mg/L, ácido nicotínico 2,0 mg/L); sacarosa 2 %; agar 0,6 %; ácido ascórbico 200 mg/L y ácido cítrico 250 mg/L; cisteína 50 mg. El medio de cultivo se vertió en frascos tipo compota, a razón de 20 ml por frasco (Figura 5).

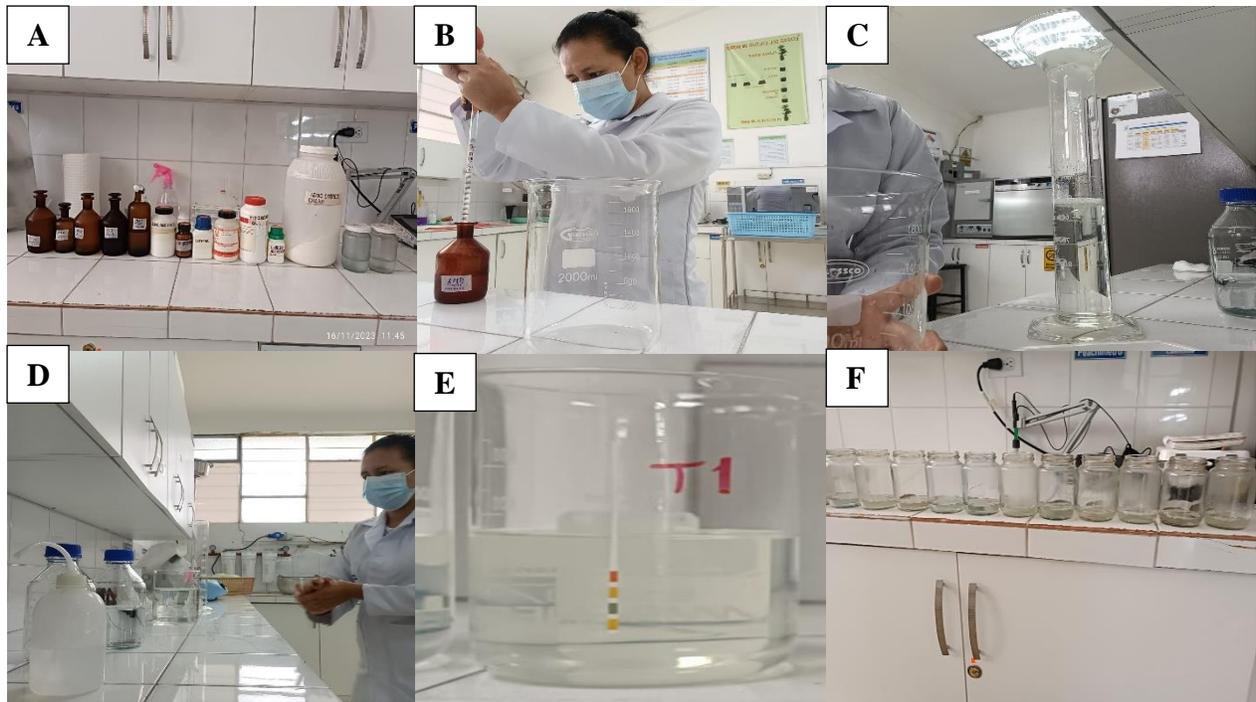


Figura 5. Preparación del medio de cultivo de MS (1962): A) Macro y micronutrientes; B) Medición de las soluciones madre; C) Depuración del medio basal; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 20 ml por cada frasco.

5.2.4. *Aislamiento, inoculación e incubación in vitro de los explantes*

En la cámara de flujo laminar, se realizó el aislamiento de los explantes en una caja petri con la ayuda del bisturí, cortando un segmento central de la hoja en la base del pecíolo de un tamaño de aproximadamente de 1 cm², de acuerdo al esquema presentado en la Figura 6.

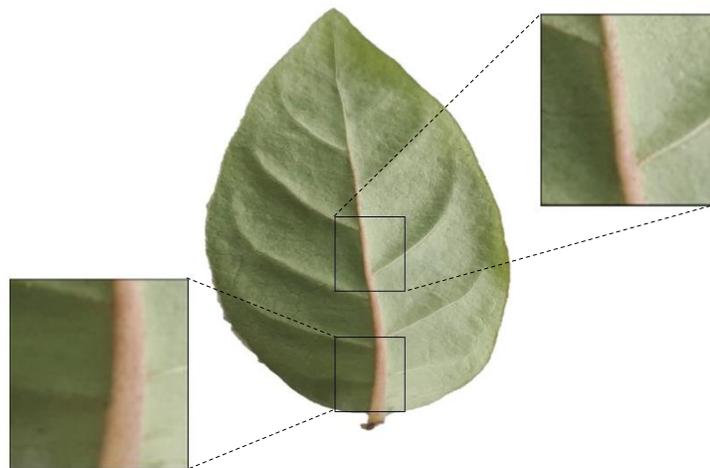


Figura 6. Aislamiento del tipo de explantes, a obtener de la hoja de *Cinchona officinalis* L.

Para la inoculación *in vitro* de los explantes de *C. officinalis* se colocó 2 explantes por frasco dentro de la cámara de flujo laminar con el envés en contacto con el medio de cultivo basal de MS (1962). Los explantes inoculados fueron llevados al cuarto de incubación, donde permanecieron durante 45 días a una temperatura de ± 23 °C, y oscuridad total (Figura 7).

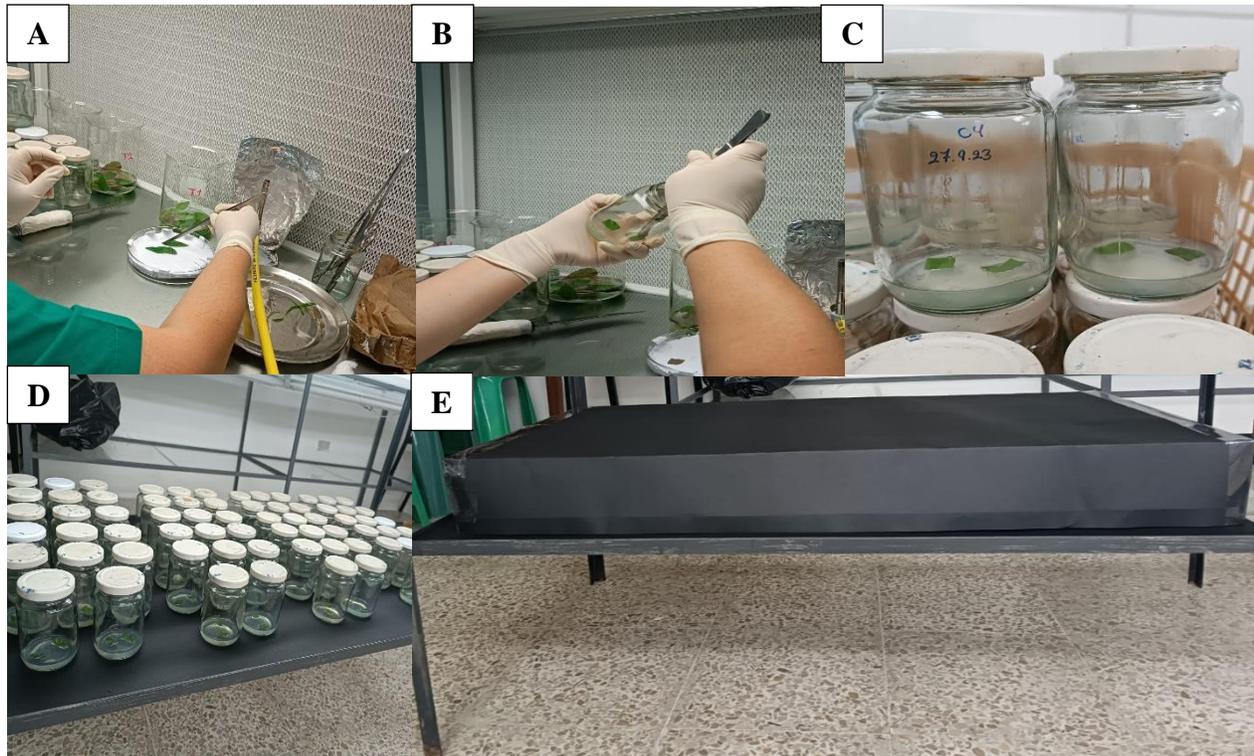


Figura 7. Aislamiento, inoculación e incubación *in vitro* de los explantes A) Corte en las hojas para obtener los explantes; B) Implantación de los tejidos; C) Etiquetación de los frascos por tratamiento y repetición; D) Distribución espacial de los frascos en el cuarto de luces; y, E) Ensayo cubierto con cartulina para generar cámara oscura.

5.2.5. Diseño experimental

Para determinar el efecto de los tratamientos probados en la desinfección de los explantes de *C. officinalis* durante la fase de implantación de los tejidos, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones, usando hipoclorito de sodio (NaClO), en 4 concentraciones con un tiempo de inmersión constante de 10 minutos.

5.2.5.1. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental utilizada fue un frasco, siendo inoculados 2 explantes por cada frasco de vidrio. Cada tratamiento experimental consistió en un total de 30 explantes, distribuidos equitativamente en 60 frascos de vidrio, por lo tanto, se utilizaron un total de 120 explantes en el

ensayo. Esta distribución permitió garantizar la replicación adecuada de los tratamientos y asegurar la robustez de los resultados obtenidos en el estudio. La Tabla 5 presenta un resumen de la distribución de los explantes y los frascos de vidrio utilizados en el ensayo experimental.

Tabla 5. Especificaciones del Diseño experimental, para la evaluar la desinfección de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del invernadero, en la implantación de los tejidos.

Especificaciones	Muestra
Unidad experimental	Frasco
Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	3
Número de frascos por repetición	5
Número de unidades experimentales por tratamiento	15
Número de explantes por frasco de vidrio	2
Número total de explante/tratamiento	30
Número total de explantes ensayo	120
Número total de frascos de vidrio	60

5.2.5.2. Factores y niveles

Los factores y niveles evaluados como las concentraciones de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión de los explantes a inocular se detallan en la tabla 6. (Camacho, 2023; Correa, 2024)

Tabla 6. Factores y niveles de concentración de hipoclorito de sodio, para la inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro*.

Factores	Niveles	%
Nivel de concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO)	1	10,0
	2	15,0
	3	20,0
	4	25,0
Tiempo de inmersión (min)	10	min

5.2.5.3. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones

Para llevar a cabo la evaluación de la contaminación de explantes, se realizó la distribución de los tratamientos y repeticiones de las unidades experimentales, mismos que fueron organizados

en el cuarto de incubación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal. En la Tabla 7 se detalla la disposición de los tratamientos y las repeticiones dentro del cuarto de incubación, proporcionando una referencia clara sobre la organización de los diferentes grupos experimentales. Este proceso de distribución garantizó condiciones uniformes para el desarrollo de los explantes y la adecuada observación de cualquier indicio de contaminación durante el curso del ensayo.

Tabla 7. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar la desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes del invernadero.

C1 (T1)			C2 (T2)		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
C3 (T3)			C4 (T4)		
R1	R2	R3	R1	R2	R3

Leyenda: T: Tratamiento; C: Concentración NaOCl; R: Repetición

5.2.6. Variables evaluadas

La evaluación de las variables, se realizó mediante observación directa cada 5 días, por el lapso de tiempo de 45 días después de realizada la inoculación *in vitro* de los explantes. Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- Número de explantes contaminados
- Número de explantes oxidados
- Número de días a la contaminación
- Número de días a la oxidación fenólica

Para el registro de los datos sobre el número de explantes contaminados y número de explantes oxidados, se utilizó la siguiente hoja de control (Tabla 8).

Tabla 8. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y oxidados, obtenidos de plántulas *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

Fecha de evaluación:					
Condiciones de incubación:					
N° tratamiento	N° de repetición	N° de frasco	N° explantes	N° explantes contaminados	N° explantes oxidados
Tn	Rn	Fn	Exp 1		
			Exp 2		

Leyenda: Tn= Número de tratamiento; Rn= Número de repetición; Fn= Número de frasco; Exp= Número de explante evaluado.

5.2.7. Identificación de agentes contaminantes

Con el propósito de identificar posibles agentes contaminantes, se procedió a recolectar una muestra alrededor de cada formación presente en los explantes. Estas muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Una vez, que las muestras ingresaron al laboratorio se procedió a subcultivarlas en cajas petri. Tras un período de incubación de aproximadamente 8 días, se tomaron pequeñas muestras de los cultivos en portaobjetos con la finalidad de realizar una observación microscópica y pruebas bioquímicas para la caracterización detallada de hongos y bacterias que pudieran haberse desarrollado dentro de las unidades experimentales (Figura 8).

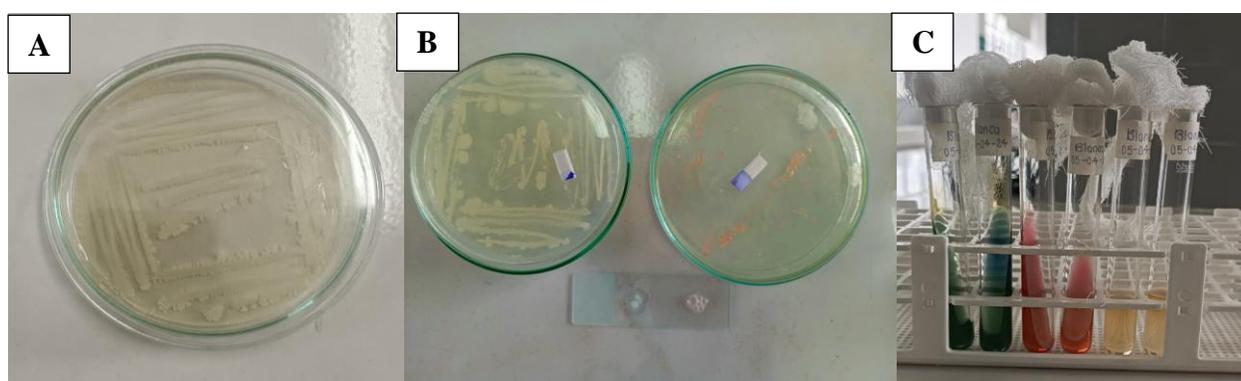


Figura 8. Identificación de hongos y bacterias en explantes de *Cinchona officinalis* L., A) Cultivo de agente contaminante; B) Pruebas catalasa; y C); Pruebas bioquímicas.

5.2.8. Análisis estadístico

Para evaluar la eficacia de los tratamientos empleados en las diferentes variables como la contaminación y fenolización se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05; previo cumplimiento de los requisitos de homocedasticidad de varianza y normalidad de los datos y se aplicó TukeyHSD (Diferencia Mínima Significativa de Tukey), para comparar los niveles entre tratamientos. El análisis estadístico se realizó mediante el software Rstudio 4.2.2 (2023) y Excel.

5.3. Metodología para determinar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* o vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad

Una vez culminado el primer objetivo, se obtuvo resultados preliminares donde se determinó que el mejor tratamiento para replicar y reducir la contaminación fue el T3, consistente en una solución al (20,00 % NaClO); por tanto, se aplicó a todo el material vegetal previo a la inoculación. La aplicación generalizada del tratamiento T3 permitirá asegurar condiciones óptimas para la inoculación del material vegetal, minimizando los riesgos de contaminación y garantizando la integridad y la validez de los resultados en las etapas subsiguientes del experimento.

5.3.1. Desinfección de los explantes

Los explantes de *C. officinalis* inoculados fueron obtenidos de plantas *ex vitro*, que se desarrollan en el invernadero; las cuales, fueron tratadas previamente con la aplicación de un fungicida (Benomil 2,0 g/L) y un bactericida (Kasumin 1,0 g/L), para disminuir las posibilidades de contaminación de los explantes inoculados *in vitro*. Posteriormente, los explantes fueron desinfectados siguiendo la metodología del mejor tratamiento, que resultó con el menor porcentaje de contaminación, probado en el primer objetivo de implantación de los tejidos. En vista de que no se contó con el suficiente material vegetal *ex vitro* de *C. officinalis* se utilizó explantes obtenidos de vitroplantas que se encontraban en el laboratorio disponibles y en condiciones asépticas facilitando el proceso de implantación y asegurando una mayor sobrevivencia de explantes para completar el material vegetal disponible (Figura 9).



Figura 9. Desinfección del material vegetal: A) Aplicación del fungicida-bactericida; B) Colecta de hojas jóvenes; C) Cámara húmeda; D) Explantes en solución fungicida; E) Aplicación de NaClO; y, F) Aclareos para retirar residuos.

5.3.2. Aislamiento, inoculación e incubación *in vitro* de los explantes

A continuación, en la cámara de flujo laminar, se llevó a cabo la obtención de explantes utilizando una caja petri y un bisturí, se obtuvo explantes de 1 cm², de un segmento de la hoja, procedentes de la base del pecíolo y del segmento central del limbo de la hoja. Posteriormente se realizó la inoculación en frascos de cultivo, colocando dos explantes por frasco, con el envés en contacto con el medio de cultivo (Figura 10).



Figura 10 . Aislamiento, inoculación e incubación *in vitro* de los explantes de los explantes obtenidos *in vitro* y *ex vitro*: A) Obtención de explantes de 1 cm² en material; B) Implantación de los tejidos en material; y, C) Distribución espacial de los frascos en el cuarto de luces.

El medio de cultivo basal, estuvo constituido por las sales minerales del Murashige y Skoog (MS, 1962); suplementado con, vitaminas B5 (tiamina 1,0 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, piridoxina 1,0 mg/L, ácido nicotínico 2,0 mg/L); sacarosa 2 %; agar 0,6 %, ácido ascórbico 200 mg/L y ácido cítrico 250 mg/L, el cual fue distribuido en frascos de vidrio tipo compota, a razón de 20 ml por frasco, para luego ser esterilizado en el autoclave, a una temperatura de 120 °C y una presión de 1,5 kg/cm², esto durante 20 minutos. El pH del medio de cultivo se ajustó en un rango de 5,8 ± 0,2; utilizando para ello NaOH o HCL (Figura 11).

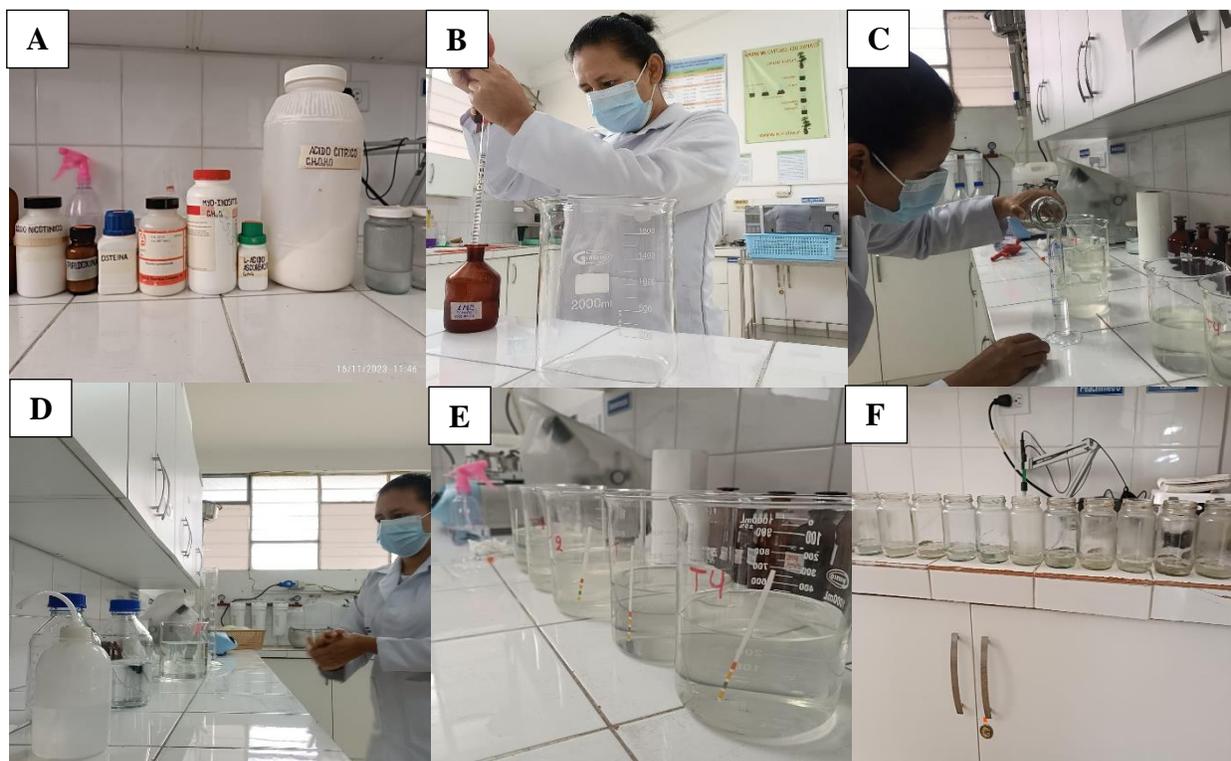


Figura 11. Preparación del medio de cultivo de MS (1962): A) Macro y micronutrientes; B) Medición de las soluciones madre; C) Medición de ANA y KIN; D) Disolución de sales minerales; E) Medición de pH; y, F) Distribución de 20 ml por cada frasco.

En esta fase del experimento, se emplearon los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético-ANA ($C_{12}H_{10}O_2$) y kinetina-KIN ($C_{10}H_9N_5O$) en diferentes concentraciones como se detalla en la (Tabla 9). Una vez completado el proceso de inoculación de los explantes en los frascos de cultivo, estos fueron transferidos al cuarto de luces del laboratorio y fueron incubados a una temperatura de ± 23 °C, en condiciones de total oscuridad.

Tabla 9. Tratamientos para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro* o vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.

No.		1	2	3	4	5
Tratamientos		T0	T1	T2	T3	T4
Regulador de crecimiento	ANA (mg/L)	0,0	5,0	10,0	5,0	10,0
	KIN (mg/L)	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5

5.3.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), que constó de 5 tratamientos y 3 repeticiones. Cada tratamiento consistió en 15 frascos de vidrio y cada tratamiento estuvo suplementado con diferentes concentraciones de ANA y KIN (Tabla 10).

Tabla 10. Tratamientos para evaluar, el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro* y vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.

No.		1	2	3	4	5
Tratamientos		T0	T1	T2	T3	T4
Regulador de crecimiento	ANA (mg/L)	0,0	5,0	10,0	5,0	10,0
	KIN (mg/L)	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5
Codificación		T0A0C0	T1A1C0	T2A2C0	T3A1C1	T4A2C1

Leyenda: T = tratamiento. A = auxina. C = citoquinina

5.3.3.1. Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue un frasco, el cual contenía 2 explantes por cada frasco de vidrio, dando un total de 30 explantes en cada uno de los tratamientos y en total para todo el ensayo se requirió de 150 explantes contenidos en 75 frascos (Tabla 11).

Tabla 11. Especificaciones del diseño experimental, para la evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro* o vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.

Especificaciones:	Muestra
Unidad experimental	frasco
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3

Especificaciones:	Muestra
Número de frascos por repetición	5
Número de frascos por tratamiento	15
Número de explantes por frasco	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	30
Número de unidades experimentales (explantes) del ensayo	150
Número de frascos del ensayo	75

5.3.3.2. Factores y niveles

Los factores y niveles evaluados de las diferentes concentraciones de ANA y KIN para la formación de estructuras callogénicas en explantes de *C. officinalis* se detallan en la tabla 12 (Camacho, 2023; Correa, 2024).

Tabla 12. Factores y niveles de concentración de balance hormonal auxina-citoquinina, para la inoculación *in vitro* de los explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de plántulas *ex vitro* y vitroplantas, en condiciones de total oscuridad.

Factores	Niveles (mg/L)	Mg/L
Nivel de concentraciones de auxinas (A)	1	0,0
	2	5,0
	3	10,0
Nivel de concentraciones de citoquininas (C)	1	0,0
	2	0,5

5.3.4. Distribución espacial de los tratamientos

A continuación, en el cuarto de incubación, se detalla la distribución espacial de los tratamientos y repeticiones para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* o vitroplantas de *C. officinalis* en condiciones de oscuridad (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución espacial de los tratamientos y repeticiones en el cuarto de incubación del laboratorio, para evaluar el efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, en la inducción de estructuras callogénicas, en explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* o vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad.

T0A0C0			T1A1C0		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T2A2C0			T3A1C1		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
T4A2C1					
R1	R2	R3			

Leyenda: T: tratamiento; A: auxina; C: citoquinina; R: repetición

5.3.5. Variables evaluadas

La evaluación de las variables, se realizó mediante observación directa cada 5 días; para verificar el número de explantes contaminados y fenolizados y para la valoración del número de explantes con callo, número de raíces por callo y número de brotes por callo se evaluó cada 15 días, durante un periodo de 90 días en condiciones de total oscuridad. Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- Número de días a la contaminación
- Número de explantes contaminados
- Número de días a la fenolización
- Número de explantes fenolizados
- Número de días a la formación del callo
- Número de explantes con callo
- Color del callo
- Friabilidad del callo
- Número de raíces por callo
- Número de brotes por callo

Para el registro de los datos, del número de explantes contaminados y número de explantes fenolizados, se utilizó la Tabla 14.

Tabla 14. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes contaminados y fenolizados, en la inducción de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L.

Fecha de evaluación:					
Condiciones de incubación:					
N° Tratamiento	N° de repetición	N° de frasco	N° Explantes	N° Explantes Contaminados	N° Explantes fenolizados
Tn	Rn	Fn	Exp 1		
			Exp 2		

Leyenda: Tn= Número de tratamiento; Rn= Número de repetición; Fn= Número de Frasco; Exp= Número de explante.

Para registrar los datos del número de explantes con callo, número raíces por callo, número de brotes por callo, número de días a la formación de callo por explante, se utilizó la Tabla 15.

Tabla 15. Hoja de registro de datos, para evaluar el número de explantes con callo, número raíces por callo, número de brotes por callo, número de días a la formación de callo por explante, en la inducción de estructuras callogénicas, utilizando diferentes concentraciones del balance hormonal auxina-citoquinina.

Fecha de evaluación:							
Condiciones de incubación:							
N° Tratamiento	N° de repetición	N° de frasco	N° Explantes	N° de explantes con callo	N° de raíces por callo	N° de brotes por callo	N° de días a la formación de callo
Tn	Rn	Fn	Exp 1				
			Exp 2				

Leyenda: Tn= Número de tratamiento; Rn= Número de repetición; Fn= Número de Frasco; Exp= Número de explante.

5.3.6. Análisis estadístico

Para evaluar la eficiencia de los tratamientos empleados en las diferentes variables como: estructuras callogénicas y número de raíces se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05; una vez, confirmada la homocedasticidad de varianza y normalidad de los datos y se aplicó TukeyHSD (Diferencia Mínima Significativa de Tukey), para comparar los niveles entre tratamientos. El análisis estadístico se realizó mediante el software Rstudio 4.2.2 (2023) y Excel.

5.4. Metodología para la difusión de resultados

Para la difusión de resultados de la presente investigación se realizó diferentes actividades, que se indican a continuación:

- Elaboración y publicación del documento final del Trabajo de Integración Curricular (TIC).
- Socialización de los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC) a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de Loja y en los Proyectos Integradores de Saberes organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Socialización de resultados en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán de bosques.
- Elaboración de un manuscrito de artículo científico titulado: Implantación e inducción de estructuras callogénicas, en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L., para ser sometido a revistas de Biotecnología forestal.

6. Resultados

6.1. Desinfección de explantes de *Cinchona officinalis* L., obtenidos de plántulas *ex vitro*, durante la fase de implantación de los tejidos

6.1.1. Porcentaje de contaminación

En la fase de implantación a los 45 días los explantes de *C. officinalis ex vitro* presentaron mayor porcentaje de contaminación en el tratamiento 1 (10,00 % NaClO) con 66 %, a diferencia del tratamiento 3 (20,00 % NaClO) que mostró un reducido porcentaje de contaminación con el 6,67 %; con una diferencia significativa entre los tratamientos con *p*-valor de 0,0146 (Figura 12).

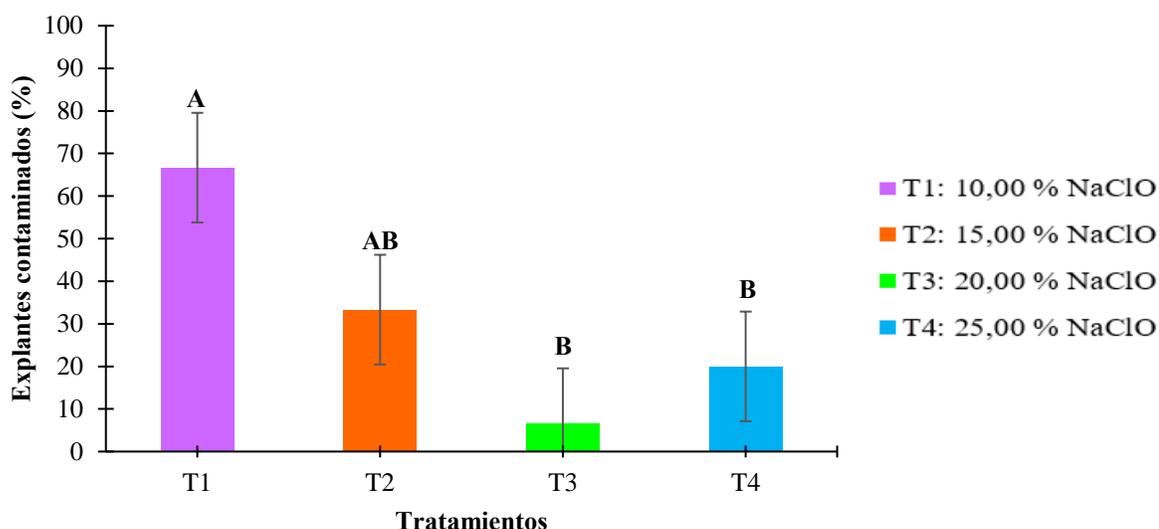


Figura 12. Porcentaje de contaminación por tratamiento en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

La contaminación se manifestó por la presencia de los hongos *alternaria sp* y *collectotrichum sp*, en la lámina foliar y de bacterias identificadas como: *Bacillus spp* y *cocobacilos gram positivos* (Figura 13).

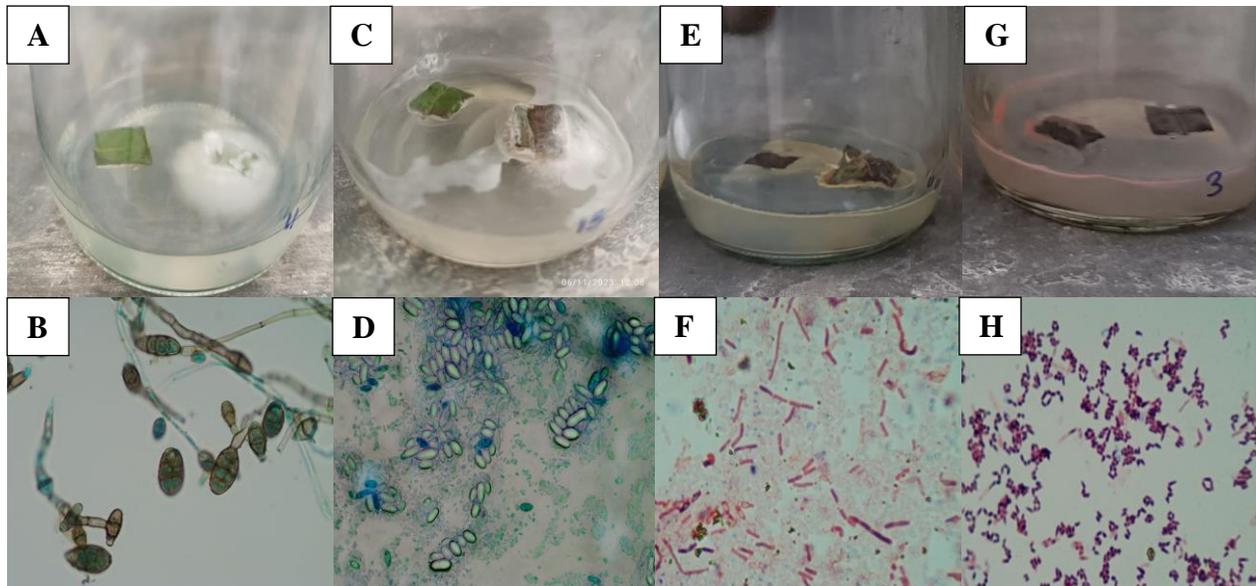


Figura 13. A) y B) *Alternaria* sp vista macro y microscópica; C) y D) Vista macro y microscópica de *Collectotrichum* sp; E) y F) Vista macro y microscópica de la bacteria *Bacillus* spp; y, G) y H) Vista macro y microscópica de la bacteria *cocobacilos* gram positivos.

6.1.2. Días a la contaminación

La contaminación en los explantes *ex vitro* se manifestó a partir de los 5 días en el tratamiento 4 (25,00 % NaClO) con un 20 %, siendo el tratamiento 1 (10,00 % NaClO) con mayor índice de contaminación con un total de 67 % en los primeros 19 días y que se mantuvo como el mayor porcentaje de contaminación hasta finalizar la evaluación y el tratamiento 3 (20,00 % NaClO) fue el que manifestó el menor porcentaje de contaminación con el 7 % a 35 días de evaluación (Figura 14).

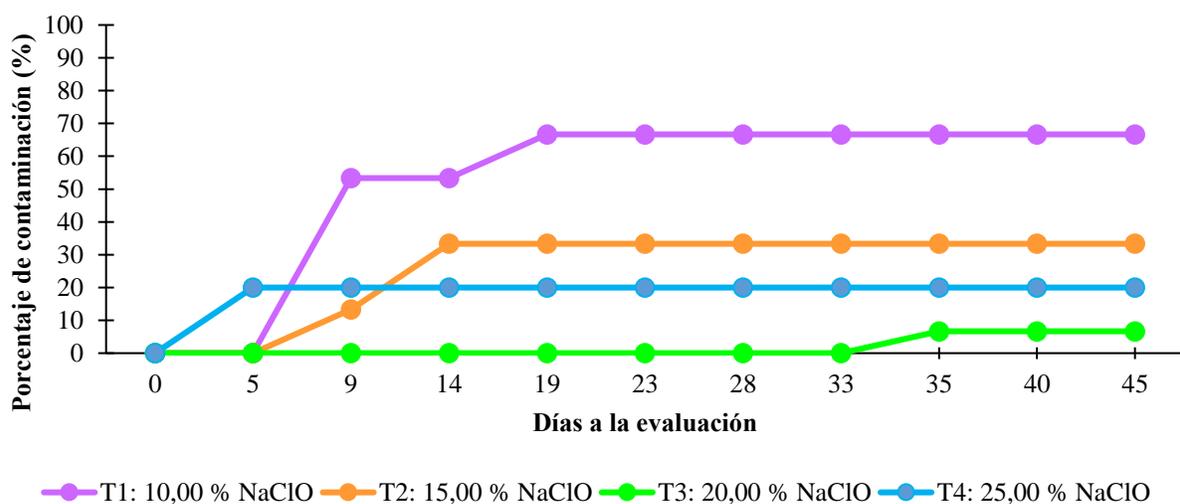


Figura 14. Porcentaje de contaminación según los días de evaluación en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.1.3. Porcentaje de fenolización

Según la evaluación en explantes *ex vitro* de *C. officinalis* existió un alto porcentaje de fenolización, siendo el tratamiento 3 (20,00 % NaClO) el que presento mayor fenolización con un 66,67 % de explantes, mientras que el tratamiento 1 (10,00 % NaClO) registro menor fenolización con un total de 26,67 % durante los 45 días de control, evidenciándose que los tratamientos no presentaron diferencia significancia con *p*-valor de 0,176 (Figura 15).

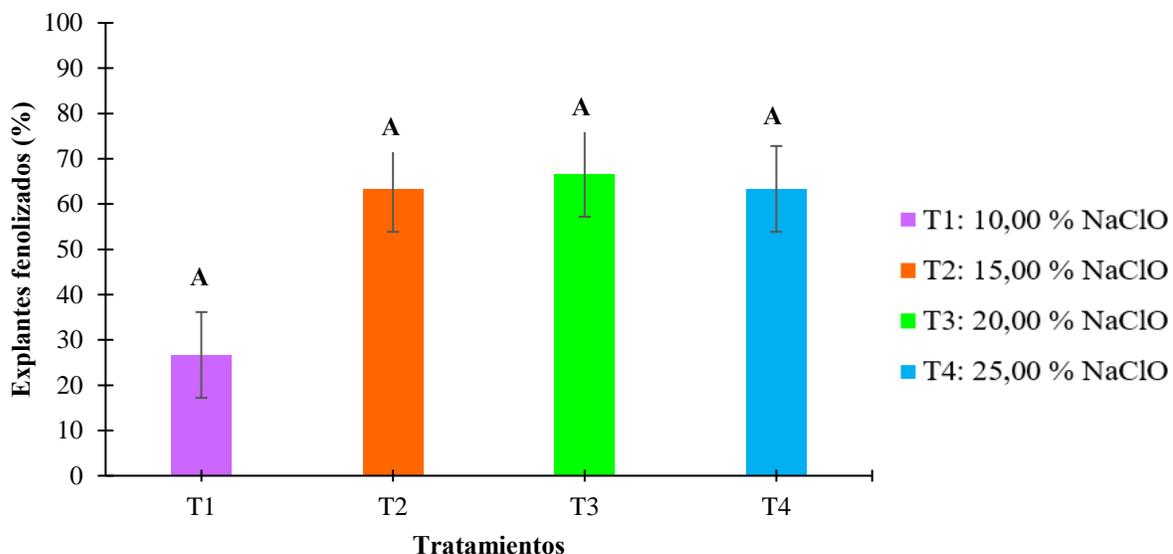


Figura 15. Porcentaje de explantes *ex vitro* fenolizados de *Cinchona officinalis* L., por cada tratamiento.

6.1.4. Días a la fenolización

La fenolización en los explantes *ex vitro* se evidencio a partir de los 14 días posteriores a la inoculación, especialmente en los tratamientos 2, 3 y 4 con porcentajes de fenolización del 13,33; 6,67 y 6,67 % respectivamente. A los 45 días de evaluación se observó que el tratamiento 3 con una concentración de NaClO del 20,00 % presentó mayor fenolización alcanzando un total de 66, 67 %. Le siguieron en orden de fenolización los tratamientos 2 (15,00 % NaClO) y 4 (20,00 % NaClO) con un porcentaje de 63,3 % y el tratamiento 1 (20,00 % NaClO) mostro el menor porcentaje de fenolización con un 26,67 % (Figura 16).

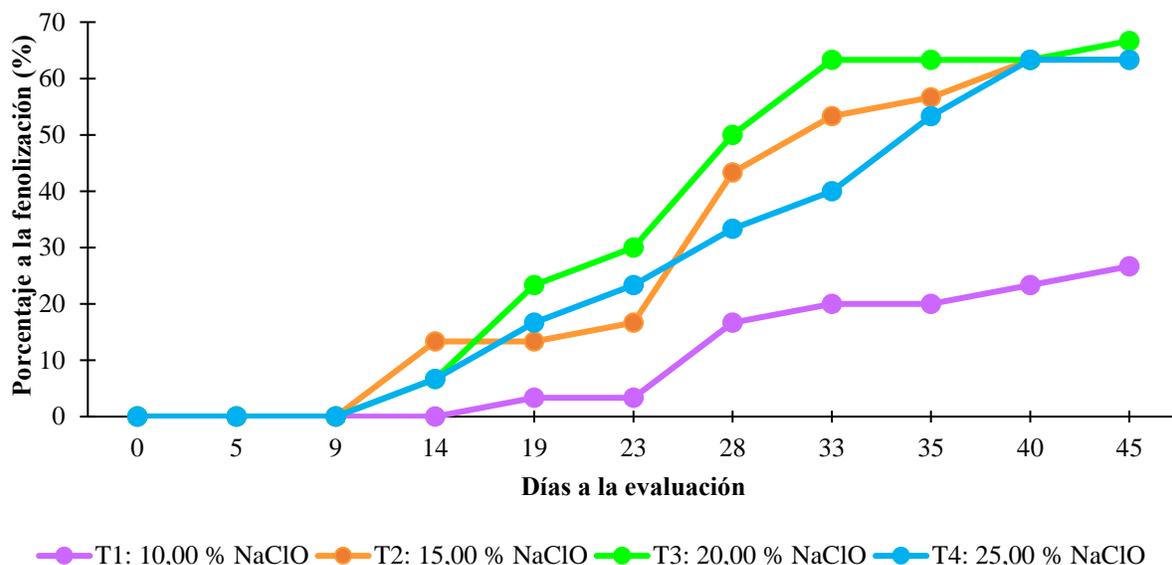


Figura 16. Porcentaje de fenolización según los días de evaluación en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.1.5. *Sobrevivencia de explantes*

Al finalizar los 45 días de evaluación, el tratamiento 3 (con una concentración de NaClO del 20,00 %) presento mayor número de explantes vivos, con un total de 10, le siguió el tratamiento 4 (25,00 % NaClO) con un total de 5 explantes vivos; mientras, que los tratamientos 1 (10,00 % NaClO) y 2 (15,00 % NaClO) mostraron los valores más bajos de supervivencia con un total de 3 explantes vivos cada uno (Figura 17).

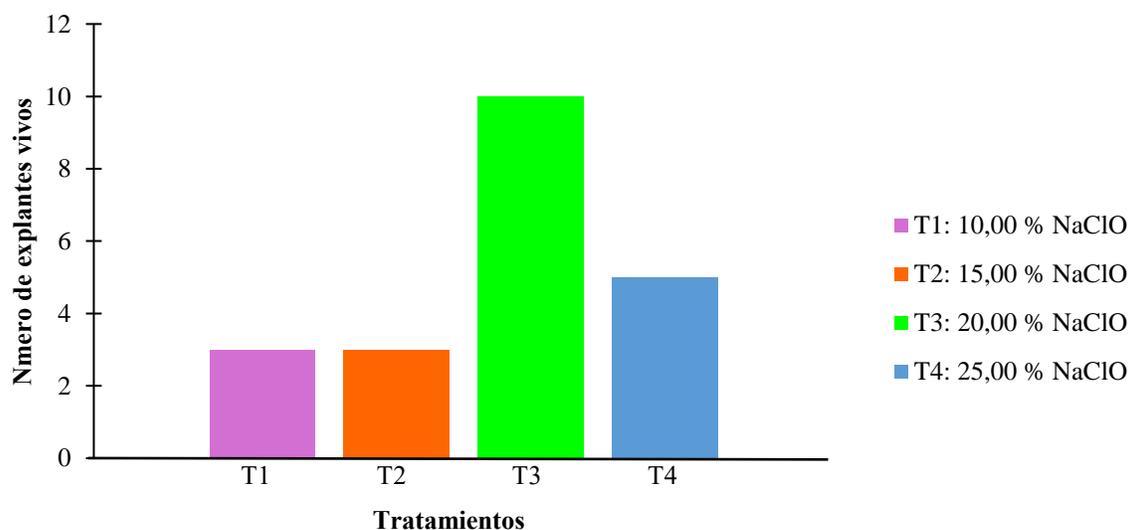


Figura 17. Número de explantes *ex vitro* vivos de *Cinchona officinalis* L.

6.2. Efecto del balance hormonal auxina-citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas, en explantes obtenidos de plántulas *ex vitro* y vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de oscuridad

6.2.1. Porcentaje de contaminación en explantes *ex vitro*

Los explantes *ex vitro* de *C. officinalis* mostraron contaminación en todos los tratamientos evaluados durante el período de estudio. El testigo registro un porcentaje de contaminación del 63,33 %. Seguidamente los tratamientos T1, T2, T3 y T4 manifestaron aproximadamente el 53,33 % de contaminación. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos, como lo demuestra el *p-valor* de 0,921 (Figura 18).

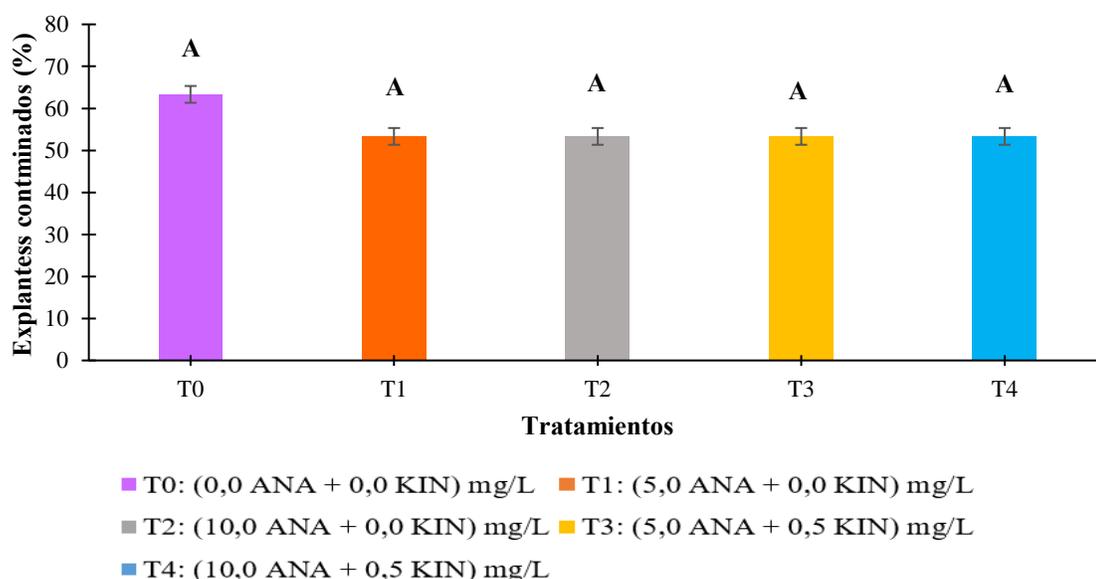


Figura 18. Porcentaje de contaminación en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.2. Porcentaje de fenolización en explantes *ex vitro*

Los explantes *ex vitro* presentaron altos porcentajes de oxidación fenólica durante los 45 días de evaluación. El T0 destacó con 83,33 % de fenolización; seguido de, el T1 con 80 %, mientras que los tratamientos T2 y T4 presentaron la fenolización más baja con 63,33 %. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos ya que el *p-valor* fue de 0,378 (Figura 19).

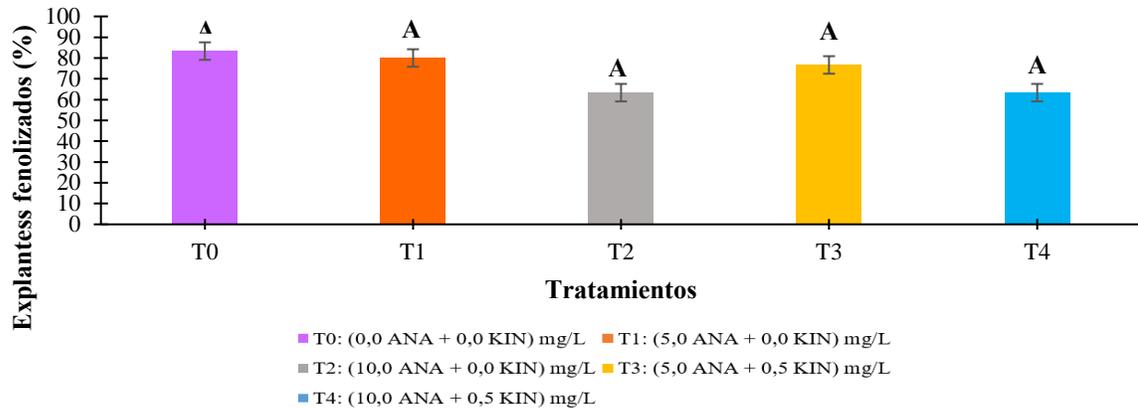


Figura 19. Porcentaje de fenolización en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.3. Número de explantes *ex vitro* con callo

Durante el tiempo de estudio se observó la formación de estructuras callogénicas en los tratamientos con dosis de reguladores de crecimiento (Figura 20). El tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) presento el mayor porcentaje de formación de callos con un 26,67 %, seguido del tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) con un 23,33 %, mientras que el tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) mostro el 10 % de formaciones callogénicas, siendo el menor de todos; no obstante, los tratamientos no presentaron diferencia significativa entre si (*p*-valor de 0,585) (Figura 21).

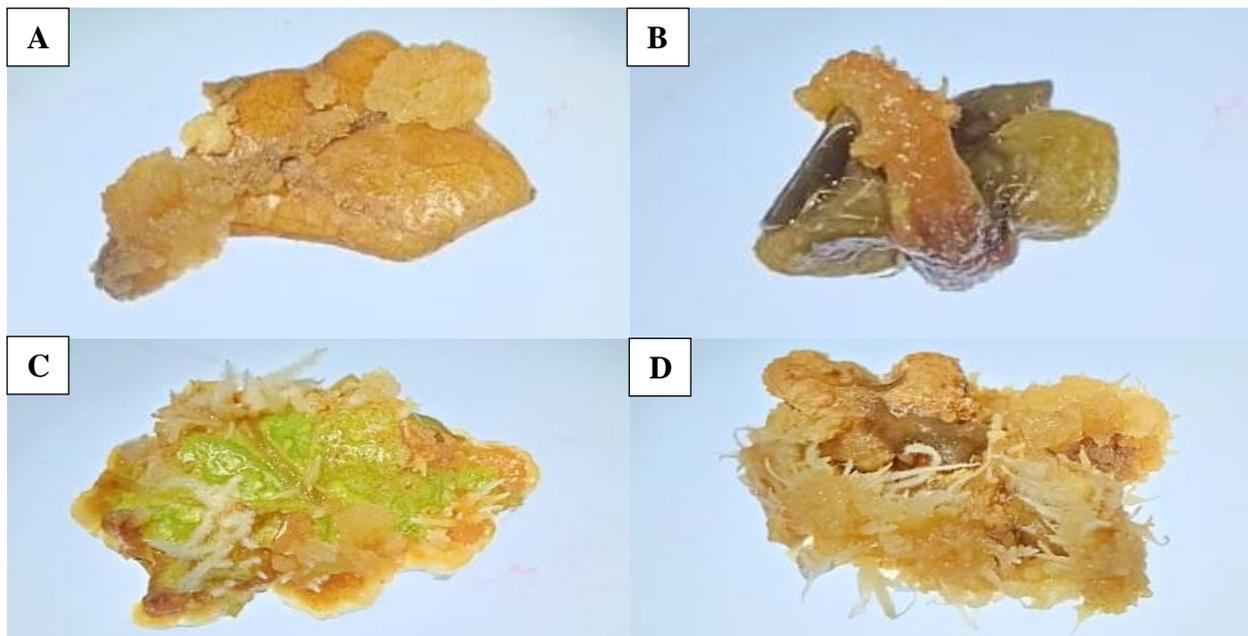


Figura 20. Estructuras callogénicas en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L en los cuatro tratamientos. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); C): Tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, D): Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).

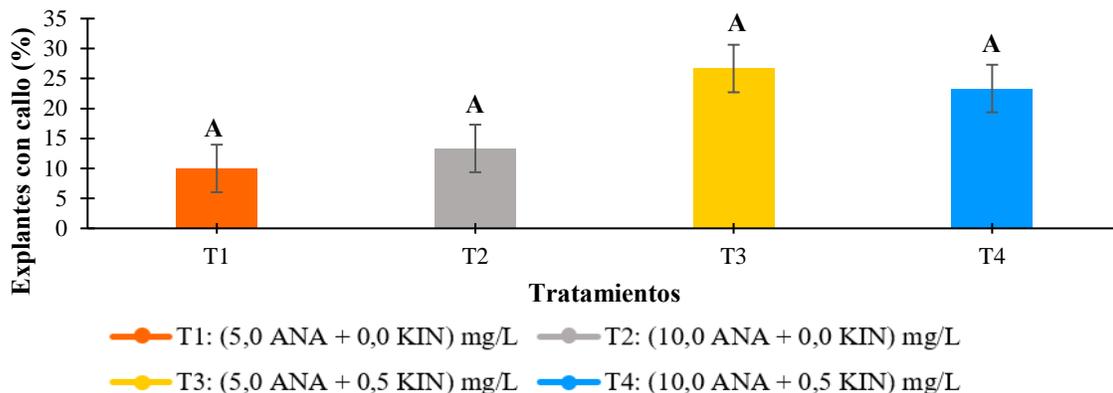


Figura 21. Porcentaje de estructuras callogénicas en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.4. Días a la formación del callo en explantes *ex vitro*

Los explantes presentaron las estructuras callogénicas a partir de los 19 días de su inoculación en todos los tratamientos con auxina-citoquinina. El porcentaje de callos fue aumentando conforme a los días, el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) se estabilizó a los 41 días, con un 26,64 % de formación de callos, los tratamientos 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) y 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) se normalizaron a los 38 días y el tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) manifestó formaciones callogénicas hasta los 84 días de haber instalado el ensayo (Figura 22).

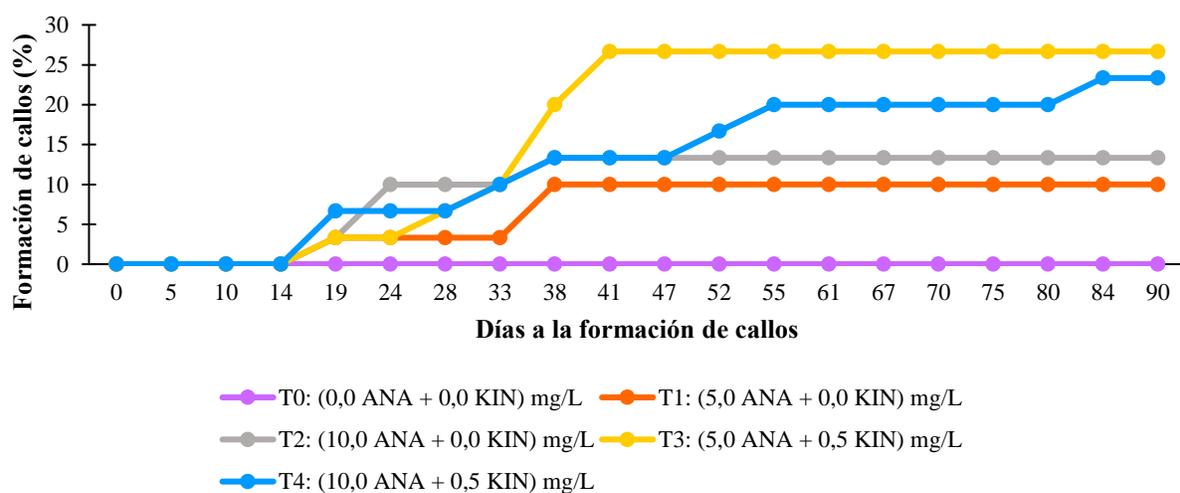


Figura 22. Porcentaje de callos según los días de evaluación en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.5. Color del callo en explantes *ex vitro*

Los callos formados presentaron dos tipos de tonalidades al finalizar la evaluación (Figura 23), el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) registro 4 de callos color café y 4 de color crema; a diferencia del tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) que solo presento 4 estructuras callogénicas de color café y finalmente el tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) manifestó 2 callos de color crema (Figura 24).

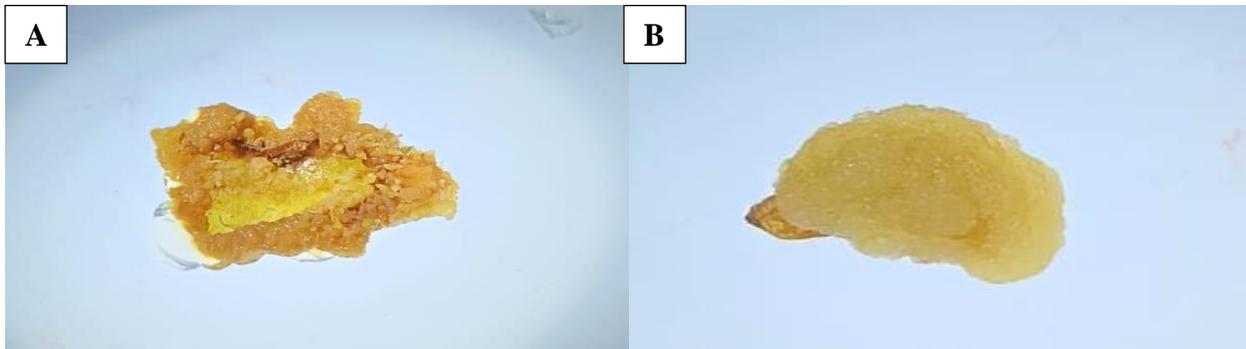


Figura 23. Color del callo en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L. A): Callo color café; y, B): Callo color crema.

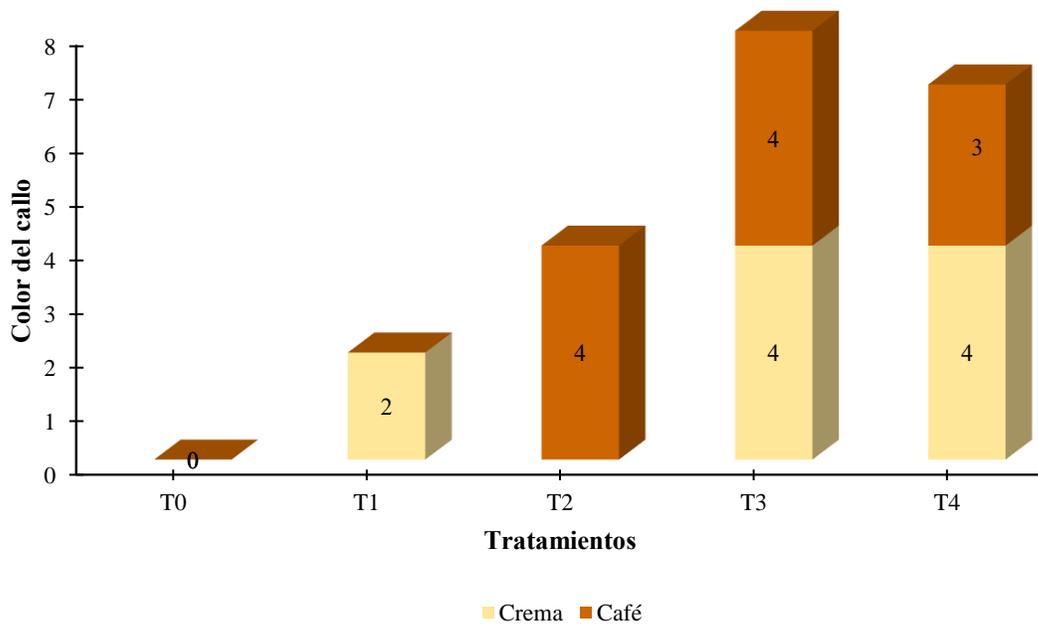


Figura 24. Color del callo en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.6. Friabilidad del callo en explantes *ex vitro*

Las estructuras callogénicas formadas en los tratamientos fueron friables y no friables, en el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) y 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) se observó friabilidad en el 20 % de callos y el 6,67 % no friables. El tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) manifestó mayor no friabilidad con el 10 % y el 3,33 % de friabilidad en sus callos y en el tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) se observó la friabilidad de los callos en un 6,67 % y ninguno no friable (Figura 25).

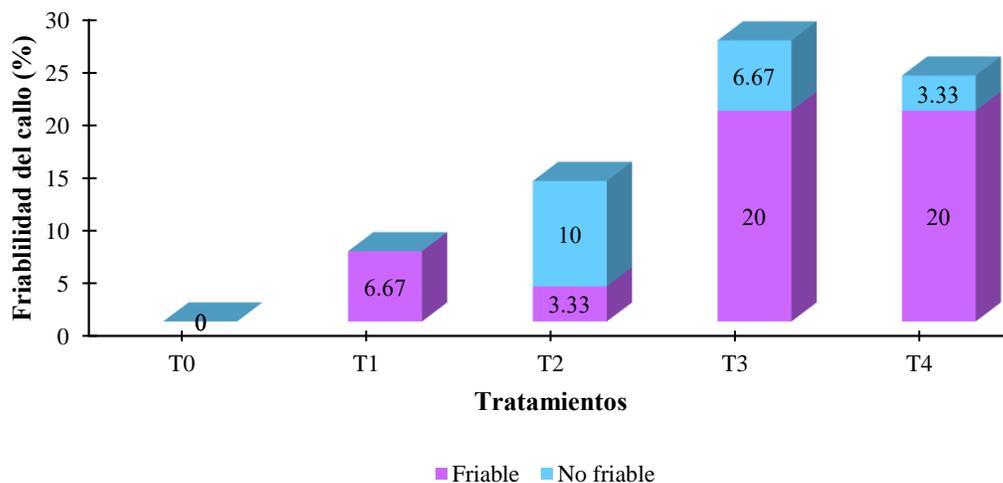


Figura 25. Friabilidad del callo en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.7. Numero de raíces por callo en explantes *ex vitro*

Durante el período de evaluación en los diferentes tratamientos aplicados se observó la formación de raíces (Figura 26); sin embargo, no se percibieron brotes en ningún callo. EL tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) formo en promedio 33 raíces por callo; mientras que el tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) formo 28 raíces por callo. El tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) a pesar de haber formado callos, no desarrollo raíces en los 90 días de monitoreo; sin embargo, no se evidencio diferencia significativa en la formación de raíces, según lo indica el *p-valor* de 0,159 (Figura 27).



Figura 26. Raíces del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L por cada tratamiento. A): Tratamiento 1 (5,00 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 3 (5,00 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, C): Tratamiento 4 (10,00 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).

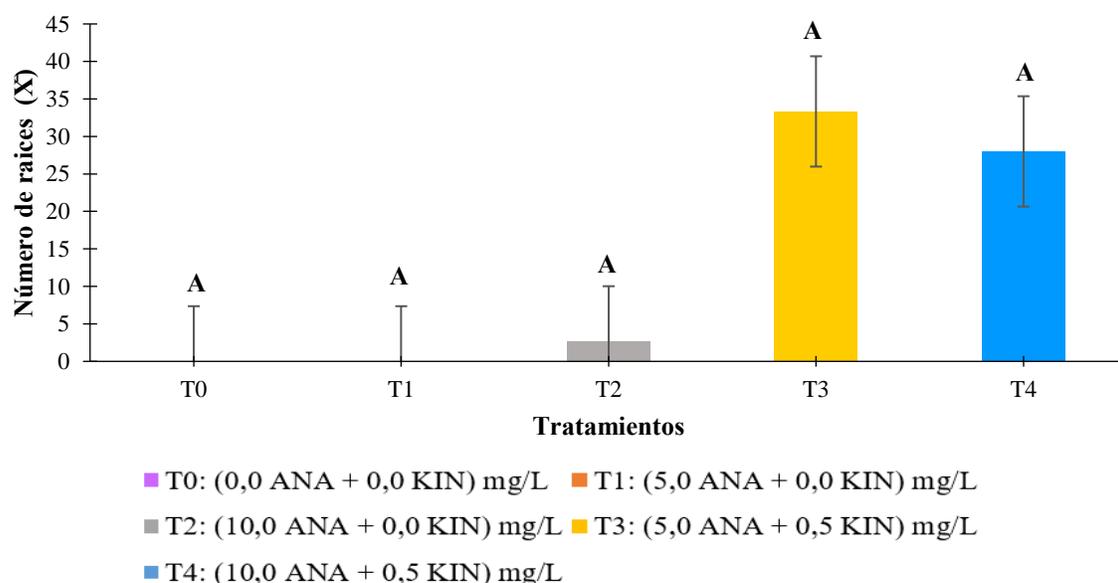


Figura 27. Número de raíces por callo en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.8. Porcentaje de contaminación en explantes *in vitro*

En general los explantes presentaron porcentajes bajos de contaminación durante el período de evaluación. Se observó que el testigo y los tratamientos 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) y 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) no presentaron contaminación, a excepción del tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) que presentó contaminación en dos explantes con un total de 6,67 % de incidencia (Figura 28). La aparición de contaminación en los explantes se registró a los 18 días después de haber sido colocados en contacto con el medio de cultivo suplementado. No se encontraron diferencia significativa entre tratamientos en términos de contaminación, como lo indica el *p-valor* de 0,4411.

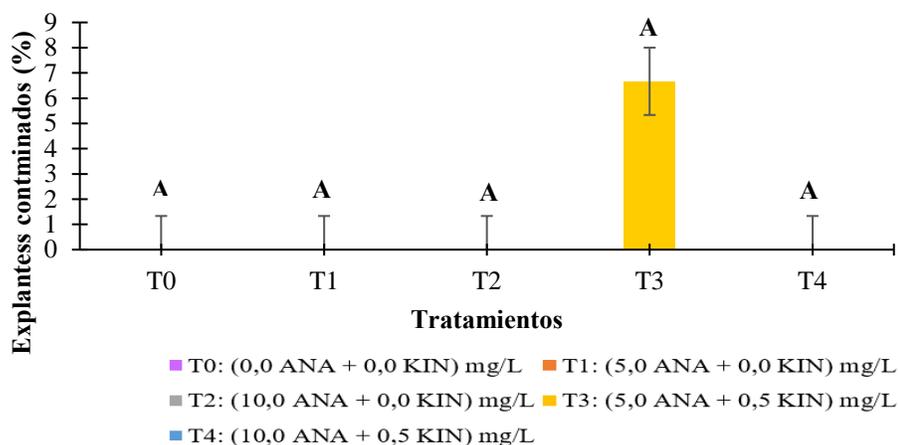


Figura 28. Porcentaje de contaminación en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.9. Porcentaje de fenolización en explantes *in vitro*

Durante el período de evaluación de 45 días, se observó que los explantes presentaron fenolización en todos los tratamientos, siendo más notable en el testigo, donde se registró una oxidación fenólica del 100 %. El tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) tuvo un porcentaje significativo de fenolización, alcanzando un total del 63,33 % seguido por el tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) con un 26,67 % de explantes fenolizados. Estos valores difieren significativamente del Tratamiento 0 (testigo) (Figura 29). La oxidación fenólica presentó varianza significativa entre los tratamientos durante los 45 días de evaluación con 0,0017 de *p*-valor.

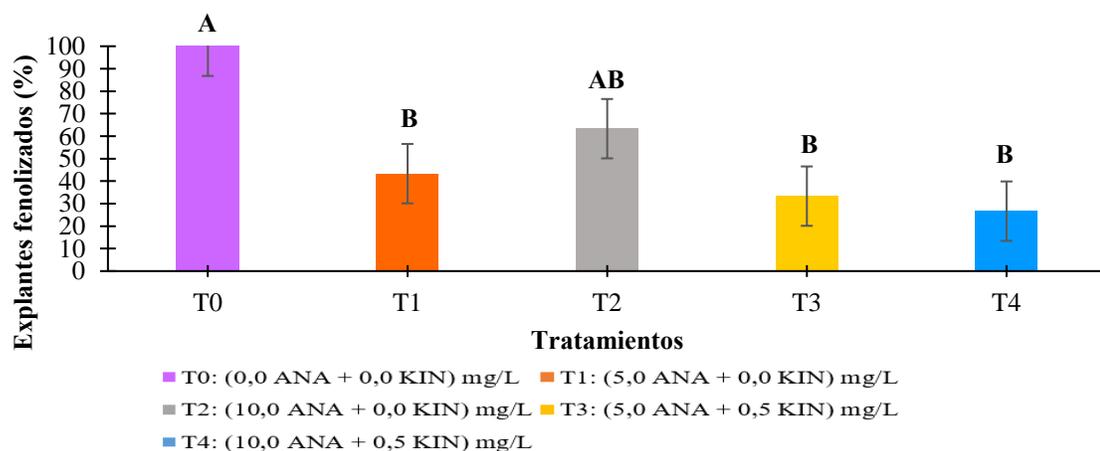


Figura 29. Porcentaje de fenolización en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.10. Número de explantes *in vitro* con callo

Durante el transcurso de 90 días, se observó la formación de estructuras callogénicas en los diferentes tratamientos (Figura 30). Sin embargo, el testigo no mostró ninguna formación durante este período. El tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) registró la mayor cantidad de callos, alcanzando un total del 96,67 %. El tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) presentó un total de 93,33 %, de formaciones callogénicas, seguido por el tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) con un 86,67 % y finalmente el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) mostró un total del 80 % de formaciones callogénicas (Figura 31). Es importante destacar que no se observó una variabilidad significativa entre los cuatro tratamientos suplementados con reguladores de crecimiento, como lo indica el *p*-valor de 0,4064.

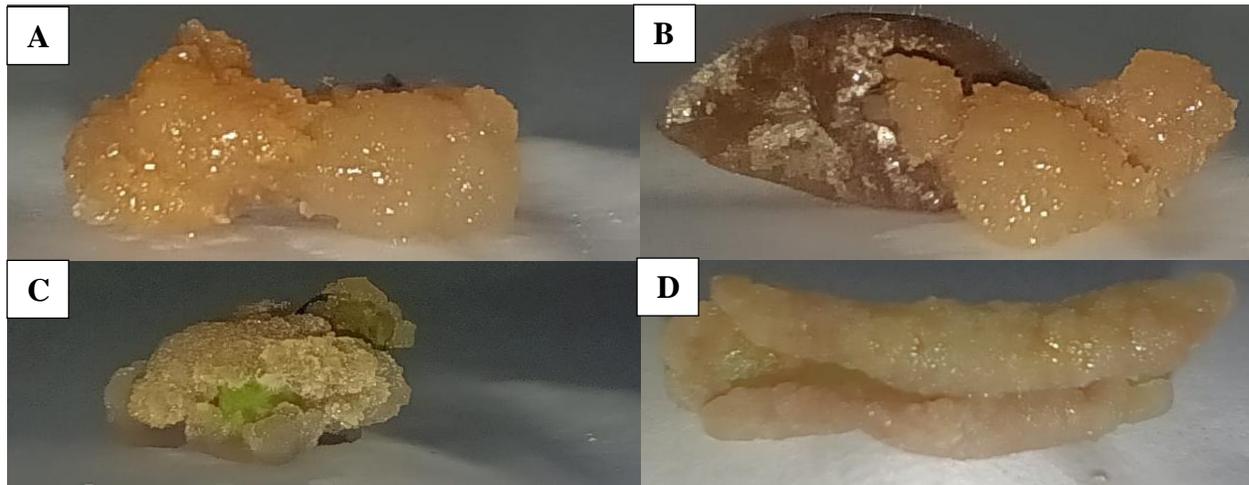


Figura 30. Estructuras callogénicas en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L en los cuatro tratamientos. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); C): Tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, D) Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).

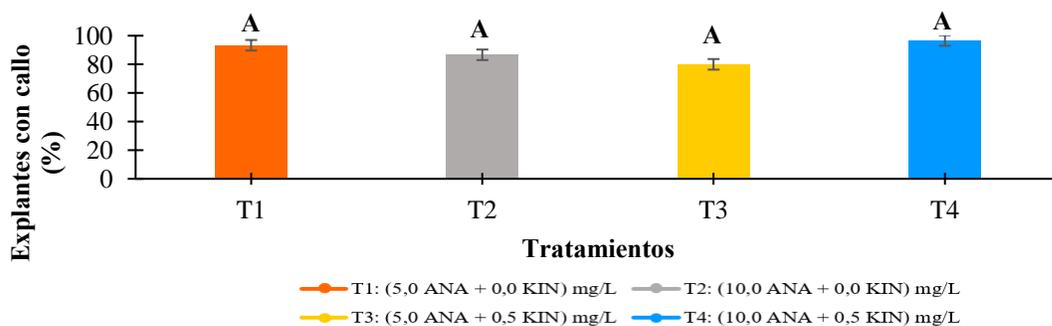


Figura 31. Porcentaje de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.11. Días a la formación del callo en explantes *in vitro*

Los explantes manifestaron estructuras callogénicas a partir de los 18 días en los tratamientos 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) y 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L), siendo el T2 quien presento mayor porcentaje de callos con el 73,33 %; a diferencia, del T3 con 6,67 %. Los cuatro tratamientos se estabilizaron en su formación a los 44 días; no obstante, el tratamiento 0 (0,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) o testigo al no estar suplementado no desarrollo este tipo de formaciones (Figura 32).

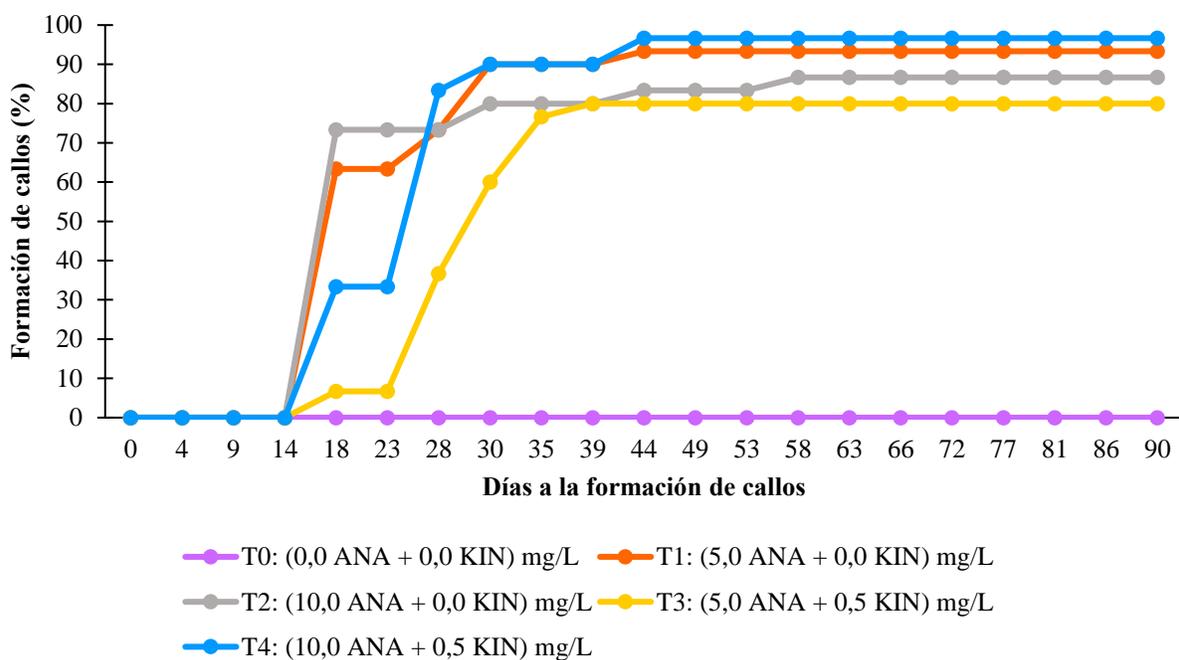


Figura 32. Porcentaje de callos según los días de evaluación en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.12. Color del callo en explantes *in vitro*

Los explantes que formaron callo mostraron diferentes tonalidades en el lapso de 90 días de evaluación (Figura 33), en el tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) el color crema predominó con 19 callos, seguido del color café con 7 y el café claro con 4 callos, de la misma manera el tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) presentó en mayor proporción callos de color crema; a diferencia, del tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) donde el color café muestra mayor dominancia con un total de 14 callos, y el color crema registró 10 callos; finalmente, en el tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) el color café presentó mayor número de callos con un total de 16 y el color crema presentó 14 callos (Figura 34).

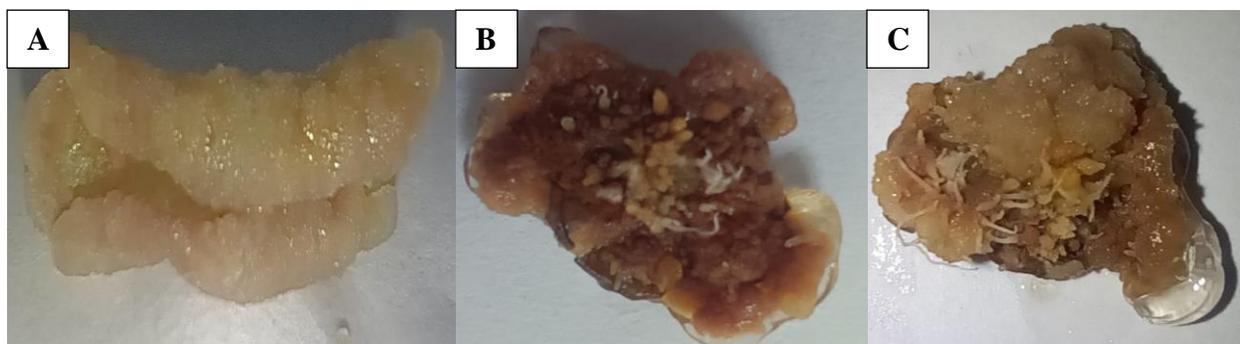


Figura 33. Color del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. A): Callo color crema; B): Callo color café; y, C): Callo color café claro.

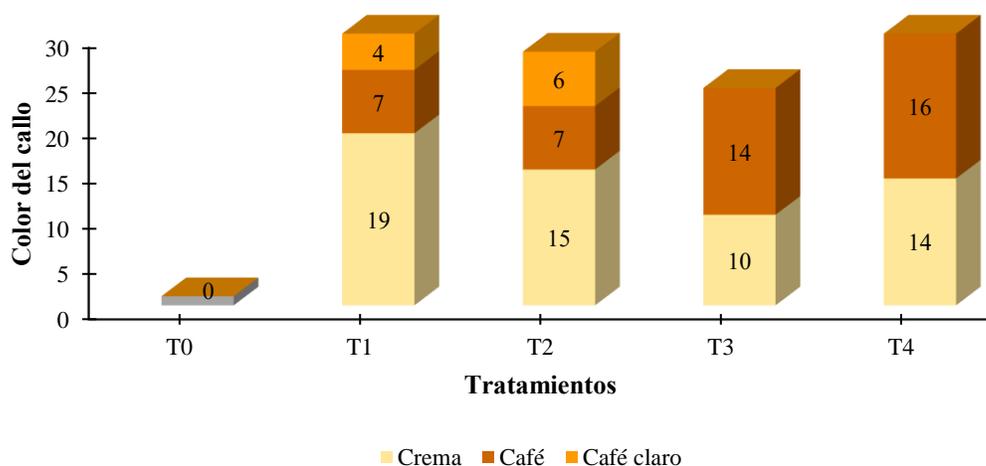


Figura 34. Color del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.13. Friabilidad del callo en explantes *in vitro*

Los callos formados en los distintos tratamientos presentaron friabilidad (Figura 35). En particular, el tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) mostro el mayor porcentaje de callos friables; mientras que el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) presento el menor porcentaje de callos friables. Así mismo, se observó que el tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) tuvo el mayor porcentaje de callos no friables; a diferencia, del tratamiento 4 que exhibió un menor porcentaje de friabilidad (Figura 36).

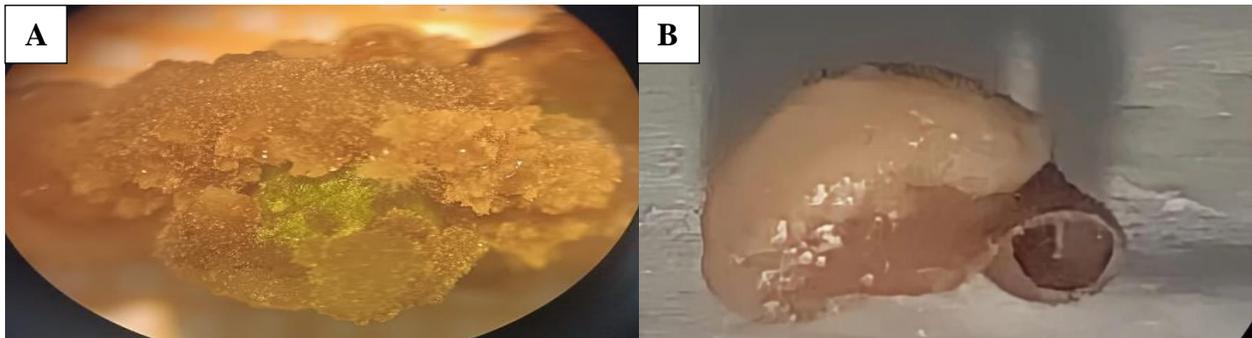


Figura 35. Friabilidad del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. A): Callo friable; y, B):Callo no friable.

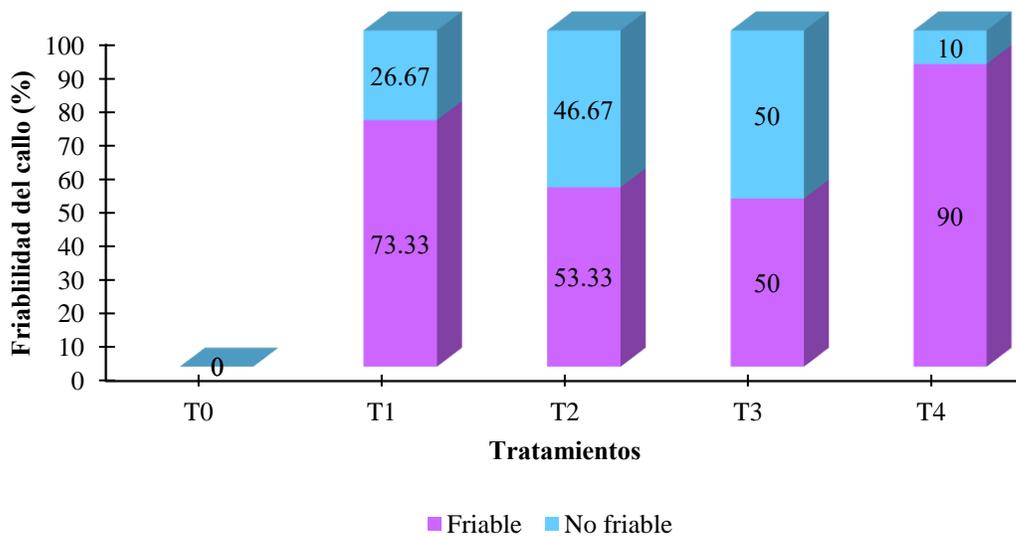


Figura 36. Friabilidad del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

6.2.14. Número de raíces por callo en explantes *in vitro*

En los diferentes tratamientos aplicados se evidencio la aparición de raíces a partir del día 58 de evaluación (Figura 37). El tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) mostro un mayor número de raíces con un promedio de 70 por callo, mientras que el tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) presento el menor número de raíces, con solo 6 por callo. Por otro lado, el tratamiento 2 (10,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L) a pesar de haber mostrado estructuras callogénicas no llego a formar raíces durante el período de 90 días, los diferentes tratamientos mostraron una diferencia significativa en cuanto a la formación de raíces, como lo indica el *p*-valor de 0,00137 (Figura 38).

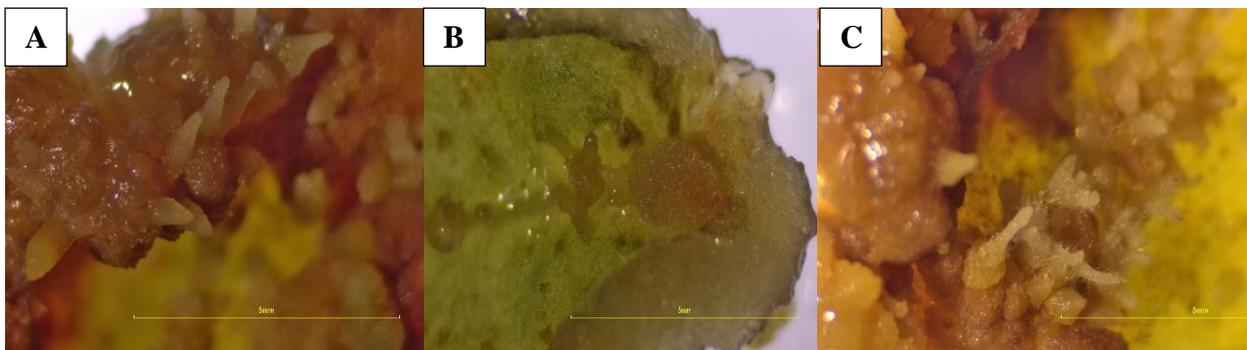


Figura 37. Raíces del callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L por cada tratamiento. A): Tratamiento 1 (5,0 ANA mg/L + 0,0 KIN mg/L); B): Tratamiento 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L); y, D): Tratamiento 4 (10,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L).

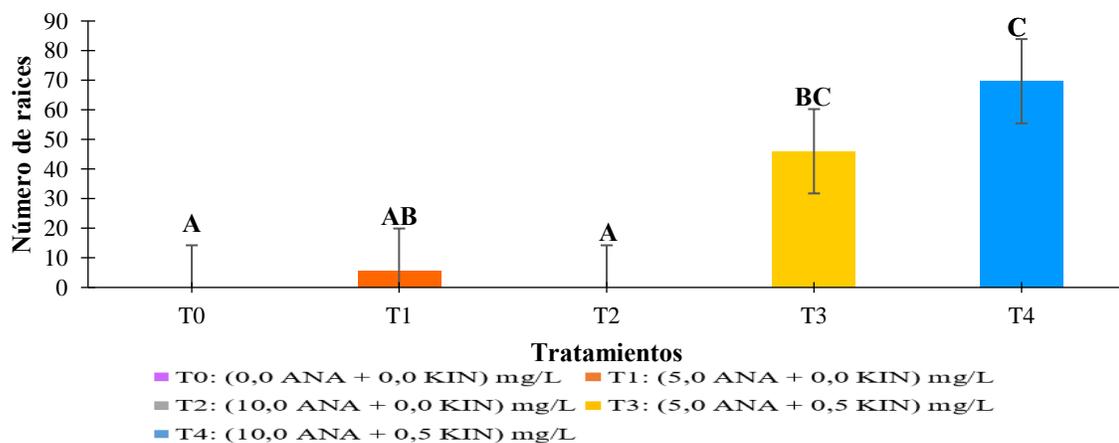


Figura 38. Número de raíces por callo en explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

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

6.3.1. Socialización de los resultados obtenidos en el Trabajo de Integración Curricular (TIC) a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de Loja

Difusión de resultados de la investigación a estudiantes de sexto ciclo dentro de la materia de Biotecnología Forestal de la Carrera de Ingeniería Forestal del período académico octubre 2023 – marzo 2024 (Figura 39).

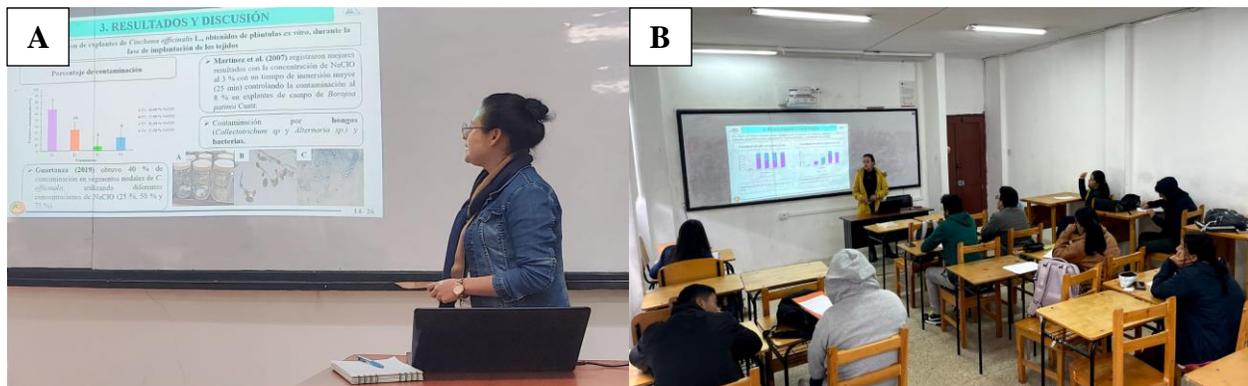


Figura 39. Socialización del Trabajo de Integración Curricular a estudiantes de: A) Noveno ciclo, asignatura Trabajo de Integración Curricular; y, B) Estudiantes de sexto ciclo de Biotecnología Forestal.

6.3.2. Socialización de los resultados del Trabajo de Integración Curricular a los actores involucrados en el campo forestal, que formaron parte de la Socialización de los Proyectos Integradores de Saberes organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal

Durante la presentación de los Proyectos de integración de Saberes y Trabajos de Integración Curricular, organizado por la Carrera de Ingeniería Forestal se realizó la difusión de resultados mediante un poster científico, en los exteriores del aula magna de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja, , el día viernes 01 de marzo del 2024 en horario de 8:00 am a 12:00 am. (Figura 40).

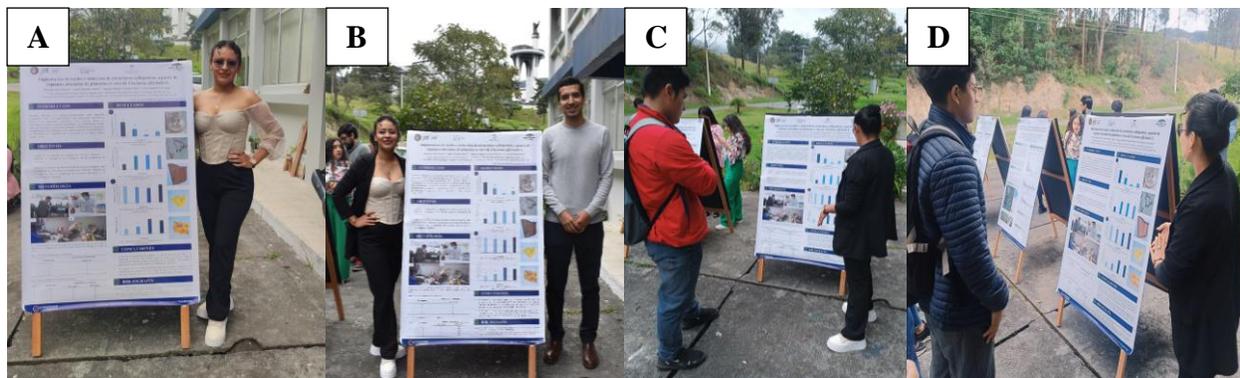


Figura 40. Socialización del Trabajo de Integración Curricular. A) Poster científico; B) Actores interesados; C) Socialización a técnicos y docentes interesados; y, D) Socialización a estudiantes interesados.

6.3.3. Socialización de resultados en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán de bosques.

Difusión de resultados a actores interesados presentes en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán desarrollado en las instalaciones de la Universidad Técnica Particular de Loja, los días jueves 21 y viernes 22 de marzo del 2024, bajo la organización de Universidad Técnica Particular de Loja, el programa alemán DFG-Respect y Naturaleza y Cultura Internacional Ecuador (Figura 41).

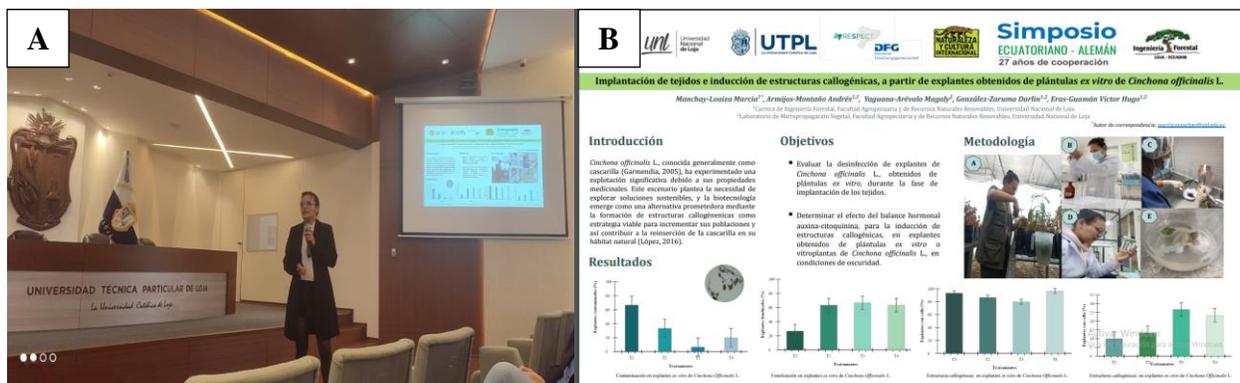


Figura 41 Socialización del Trabajo de Integración Curricular en el Simposio Internacional Ecuatoriano – Alemán: A) presentación oral; y, B): Presentación del poster.

7. Discusión

7.1. Contaminación

Se debe considerar que la contaminación se produce por factores endógenos (internos del explante) y exógenos (manipulación del material, condiciones del laboratorio y mala práctica del operario que realiza el proceso); es por ello, que la desinfección del material vegetal es fundamental en la propagación *in vitro*, pues ensaya y combina diferentes productos, concentraciones y tiempo en que el explante está en contacto con los desinfectantes y depende de la especie utilizada y el tipo de explante (Méndez et al., 2014).

En ese sentido, los explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L, durante el tiempo de evaluación presentaron un porcentaje de contaminación de entre el 20 al 67 % en los 4 tratamientos con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10,00; 15,00; 20,00 y 25,00 % respectivamente, estos porcentajes están en función de la presencia de hongos (*Collectotrichum sp* y *Alternaria sp.*) y bacterias (*Bacillus spp* y *cocobacilos gram* positivos) que fueron registrados de forma endógena y exógena en el material vegetal obtenido del invernadero; lo cual, aumento considerablemente los porcentajes de contaminación, a pesar de que el material vegetal recibió aspersiones previas de fungicida-bactericida para eliminar a nivel de invernadero agentes contaminantes. Con lo cual, nuestros resultados sugieren que las concentraciones empleadas de (NaClO) no fueron efectivas para controlar la contaminación, lo cual coincide con estudios reportados por (Guartanza, 2019; Ramírez et al., 2014).

Sin embargo, Martínez et al. (2007) registraron mejores resultados con la concentración de NaClO al 3 % con un tiempo de inmersión mayor (25 min) controlando la contaminación al 8 % en explantes de campo de *Borojoa patinoi* Cuatr. Así mismo, Rodríguez-Layza et al. (2021) mencionan al tiempo de inmersión como factor fundamental para controlar la contaminación, obteniendo mejores resultados aplicando NaClO a 1,3 % + 3 gotas de Tween × 100 ml/L, durante 30 minutos en café var. caturra roja.

García et al. (2015) mencionan que trabajar con material *ex vitro* aumenta los porcentajes de contaminación causada principalmente por hongos presentes en los explantes. En ese sentido, en el presente estudio se aplicó tratamientos previos de fumigación por aspersión al material del invernadero (fungicida-bactericida) para disminuir el índice de contaminación una vez inoculado;

sin embargo, el tiempo de aplicación del mismo no fue suficiente, lo cual afectó los niveles de contaminación durante el procedimiento de la inoculación.

Así mismo, se debe tomar en cuenta la procedencia del material vegetal (invernadero o *in situ*) para disminuir la contaminación en condiciones *in vitro*; por lo que, García et al. (2015) mencionan que para obtener plantas madre se debe realizar la extracción *in situ* de plántulas para su posterior adaptación y establecimiento en condiciones de invernadero; también, en su estudio al utilizar NaClO obtuvieron un porcentaje mayor al 80 % en contaminación. Además, manifiestan que, para asegurar las condiciones asépticas una vez realizada la inoculación, se debe hacer una doble desinfección en los explantes, primero se los debe sumergir en etanol (alcohol al 70 %) con una variación de tiempo de 20 a 60 segundos, y luego se realiza la inmersión en NaClO entre 3 y 30 minutos, el tiempo dependerá de la especie empleada (Sharry et al., 2015).

Las concentraciones de NaClO y las condiciones asépticas provocan diferentes efectos en el control de la contaminación; sin embargo, podemos determinar que los resultados obtenidos en la fase de desinfección con NaClO son semejantes a los estudios antes mencionados, contando con un 70 % de material vegetal libre de contaminación, cabe resaltar que este valor afectó la disponibilidad del material vegetal para la fase de inducción de estructuras callogénicas.

7.2. Fenolización

La fenolización depende de varios factores (Eras-Guamán et al., 2019), entre ellos el tipo de especie a propagar y las técnicas empleadas en el cultivo *in vitro*, así como el contacto con la luz al que puede estar expuesto el tejido. Por lo tanto, se recomienda realizarlo en condiciones de total oscuridad, no obstante, la liberación de fenoles dentro del tejido está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo y necrosamiento de las células presentes en el explante provocando la muerte celular (Sanchez, 2004).

Azofeifa (2009), plantea a la fenolización como uno de los aspectos indispensables para asegurar el éxito cuando se trabaja con cultivo de tejidos; además, describe que establecer el cultivo *in vitro* con explantes *ex vitro* y de especies leñosas presenta mayores dificultades por la alta concentración de fenoles dependiendo de la especie, los cuales son liberados al inicio de la implantación.

En el presente estudio se evidenció entre los 14 y 45 días un valor promedio de 55 % de fenolización, estos resultados son semejantes a los obtenidos por Guartanza (2019) quien registro

60 % de fenolización; cabe destacar que en ambos estudios el medio de cultivo estaba suplementado con ácido cítrico (250 mg/L), ácido ascórbico (200 mg/L) pero en el presente estudio se adiciono cisteína (50 mg/L) para reducir los niveles del mismo debido a que, *C. officinalis* es una especie que produce gran cantidad de fenoles, lo que aumento el porcentaje de fenolización en el material vegetal.

Sin embargo, López et al. (2015) señalan que el ácido cítrico (150 mg/L), ácido ascórbico (150 mg/L) y la cisteína (10 mg/L) actúan para prevenir la oxidación en estos tipos de explantes ya sea de manera individual o combinados. De igual forma, Rodríguez-Layza et al. (2021) obtuvieron la menor tasa de fenolización en café var. caturra roja aplicando NaClO a 1,3 % + 3 gotas de Tween × 100 ml/L, aludiendo que a mayor dosis de hipoclorito de sodio el tejido tiende a la fenolización.

Por otro lado, Díaz et al. (2020), mencionan que lograron controlar al 100 % la oxidación fenólica con carbón activado (3 g/L de CA) adicionado al medio de cultivo en la especie *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, ya que permite la remoción de los compuestos fenólicos y evita la degeneración del explante y plantea que es indispensable los pretratamientos en la planta madre para controlar la misma, dado que la oxidación es la primera respuesta del tejido luego de ser alterado o intervenido; por ellos los resultados obtenidos en fenolización son menores según la literatura revisada, debido a que en los diversos estudios se ha trabajado con diferentes soluciones antioxidantes.

En Ecuador los estudios realizados a partir de explantes *ex vitro* a nivel de laboratorio son limitados, siendo este uno de los primeros estudios en este tema dentro de la región sur del país, por lo cual se constituye en un protocolo para trabajar con material *in vivo*, destacando la complejidad de este fenómeno y la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para mitigarlo, considerando factores como la especie vegetal, la composición del medio de cultivo y las condiciones de cultivo.

7.3. Formación de estructuras callogénicas *ex vitro* e *in vitro*

Las estructuras callogénicas formadas en los explante se obtienen por los reguladores de crecimiento, los cuales se adicionan al medio de cultivo; dado que, en condiciones naturales son importantes para la planta durante su metabolismo, distribución de los solutos, crecimiento y fisiología permitiendo regular su expresión genética (Laguna-Ibarra et al., 2019).

En el presente estudio se aplicó ANA y KIN, ambas en dosis diferentes para estimular la formación de callos logrando obtener 71,33 % de formaciones callogénicas en un lapso de 90 días en explante *in vitro*; en un estudio similar Eras et al. (2019) obtuvieron 93,3 % de formaciones callogénicas adicionando 1,0 mg/L ANA + 0,5 mg/L BAP, utilizando segmentos nodales como explantes y teniendo en cuenta que la citoquinina utilizada es diferente a la del presente estudio. Sin embargo, otros estudios como el de Sánchez-Calvo et al. (2015) evidenciaron formación de callos a los 15 días de realizada la inoculación en los dos tratamientos suplementados con (2,4-D y AIB mg/L) formando callos en su totalidad en *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato); con la diferencia de que presentaron alteraciones en la producción de biomasa (peso).

En explantes *ex vitro* se obtuvo valores más bajos debido a la reducción del material vegetal por contaminación; siendo, el mejor tratamiento el 3 (5,0 ANA mg/L + 0,5 KIN mg/L) que desarrollo 26,67 % de estructuras callogénicas. Dentro de los resultados obtenidos se logró la formación de callos alrededor de 14,67 % con el medio de cultivo suplementado con ANA y KIN en diferentes concentraciones; estos resultados discrepan con los obtenidos por Guartanza (2019) quien obtuvo un 73,30 % de formación de callos adicionando otro tipo de auxina 3,00 mg/L 2,4-D + 0,50 mg/L KIN en explantes *ex vitro* de *C. officinalis*. De igual forma, Pinta et al. (2016) obtuvo 35,56 % de formaciones callogénicas adicionando al medio de cultivo 1 mg/L de 2,4-D en *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch.; a diferencia, Díaz (2012) en *Cedrela montana* Moritz ex Turcz., registro el 80 % de formación de callos agregando al medio de cultivo 2 mg/L de 2,4- D.

La baja formación de callos en los explantes *ex vitro* se atribuye principalmente a la contaminación, que redujo el material vegetal disponible para el cultivo, por lo que se vio en la necesidad de retirar unidades experimentales contaminadas para evitar la propagación de la contaminación y garantizar resultados precisos. De la misma forma, se debe tomar en cuenta que en los tratamientos 1 y 2 los callos formados no crecieron o desarrollaron el mismo tamaño en comparación a los tratamientos 3 y 4 que tenían dosis más altas del balance hormonal auxina-citoquinina. Otros factores a tomar en cuenta es la edad del explante (hojas jóvenes de plántulas aproximadamente con 6 meses de edad) y tipo de explante que pueden ser yemas, partes de hojas, porciones de raíces y semillas (García et al., 2015).

Por otro lado, resulta relevante resaltar la variación cromática presentada por los callos observados en material *in vitro*, los cuales exhibieron tonalidades de crema, café y café claro; siendo, más predominante el color crema con 14,5 %, seguido del color café con 11 % y 5 % de

los callos mostraron una tonalidad café claro. Estos resultados se obtuvieron mediante la aplicación de diferentes dosis de ANA y KIN bajo condiciones de oscuridad total.

En explantes *ex vitro* se presentó el color crema y café en los callos; en los cuales las dos tonalidades tuvieron valores semejantes en los tratamientos 3 y 4; a diferencia del T1 que se observó solo en color crema y el T2 callos de color café, resultados similares a los reportados por Camacho (2023) con callos color crema, carmelita y café en condiciones de fotoperiodo y oscuridad con mayores valores en el color crema en *C. officinalis*. Rodríguez et al. (2014) mencionan que el color del callo es un indicador en respuesta organogénica y embriogénica de la formación callogénica.

El color de los callos puede verse influenciado por ciertos factores como la intensidad de la luz, el tipo de explante y auxina-citoquinina utilizadas (Espinosa et al., 2012). En este sentido, Eras et al. (2019), llevaron cabo un estudio con vitroplantas de *C. officinalis* aplicando una concentración de 1,0 mg/L de ANA, logrando obtener un 78 % de callos con tonalidad crema y 22 % con tonalidad carmelita.

La friabilidad de los callos permite la fácil división celular; sin embargo, aunque no todos los callos analizados en este estudio mostraron friabilidad. Los explantes *in vitro* formaron 66,67 % de callos friables; a diferencia, de *ex vitro* que tuvieron un 12,5 % de formación de callos. A pesar de tener un menor porcentaje los callos *ex vivo* registraron mejores características de friabilidad al ser observados bajo el estereoscopio, ambos tipos de material vegetal fueron sometidos a condiciones de oscuridad total para mejorar su friabilidad .

Martínez et al. (2007), en su estudio para establecer un protocolo para la obtención de callos friables de borjón utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D por 45 días de monitoreo bajo condiciones de oscuridad y luz. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas, entre los tratamientos concluyendo que la friabilidad de los callos formados es similar con un promedio de 16 callos friables. Por otro lado, Guartanza (2019), reporto resultados superiores en cuanto a friabilidad de callos en *C. officinalis* utilizando material *ex vitro* y aplicando diferentes dosis de auxina 0,0 y 3,0 mg/L de 2,4-D y citoquinina 0,0 y 0,5 mg/L de KIN, logrando un 100 % de callos friables.

En los explantes *in vitro*, se observó una mayor formación promedio de raíces en el tratamiento 4, que fue suplementado con 10,0 mg/L ANA + 0,5 mg/L KIN, seguido por los tratamientos 3 y 1 con diferentes dosis. Sin embargo, el tratamiento 2 no presento formación de

raíces durante el periodo de evaluación de 90 días. En contraste en los explantes *ex vitro*, el tratamiento 3, al que se le adiciono 5,0 mg/L ANA + 0,5 mg/L KIN mostro el mayor promedio de raíces por callo (33), seguido por el tratamiento 4 (28) y el tratamiento 2 con 3 raíces en promedio; Es importante destacar que no todos los callos formados en los diferentes tratamientos presentaron raíces. Espinosa et al. (2012) obtuvieron una formación de raíces del 100 % de raíces abundantes en sus callos al agregar al medio de cultivo 2,0 mg/L de 2,4-D. Además, mencionan que a medida que se incrementó la concentración de auxina mejoro la formación de raíces, observado en limbos foliares, tallos, y peciolo de *Morus alba* L. Por otro lado, Camacho (2023) encontró mejores resultados en la formación de raíces con 40 % en *C. officinalis* al adicionar 1,0 mg/L ANA + 0,0 mg/L KIN.

Los reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo ejercieron una influencia directa en la formación de estructuras callogénicas y raíces tanto en material *ex vitro* como *in vitro* en los cuatro tratamientos, pero en rangos diferentes. Sin embargo, no influyeron en el resto de variables evaluadas. En diferentes regiones del mundo, se ha investigado la formación de estructuras callogénicas en diversas especies leñosas como *Paulownia elongata* en Bolivia obteniendo altos índices de callos con 1,46 brotes por explante *ex vitro* donde el medio de cultivo estaba suplementado con 10,0 mg/L de BA y 0,50 mg/L ANA (Castellanos et al., 2006).

Posteriormente, en Costa Rica se desarrolló un estudio en *Terminalia amazonia* (Gmel.) con el objetivo de establecer un protocolo de cultivo *in vitro*. Se probaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, incluyendo: BA (benciladenina) a 10, 20 y 30 mg/L, Zip (isopenteniladenina) a 10, 20 y 30 mg/L, K (kinetina) a 10, 20 y 30 mg/L y TDZ (tidiazuron) a 0,1; 0,5 y 1 mg/L para inducir la formación de callos. Se encontró que el tratamiento más efectivo fue utilizando BAP a 30mg/L el cual generó brotes (Méndez-Álvarez, 2014).

Al implementar la implantación de tejidos y la formación de estructuras callogénicas, es crucial considerar varios factores ambientales; entre ellos, la temperatura promedio del estudio, mantenida a 23 °C, y la humedad relativa controlada entre 60 y el 70 % son elementos claves. Además, se debe mantener las muestras en oscuridad total para reducir los niveles de oxidación fenólica y aumentar el porcentaje de callos formados, lo que ejerce una influencia directa en los resultados obtenidos. Estos hallazgos no solo proporcionan información valiosa sobre la propagación de *C. officinalis*, sino que también contribuyen a la búsqueda de soluciones alternativas para aumentar sus poblaciones. La aplicación de procesos biotecnológicos para la

propagación plantas es ampliamente reconocida y requerida en la literatura científica; debido al éxito demostrado en la multiplicación de otras especies que presentan bajos porcentajes de reproducción a través técnicas tradicionales.

8. Conclusiones

- Para tener un control más efectivo durante la fase de desinfección de explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L., y optimizar el proceso inicial de la implantación de tejidos, se debe utilizar concentraciones más elevadas de NaClO, permitiendo mejorar la eficacia de la desinfección. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tiempo de inmersión es un factor clave en el control de la contaminación y la fenolización en los tejidos.
- Las concentraciones de los balances hormonales de 10,0 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de KIN para explantes *in vitro*, y 5,0 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de KIN para explantes *ex vitro* fueron las más eficaces en la formación de estructuras callogénicas, lo cual asegura la disponibilidad de material vegetal para la división celular, la multiplicación y enraizamiento de los brotes para su posterior aclimatación y propagación.
- Los diferentes tratamientos aplicados a explantes *ex vitro* como *in vitro* no presentaron diferencias significativas; sin embargo, en explantes *in vitro* se obtuvo mayor porcentaje de callos (71,33) por la baja tasa de contaminación, a diferencia de los explantes *ex vitro* quienes mostraron mayor porcentaje de contaminación por ende la formación de callos fue menor (14,67), siendo clave el control de contaminación para obtener mayor disponibilidad de material *in vitro*.
- El balance hormonal de ANA y KIN tuvo un efecto secundario positivo en la formación de raíces, tanto en explantes *ex vitro* como *in vitro*. Esto sugiere que estas concentraciones específicas de hormonas pueden promover tanto la formación de callos como la formación de raíces en los explantes, lo que puede ser beneficioso para el desarrollo de las plantas en cultivo tanto para material *in vitro* y *ex vitro*.

9. Recomendaciones

- Para mitigar la contaminación en el material vegetal del invernadero, se recomienda la aplicación anticipada de un bactericida y fungicida al menos dos meses antes de llevar a cabo las pruebas de laboratorio, asegurando así un ambiente más controlado y libre de patógenos.
- Evaluar las variables de contaminación y fenolización en diferentes unidades experimentales, con la finalidad de evitar sesgos en la información recopilada durante el monitoreo en el laboratorio. Esto garantizará la fiabilidad de los resultados obtenidos y una interpretación más precisa de los datos sin sesgo de información al momento de realizar el seguimiento a nivel de laboratorio.
- En relación a la cisteína se recomienda aplicar dosis superiores a 80 mg/L en explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L para reducir los niveles de oxidación, dado que esta especie tiende a liberar altos niveles de fenoles en respuesta a cualquier amenaza, una dosis más elevada de cisteína puede ser más efectiva para contrarrestar la fenolización del tejido.
- En una futura investigación se sugiere trabajar con concentraciones superiores a los 0,5 mg/L de kinetina a incrementar el desarrollo de la organogénesis, y de igual forma para inducir la formación de brotes de *novo* a partir de estructuras callogénicas de explantes de *Cinchona officinalis* L.
- En las siguientes investigaciones se recomienda la identificación de agentes contaminantes, para tener un control más eficiente sobre los mismos y de esta forma, reducir los niveles de contaminación en explantes *ex vitro* de la especie al trabajar en condiciones de asepsia.

10. Bibliografía

- Andrade, A., Gómez, L., Torres, Y. y Aguilera-Arango, G. (2021). Evaluación de medios de cultivo para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Mora (*Rubus glaucus* Benth.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 37(2), 117-127. <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-14emag40014>
- Aymard, G. (2019). Breve reseña de los aspectos taxonómicos y nomenclaturales actuales del género *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43, 234-241. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1079>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Rosales, Y., Pifferrer, A., Rodríguez, L., Candillo, R., Santiago, Y., y Igarza, J. (2006). Cultivo de Células y Tejidos. *Biotecnología Vegetal*, 6(2). ISSN 2074-8647
- Burneo, S. (2009). Megadiversidad. *Letras Verdes: Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales*, (3), 6-7. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5444055>
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A y Alvarado-Huaman, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2):150-164. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200150>
- Camacho, J. (2023). *Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de Cinchona officinalis L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/26058>
- Campos, J., Arteaga, M., Campos, S., Chico, J, y Cerna, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>
- Caraguay-Yaguana, K., Eras-Guaman, V., Gonzalez-Zaruma, D., Moreno-Serrano, J., Universidad Politécnica de Madrid., Minchala-Patiño, J., Yaguana-Arevalo, M., y Valarezo-Ortega, C. (2016). Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L.,

- provenientes de relictos boscosos en la Provincia de Loja–Ecuador. *Revista Investigaciones Altoandinas*, 18(3), 271-280.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA, Uruguay*. <http://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Correa, J. (2024). *Procesos biotecnológicos para determinar el efecto de las auxinas y citoquininas, en la inducción de estructuras organogénicas de Cinchona officinalis L., a partir de formaciones callogénicas*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/29216>
- Díaz, G. (2012). *Procesos morfogénicos in vitro de Cedro (Cedrela montana Mortiz ex Turcz.) Inducidos a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5343>
- Díaz, M., Rodas, J., González, y Vera, M. (2020). Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. *Biotecnología Vegetal*, 20(3), 203-210.
- Duque, J. (2010). Biotecnología. *Netbiblo*. <https://bit.ly/3S1PWYG>
- Eras-Guamán, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R. y Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 58-68. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/586/525>
- Eras-Guamán, V., Moreno-Serrano, J., Méndez-Montaña, K., Yaguana-Arévalo, M., y Angamarca, R. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de *novo* de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 20-28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/682>
- Eras-Guamán, V., Moreno-Serrano, J., Yaguana-Arévalo, M., Angamarca, R., y Guartanza-Loja, J. (2020). Inducción *in vitro* de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 10(1), 14-28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/714>

- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo, L., y Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-416.
- Feijoó, C., Espinoza, F., Cueva, M., Hidalgo, F., Ramón, D., Jumbo, J., Moreno, J., Yaguana, M., Eras-Guamán, V., y Pucha-Cofrep, D. (2019). Propiedades físicas y características anatómicas de la madera de *Cinchona officinalis* (L.) Ruiz y *Cinchona macrocalyx* Pav. ex DC en relictos boscosos al sur de Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 94-109. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/590>
- Galeano, V. (2009). *Uso de plantas medicinales: para prevenir y curar algunas enfermedades*. AHYAT.
- García, D., Ocampo, M., y Mesa, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>
- García, M., Quintero, R., y López, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa. (quinta reimpresión)
- Garmendia, A. (2005). El árbol de la quina (*Cinchona* spp.), distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. *Loja, Ecuador: Editorial Universidad Técnica Particular de Loja*.
- González, K., Eras, V., Moreno, J., Minchala, J., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2018). Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja, Ecuador. *Tzhoeco*, 10(2), 299-312.
- Guamán, P. (2014). *Identificación de Hongos Micorrizicos Arbustales en plantas de Cinchona spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja*. [Tesis pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja]. Repositorio Digital. <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/9108>
- 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*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital

- Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/simple-search?query=ESSICA+ALEJANDRA+GUARTANZA>
- Gutiérrez-Mora, A. (2021). *Biotecnología Vegetal*. Gobierno de México. <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>
- Huamán, L., Albán, J., y Chilquillo, E. (2019). Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la Quina (*Cinchona officinalis* L.) en el Norte de Perú. *Ecología Aplicada*, 18(2), 145-153.
- International Union for Conservation of Nature [IUCN]. (2012). *IUCN Red List Categories and Criteria*. Version 3.1, Second edition. Gland, Switzerland and Cambridge, UK
- Laguna-Ibarra, Y., Cueva-López, J., Tamariz-Angeles, C., y Olivera-Gonzales, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *senecio calvus* (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(2), 111-121. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.455>
- Laya, A., Gómez, P., Yacuzzi, F., y Manuel, J. (1994). Conceptos Básicos del cultivo de tejidos vegetales. *Revista de economía pública, social y cooperativa: Vol. 22* (Issue 45, 653–673). <https://ucema.edu.ar/publicaciones/download/documentos/224.pdf>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C. y Navarrete, H. (2019). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/andes/>
- Lima, N., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., González, D., Yaguana, M., y Valarezo, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169-178. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.361>
- López, J., y Botero, L. (2015). Cultivo *in vitro* de la especie forestal amenazada *Peltogyne purpurea* Pittier. *Universidad Nacional de la Plata*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/58549>
- López, N. (2016). Evaluación del paisaje y recursos escénicos después de 350 años de explotación de la “cascarilla” o “quina” *Cinchona officinalis* L.(Rubiaceae) en el sector Cajanuma-Rumishitana, Ecuador. *Arnaldoa*, 23(2).

- Madsen, J. (2002). Historia cultural de la cascarilla de Loja, Botánica austro ecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. *Ediciones Abya Yala*, Quito-Ecuador. 385-399p.
- Marcelo-Bazán, F., y Baselly-Villanueva, J. (2022). Evaluación de la fenología de la *Cinchona officinalis* L. en la zona de amortiguamiento del bosque de protección de Pagaibamba. *Revista de investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 2(4), 32-40. <https://doi.org/10.25127/riagrop.20224.879>
- Martínez, M., Hernández, C., y Restrepo, L. (2007). Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2), 45-55. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77690205.pdf>
- Medina, J., y catarí, E. (2022). Caracterización química de la corteza del árbol de la Quina (*Cinchona officinalis*) para su consideración como materia prima lignocelulósica. *Ciencia en Revolución*, 8(23), 36-59. <https://cienciaenrevolucion.com.ve/index.php/cienciaenrevolucion/article/view/60>
- Méndez-Álvarez, D., y Abdelnour-Esquivel, A. (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7-21. <https://doi.org/10.18845/rfmk.v11i27.1774>
- Miguel-Luna, M., Enríquez-del Valle, J., Santos-Romero, R., y Rodríguez-Ortiz, G. (2022). La morfogénesis en la propagación asexual, con énfasis en cultivo de tejidos vegetales. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 9(1), 137-147. ISSN: 2007-9559
- Minga, M. (2023). *Enraizamiento hidropónico e in vivo de cinchona officinalis l., a partir de plántulas ex vitro*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/27609>
- Muñoz, N. (2021). *Cinchona officinalis en la homeopatía y la fitoterapia: una investigación historiográfica*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Digital - <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81121>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497.

- Osuna, F., Osuna, A., y Fierro, Á. (2016). *Manual de propagación de plantas superiores*. México.
- Ochoa, F. (2014). *Efecto de tres dosis de ácido indolbutírico (aib) y tres concentraciones de sales, sobre el enraizamiento crecimiento y rendimiento de micro-esquejes de dos variedades de papa (Solanum tuberosum L.) en condiciones de invernadero*. [Tesis de pregrado, Centro Universitario San Carlos]. Repositorio Digital - Centro Universitario San Carlos. <https://n9.cl/pt400>
- Takahashi, J., y PERUBAMBU. (2006). El bambú en América Latina: pasado, presente y futuro. *Bambú para el Medio Ambiente, el Desarrollo y el Comercio*, 4-12. <https://n9.cl/ex8x7>
- Petit-Aldana, J., Padilla-Baretic, A., Padilla-Baretic, D., y Castillo-Ojeda, M. (2005). Siembra directa con *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Para producción de forraje en el jardín botánico Carlos Liscano, Mérida, Venezuela. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 11(1), 33-38.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/1516>
- Pinta, D., Eras, V., González, D., Moreno, J., Minchala, J., Yaguana, M., Poma, R., Valarezo, C., y Sinche-Freire, M. (2016). Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Bursera graveolens* (kunth) triana & planch (palo santo), provenientes del bosque seco de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 6(1). <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/178>
- Pucha, D., Rodríguez, J., Rey, Y., Macas, M., Aguinaca, F., y Chocho, A. (2020). El consumo de *Cinchona officinalis* L. durante la emergencia sanitaria COVID-19 en la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 161–174.
- R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez, L., Granados, J., y Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro*. *Dialnet*. 5(1), 1-15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5344976>

- Reyes, J. (2015). *Guía de Técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas*. Santo Domingo- República Dominicana.
- Roca, W., y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf
- Rodrigues, M., Alvés, M., y Barros, R. (2014). Callogénesis en segmentos de hojas de *Mammea americana* L. Cultivo celular y micropropagación de células vegetales. *Plant Cell Cult. Micropropag*, ISSN 1808-9909 10(1), 1-6. <http://177.105.2.193/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/52>
- Rodríguez, M., Latsague, M. I., Chacón, M., y Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Rodríguez-Layza, J., Gonzales-Arteaga, J., Romero-Rivas, L., y Párraga-Quintanilla, A. (2021). Establecimiento *in vitro* de café var. caturra roja a partir de microesquejes. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(5), 8132-8148. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i5.894
- Romero, J. (2015). Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1-2), 27-35. <https://doi.org/10.26807/remcb.v36i1-2.261>
- Rueda, J. (2020). *Procesos biotecnológicos para la inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de vitroplantas de cinchona officinalis l., de relictos boscosos de la provincia de Loja*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/23649>
- Sánchez-Calvo, L., y Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.
- Sharry, S. (2015). *Plantas de probeta*. Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

- Segretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, 2, 5-8.
- Solbrig, O. (2004). Ventajas y desventajas de la agrobiotecnología, en: *Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto-LC/G. 2227-P-2004*. 33-69.
- Suarez, I. (2020). *Cultivo De Tejidos Vegetales*. In Fondo editorial, Universidad de Córdoba, Cra. 6 N°. 77 -305 Montería Colombia. ISBN 978-958-5104-09-9
- Suárez, I., Acosta, C. y Gatti K. (2013) *In vitro* multiplication of *Gmelina arborea* Roxb. Adult trees. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* , 16 (1), 97-102. ISSN 0123-4226
- Tapia, J. (2013). *Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de Quina (Cinchona officinalis) en el Cantón Loja* [Tesis pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio Digital - Universidad San Francisco de Quito. <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2482>
- Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. *Botánica económica de los Andes Centrales. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés*, 313-328. <https://www.mobot.org/mobot/research/curators/pdf/Aromas.pdf>
- Vertedor, D., Nevado, F., y Adámez, J. (2017). La biotecnología como herramienta de desarrollo del sector agroalimentario de extremadura. *Dialnet*, 223-236. <https://www.unex.es/conoce-la-uex/centros/eia/archivos/iag/2016/2016-11-la-biotecnologia-como-herramienta-de.pdf>
- Zevallos, P. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Perú*. Lima-Perú: DC-UNALM.

11. Anexos

Anexo 1. Proyectos de investigación realizados en biotecnología vegetal con la especie *Cinchona officinalis* L.

N°	Tema	Año	Objetivos
1	Sistematización bibliométrica de las investigaciones realizadas sobre cultivo de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la Universidad Nacional de Loja	2022	<ul style="list-style-type: none"> - Sistematizar la información generada de investigaciones realizadas en cultivos de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L., en la Universidad Nacional de Loja - Realizar un análisis crítico comparativo de las metodologías implementadas en las investigaciones sobre cultivo de tejidos vegetales de <i>Cinchona officinalis</i> L.
2	Formación de estructuras calogénicas en explantes obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad	2023	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar el efecto del fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y la combinación hormonal auxina– citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. - Evaluar el efecto de la total oscuridad y la combinación hormonal auxina– citoquinina, para la inducción de estructuras calogénicas de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.
3	Enraizamiento hidropónico e in vivo de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de plántulas <i>ex vitro</i>	2023	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluar el enraizamiento hidropónico de microestacas de <i>Cinchona officinalis</i> L., obtenidos de plántulas <i>ex vitro</i>, utilizando diferentes concentraciones hormonales y un enraizador comercial. - Determinar el efecto de diferentes combinaciones hormonales y de un enraizador comercial, para el enraizamiento in vivo de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de microestacas obtenidas de plántulas del invernadero.
4	Proceso morfogénico para la inducción de estructuras de novo, a partir de callos obtenidos de vitroplantas de <i>Cinchona officinalis</i> L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad	2023	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar el efecto del fotoperíodo y dos citoquininas, para la inducción de brotes de novo de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas. - Evaluar el efecto de la oscuridad y dos citoquininas, para la inducción de brotes de novo de <i>Cinchona officinalis</i> L., a partir de vitroplantas.

Anexo 2. Script de análisis de varianza.

```
## Análisis estadístico para las diferentes variables

# Cargar los paquetes

library(tidyverse)

library(ggpubr)

library(rstatix)

library(ggplot2)

library(graphics)

setwd("D:/Home/Documents/Tesis")

# Conjunto de datos

datos <- read.csv("BD_F.csv", header= TRUE, dec=".", sep=";")

head(datos)

modelo <- aov(datos$Valor~datos$Tipo, data = datos)

summary(modelo)

shapiro.test(modelo$residuals)

bartlett.test(datos$Valor~datos$Tipo, data = datos)

TukeyHSD(modelo)

plot(TukeyHSD(modelo))

graphics.off()

citation()
```

Anexo 3. Análisis de datos de explantes *ex vitro* contaminados de *Cinchona officinalis* L., primer objetivo.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  3   5967    1989    6.63 0.0146 *
Residuals  8   2400     300
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.94007, p-value = 0.4989

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 1.256, df = 3, p-value = 0.7396

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T2-T1 -33.33333   -78.62143   11.95476  0.1638026
T3-T1 -60.00000  -105.28810  -14.71190  0.0120685
T4-T1 -46.66667   -91.95476   -1.37857  0.0436017
T3-T2 -26.66667   -71.95476   18.62143  0.3054963
T4-T2 -13.33333   -58.62143   31.95476  0.7837632
T4-T3  13.33333   -31.95476   58.62143  0.7837632
```

Anexo 4. Análisis de datos de explantes *ex vitro* fenolizados de *Cinchona officinalis* L., primer objetivo.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  3  3233  1077.8    2.12  0.176
Residuals   8  4067   508.3
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.93023, p-value = 0.3825

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 5.2732, df = 3, p-value = 0.1529

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T2-T1  3.666667e+01 -22.28522  95.61856  0.2668688
T3-T1  4.000000e+01 -18.95189  98.95189  0.2102996
T4-T1  3.666667e+01 -22.28522  95.61856  0.2668688
T3-T2  3.333333e+00 -55.61856  62.28522  0.9977136
T4-T2  7.105427e-15 -58.95189  58.95189  1.0000000
T4-T3 -3.333333e+00 -62.28522  55.61856  0.9977136
```

Anexo 5. Análisis de datos de explantes *ex vitro* contaminados de *Cinchona officinalis* L., segundo objetivo.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  4    240    60.0    0.22  0.921
Residuals 10   2733   273.3
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.89909, p-value = 0.09216

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 4.3055, df = 4, p-value = 0.3662

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff      lwr      upr      p adj
T1-T0  -10 -54.42622  34.42622  0.9416743
T2-T0  -10 -54.42622  34.42622  0.9416743
T3-T0  -10 -54.42622  34.42622  0.9416743
T4-T0  -10 -54.42622  34.42622  0.9416743
T2-T1   0 -44.42622  44.42622  1.0000000
T3-T1   0 -44.42622  44.42622  1.0000000
T4-T1   0 -44.42622  44.42622  1.0000000
T3-T2   0 -44.42622  44.42622  1.0000000
T4-T2   0 -44.42622  44.42622  1.0000000
```

Anexo 6. Análisis de datos de explantes *ex vitro* fenolizados de *Cinchona officinalis* L., segundo objetivo.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  4   1067    266.7   1.176  0.378
Residuals 10   2267    226.7
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.96286, p-value = 0.7419

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 3.6823, df = 4, p-value = 0.4507

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T1-T0 -3.333333 -43.78970  37.12304  0.9985985
T2-T0 -20.000000 -60.45637  20.45637  0.5141296
T3-T0 -6.666667 -47.12304  33.78970  0.9804815
T4-T0 -20.000000 -60.45637  20.45637  0.5141296
T2-T1 -16.666667 -57.12304  23.78970  0.6660706
T3-T1 -3.333333 -43.78970  37.12304  0.9985985
T4-T1 -16.666667 -57.12304  23.78970  0.6660706
T3-T2  13.333333 -27.12304  53.78970  0.8104579
T4-T2  0.000000 -40.45637  40.45637  1.0000000
```

Anexo 7. Análisis de datos de explantes con callo *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  3  566.7   188.9    0.687  0.585
Residuals  8 2200.0    275.0
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.92021, p-value = 0.2877

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 1.1219, df = 3, p-value = 0.7718

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff      lwr      upr      p adj
T2-T1  3.333333 -40.02672  46.69338  0.9943348
T3-T1 16.666667 -26.69338  60.02672  0.6263060
T4-T1 13.333333 -30.02672  56.69338  0.7619318
T3-T2 13.333333 -30.02672  56.69338  0.7619318
T4-T2 10.000000 -33.36005  53.36005  0.8789703
T4-T3 -3.333333 -46.69338  40.02672  0.9943348
```

Anexo 8. Análisis de datos del número de raíces por callo explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo    4   3249    812.3    2.079  0.159
Residuals    10   3907    390.7

> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.83525, p-value = 0.01081

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = Inf, df = 4, p-value < 2.2e-16

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T1-T0  1.065814e-14  -53.11697  53.11697  1.0000000
T2-T0  2.666667e+00  -50.45031  55.78364  0.9998010
T3-T0  3.333333e+01  -19.78364  86.45031  0.3047403
T4-T0  2.800000e+01  -25.11697  81.11697  0.4568648
T2-T1  2.666667e+00  -50.45031  55.78364  0.9998010
T3-T1  3.333333e+01  -19.78364  86.45031  0.3047403
T4-T1  2.800000e+01  -25.11697  81.11697  0.4568648
T3-T2  3.066667e+01  -22.45031  83.78364  0.3759027
```

Anexo 9. Análisis de datos de explantes contaminados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  3  100.0   33.33      1  0.441
Residuals   8  266.7   33.33
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.65002, p-value = 0.0002898
> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = Inf, df = 3, p-value < 2.2e-16
> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr      p adj
T2-T1 -1.110223e-15 -15.096032  15.096032  1.0000000
T3-T1  6.666667e+00  -8.429365  21.762699  0.5252407
T4-T1 -8.881784e-16 -15.096032  15.096032  1.0000000
T3-T2  6.666667e+00  -8.429365  21.762699  0.5252407
T4-T2  2.220446e-16 -15.096032  15.096032  1.0000000
T4-T3 -6.666667e+00 -21.762699   8.429365  0.5252407
```

Anexo 10. Análisis de datos de explantes fenolizados *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  4  10467   2616.7    9.812 0.00172 **
Residuals  10   2667    266.7
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.92894, p-value = 0.2631

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = Inf, df = 4, p-value < 2.2e-16

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr      p adj
T1-T0 -56.666667 -100.54776 -12.785571 0.0114303
T2-T0 -36.666667  -80.54776   7.214429 0.1148078
T3-T0 -66.666667 -110.54776 -22.785571 0.0037958
T4-T0 -73.333333 -117.21443 -29.452237 0.0018870
T2-T1  20.000000  -23.88110  63.881096 0.5845793
T3-T1 -10.000000  -53.88110  33.881096 0.9392109
T4-T1  16.666667   60.54776  27.214429 0.7248168
```

Anexo 11. Análisis de datos de explantes con callo *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  3  491.7   163.9   1.093  0.406
Residuals  8 1200.0   150.0
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-wilk normality test

data:  modelo$residuals
w = 0.96231, p-value = 0.8163

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = 3.5505, df = 3, p-value = 0.3143

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T2-T1 -6.666667 -38.69019  25.35685  0.9067148
T3-T1 -13.333333 -45.35685  18.69019  0.5692846
T4-T1  3.333333 -28.69019  35.35685  0.9862918
T3-T2 -6.666667 -38.69019  25.35685  0.9067148
T4-T2 10.000000 -22.02352  42.02352  0.7538411
T4-T3 16.666667 -15.35685  48.69019  0.3982901
```

Anexo 12. Análisis de datos del número de raíces por callo explantes *in vitro* de *Cinchona officinalis* L.

```
> summary(modelo)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
datos$Tipo  4 12172  3042.9   10.41 0.00137 **
Residuals 10  2923   292.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> shapiro.test(modelo$residuals)

      Shapiro-wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.88714, p-value = 0.06072

> bartlett.test(datos$valor~datos$Tipo, data = datos)

      Bartlett test of homogeneity of variances

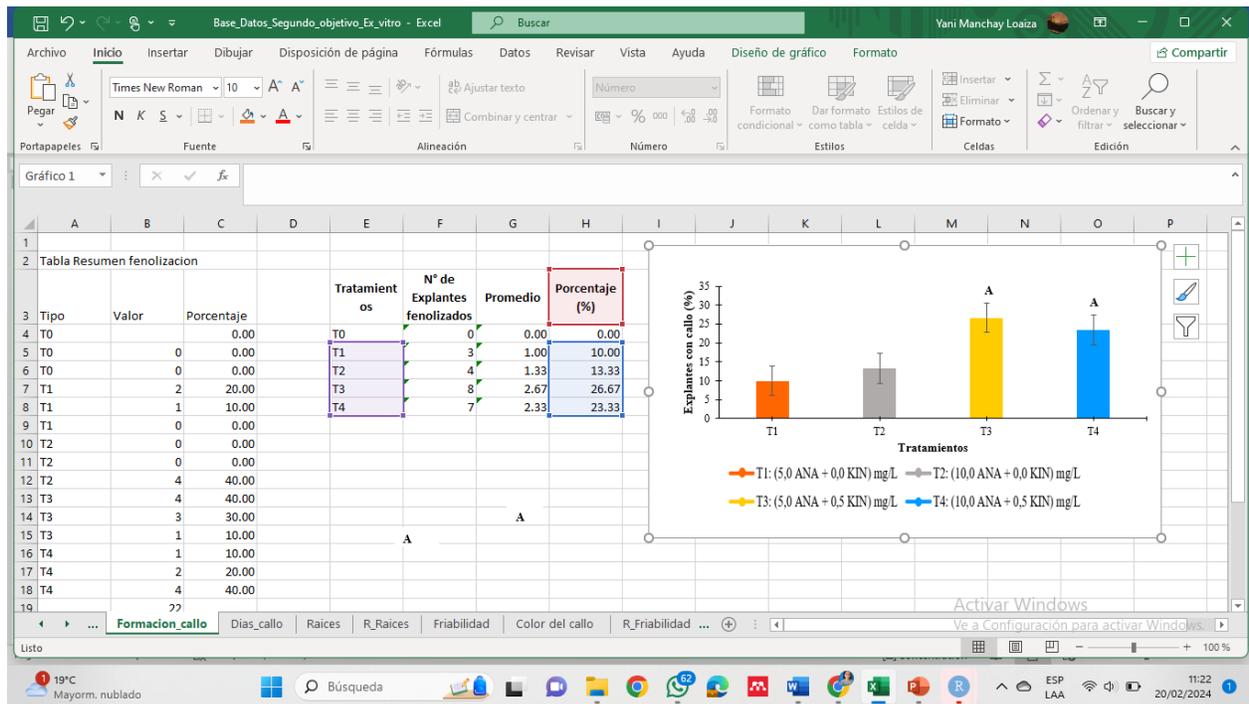
data:  datos$valor by datos$Tipo
Bartlett's K-squared = Inf, df = 4, p-value < 2.2e-16

> TukeyHSD(modelo)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

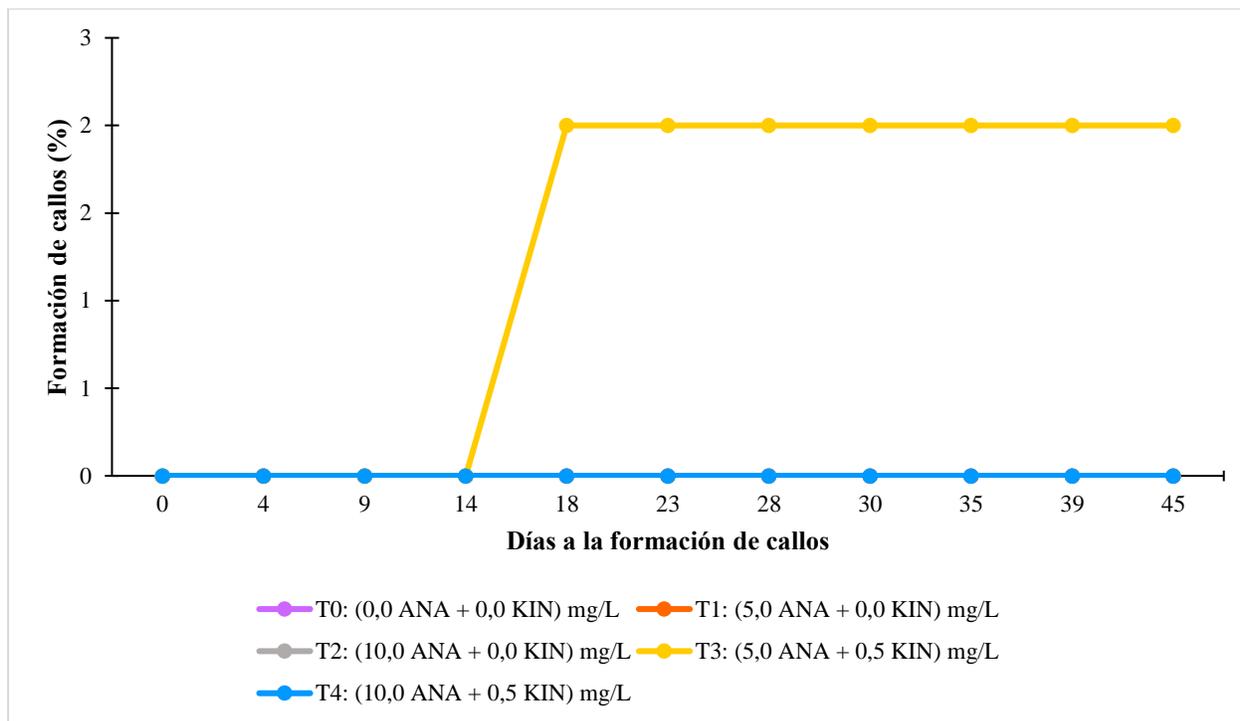
Fit: aov(formula = datos$valor ~ datos$Tipo, data = datos)

$`datos$Tipo`
      diff          lwr          upr          p adj
T1-T0  5.666667 -40.27769995  51.61103 0.9933603
T2-T0  0.000000 -45.94436662  45.94437 1.0000000
T3-T0 46.000000  0.05563338  91.94437 0.0496917
T4-T0 69.666667  23.72230005 115.61103 0.0038485
T2-T1 -5.666667 -51.61103329  40.27770 0.9933603
T3-T1 40.333333  -5.61103329  86.27770 0.0929478
T4-T1 64.000000  18.05563338 109.94437 0.0069396
```

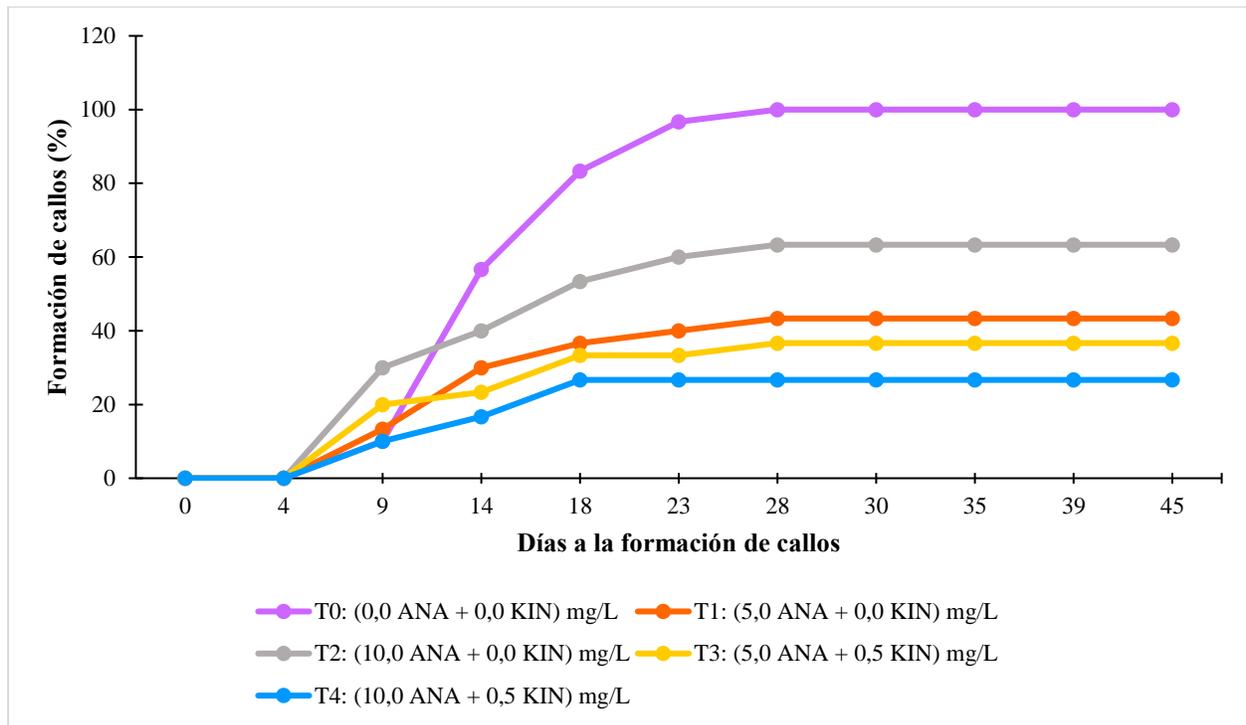
Anexo 13. Análisis de información.



Anexo 14. Días a la contaminación segundo objetivo.



Anexo 15. Días a la fenolización segundo objetivo.



Anexo 16. Certificación de la traducción del Abstrac.



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

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

Loja, 24 de abril de 2024

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

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del resumen del Trabajo de Integración Curricular denominado **Implantación de tejidos e inducción de estructuras callogénicas, a partir de explantes obtenidos de plántulas ex vitro de Cinchona officinalis L.**, cuya autoría de la estudiante Marcia Janina Manchay Loaiza, con cédula 1105479503, estudiante de la Carrera de Ingeniería Forestal, perteneciente a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente

YANINA BELEN QUIZHPE ESPINOZA
Firmado digitalmente por YANINA BELEN QUIZHPE ESPINOZA
Fecha: 2024.04.24 21:46:17 -05'00'

Mg. Yanina Quizhpe Espinoza.

Traductora freelance

Full text translator: servicios de traducción