

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



Establecimiento y multiplicación *in vitro* a partir de semillas *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* Vahl (quina) con fitoreguladores y medios de cultivo nutritivos

Tesis presentada por el Bachiller:

Echegaray Calderon, Hugo David

ORCID: 0009-0007-7291-824X

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor (a):

Mg. Bardales Álvarez, Roxana Margarita

ORCID: 0000-0002-5137-4067

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 16 de Enero del 2024

Dictamen: 007689-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 007689, presentado por:

2010221591 - ECHEGARAY CALDERON HUGO DAVID

Titulado:

**ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN IN VITRO A PARTIR DE SEMILLAS CINCHONA
OFFICINALIS L. Y CINCHONA PUBESCENS VAHL (QUINA) CON FITOREGULADORES Y MEDIOS
DE CULTIVO NUTRITIVOS**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



**43679772 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



Establecimiento y multiplicación in vitro a partir de semillas *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* Vahl (quina) con fitoreguladores y medios de cultivo nutritivos

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	8 %
2	core.ac.uk Fuente de Internet	2 %
3	repositorio.unj.edu.pe Fuente de Internet	2 %
4	docplayer.es Fuente de Internet	2 %
5	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	2 %
6	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
7	erp.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1 %
8	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1 %

Dedicatoria

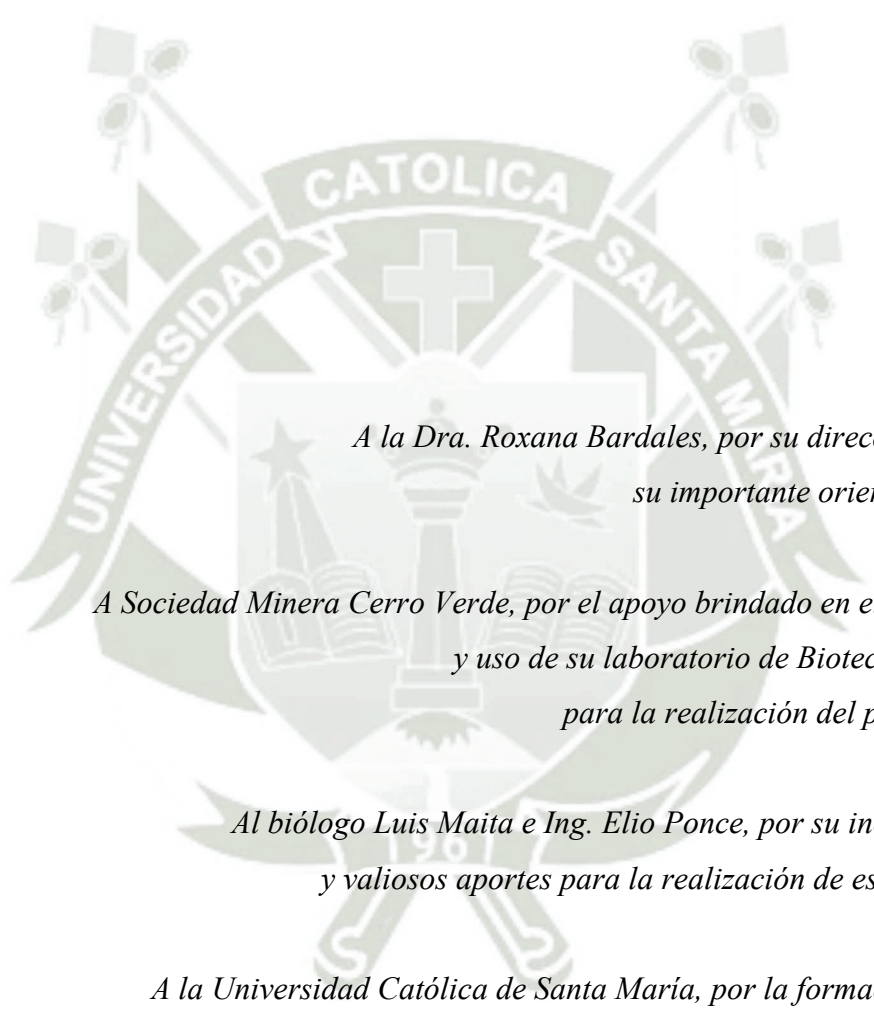
*Con mucho amor para Alba Sophia, mi lienzo y pincel para retratar la belleza de la vida.
Este trabajo va dedicado a Dios y la Virgen por guiarme e iluminarme, a mi abuelita, mis
padres y mis hermanos, por ser la definición de amor y apoyo, tenerme paciencia y siempre
acompañarme en este camino.*

*A Stephanie, por creer en mí, motivarme, por apoyarme y darme palabras de aliento para
seguir adelante.*

¡Con cariño para ustedes!

Hugo David Echegaray Calderón

Agradecimientos



*A la Dra. Roxana Bardales, por su dirección académica,
su importante orientación y apoyo.*

*A Sociedad Minera Cerro Verde, por el apoyo brindado en el financiamiento
y uso de su laboratorio de Biotecnología Vegetal
para la realización del presente trabajo.*

*Al biólogo Luis Maita e Ing. Elio Ponce, por su inestimable apoyo
y valiosos aportes para la realización de esta investigación*

A la Universidad Católica de Santa María, por la formación profesional

A mi familia, por sus diversas formas de apoyo incondicional.

RESUMEN

Los árboles de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl son especies endémicas y nativas de los Andes (Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala), que fueron explotadas desde el siglo XVII debido a sus propiedades medicinales. En su corteza contienen quinina y otros metabolitos secundarios, y fueron explotadas hasta el siglo XIX. Actualmente, y por acción antrópica, se ha intervenido su hábitat natural, lo cual ha afectado su regeneración natural. Teniendo en cuenta que representa al reino vegetal dentro del escudo nacional del Perú, es necesario buscar nuevos métodos de conservación para esta especie. Es por tal motivo que se realizó el presente trabajo de investigación con el objetivo de lograr el establecimiento y multiplicación in vitro de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl (Quina) con fitoreguladores y medios de cultivo nutritivos.

Para estandarizar el método de desinfestación para el establecimiento in vitro de semillas, se obtuvo como mejor resultado que al aplicar hipoclorito de sodio al 2.5% durante 10 minutos no se obtuvo contaminación de semillas. Para evaluar el efecto de la concentración de ácido giberélico en la germinación in vitro utilizando medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) sin hormonas, se obtuvo el mayor valor de germinación de 80% de *C. officinalis* L. y el valor de 3.33% de germinación para semillas de *C. pubescens* Vahl con medio Murashige & Skoog + 20 μM de AG3. Debido al bajo valor de germinación de *C. pubescens* Vahl en la prueba con ácido giberélico, se decidió realizar una prueba de pre-germinación con un remojo durante 24 horas en KNO_3 con tres diferentes concentraciones (0, 500 y 1000 ppm) y su posterior inoculación en medio Murashige & Skoog sin hormonas. Se obtuvo el valor de 10% de germinación de semillas de *C. pubescens* Vahl. En la fase de multiplicación, se decidió evaluar el efecto del medio de cultivo en la tasa de multiplicación in vitro y determinar el efecto de la combinación de reguladores hormonales en plántulas de *C. officinalis* L. Se obtuvo que el mejor medio de cultivo es el Murashige & Skoog (1962) utilizando la combinación hormonal 0.25 μM ANA + 5 μM BAP. Los resultados fueron: tamaño del tallo 17.8 mm, número de hojas 15.3, número de nudos 7.65 y tamaño de brotes 7.07 mm. En conclusión, la micropropagación de *C. officinalis* L. fue exitosa y servirá como base para otras investigaciones relacionadas con este tema.

Palabras claves:

Cinchona, fitoreguladores, micropropagación.

ABSTRACT

The trees of *C. officinalis* L. and *C. pubescens* Vahl are endemic and native species of the Andes (Peru, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala), exploited since the 17th century due to their medicinal properties. Their bark contains quinine and other secondary metabolites and was exploited until the 19th century. Currently, due to anthropogenic activities, their natural habitat has been intervened, adversely affecting their natural regeneration. Given their representation of the plant kingdom within the national emblem of Peru, it is imperative to explore novel conservation methods for these species. Hence, this research was undertaken with the aim of establishing in vitro cultivation and propagation of seeds from *C. officinalis* L. and *C. pubescens* Vahl (Quina) using phyto-regulators and nutrient-rich culture media.

To standardize the seed establishment in vitro, the optimal result involved applying 2.5% sodium hypochlorite for 10 minutes, preventing seed contamination. Assessing the impact of gibberellic acid concentration on in vitro germination using Murashige & Skoog (1962) culture medium without hormones yielded an 80% germination rate for *C. officinalis* L. and 3.33% for *C. pubescens* Vahl with Murashige & Skoog + 20 μM AG3. Due to the low germination rate of *C. pubescens* Vahl in the gibberellic acid test, a pre-germination trial was conducted, involving a 24-hour soak in KNO_3 with three concentrations (0, 500, and 1000 ppm), followed by inoculation in Murashige & Skoog medium without hormones, resulting in a 10% germination rate for *C. pubescens* Vahl seeds. In the multiplication phase, the impact of the culture medium on the in vitro multiplication rate and the effect of hormonal regulator combinations on *C. officinalis* L. seedlings were evaluated. The optimal culture medium was Murashige & Skoog (1962) using the hormonal combination of 0.25 μM NAA + 5 μM BAP. Results included a stem size of 17.8 mm, 15.3 leaves, 7.65 nodes, and 7.07 mm shoot size. In conclusion, the micropropagation of *C. officinalis* L. proved successful and will serve as a foundation for further research on this subject.

Key words:

Cinchona, phyto-regulators, micropropagation

ÍNDICE

Dedicatoria

Agradecimientos

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO I:.....	4
1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	4
1.1. ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DEL GÉNERO CINCHONA	5
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	6
1.3. ASPECTOS ECOLÓGICOS	8
1.4. PROPIEDADES	9
1.5. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.....	9
1.6. REPRODUCCIÓN DEL GÉNERO	10

1.7. GERMINACIÓN.....	10
1.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	12
1.9. CATEGORÍA DE AMENAZA.....	12
1.10. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.....	13
1.11. MICROPROPAGACIÓN	13
CAPÍTULO II.....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. MATERIALES.....	28
2.2. MÉTODOS	30
CAPÍTULO III.....	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1. FASE DE ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>C. officinalis</i> L. Y <i>C. pubescens</i> VAHL 40	
3.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>C. officinalis</i> L.....	52
3.3. DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	69

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de <i>C. officinalis</i> L. a) árbol con follaje (7); b) frutos; c) inflorescencia (1); d) Semilla (7).....	7
Figura 2. Morfología de <i>C. pubescens</i> Vahl. a) inflorescencia y hojas; b) frutos; c) flores; d) semillas (11).	8
Figura 3. Semilla de <i>C. officinalis</i> L. con mejores características fenotípicas.....	31
Figura 4. Semilla de <i>C. pubescens</i> Vahl con mejores características fenotípicas.....	32
Figura 5. Semillas agrupadas en conjuntos de 50 unidades para la desinfestación.	33
Figura 6. Batería de desinfestación para semillas de <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl. .	33
Figura 7. Porcentaje promedio de contaminación de los tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl.	42
Figura 8. Frasco con semillas de <i>C. officinalis</i> L. contaminado después del tratamiento de desinfestación.	42
Figura 9. Frasco con semillas de <i>C. pubescens</i> Vahl. contaminado después del tratamiento de desinfestación.	43
Figura 10. Comparación del porcentaje promedio de germinación en los diferentes tratamientos de ácido giberélico aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl.....	44
Figura 11. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG ₃ aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. officinalis</i> L.....	46
Figura 12. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG ₃ aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. pubescens</i> Vahl.....	48
Figura 13. Semillas de <i>C. officinalis</i> L. germinadas	49
Figura 14. Porcentaje promedio de germinación en los diferentes tratamientos aplicados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. pubescens</i> Valh.....	50
Figura 15. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con KNO ₃ aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. pubescens</i> Vahl.....	51
Figura 16. Semillas de <i>C. pubescens</i> Vahl germinadas	52
Figura 17. Promedio de longitud (mm) de tallos tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para <i>C. officinalis</i> L.	53
Figura 18. Promedio de número de hojas por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para <i>C. officinalis</i> L.	54

Figura 19. Promedio de número de nudos por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L. 55

Figura 20. Promedio de longitud de brotes (mm) por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L. 56

Figura 21. Plántula de *C. officinalis* L. en medio de cultivo *Murashige & Skoog* en etapa de multiplicación..... 57

Figura 22. Plántula de *C. officinalis* L. en medio de cultivo *Woody Plant* en etapa de multiplicación..... 57



Índice de tablas

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células vegetales (21).....	17
Tabla 2. Macronutrientes y función en el crecimiento de la planta (17).....	18
Tabla 3. Micronutrientes y función en el crecimiento de la planta (17).	19
Tabla 4. Tratamientos de desinfestación de las semillas en tres tiempos diferentes de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5% para las especies <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl con tres repeticiones cada uno.	32
Tabla 5. Tratamientos de diferentes concentraciones de ácido giberélico en medio <i>Murashige & Skoog</i> (1962) para la germinación de semillas de las especies <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl con tres repeticiones cada uno.....	34
Tabla 6 Diseño completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial 2x3x3.	34
Tabla 7. Tratamientos generados de la combinación entre Especies de <i>Cinchona</i> , tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 2.5% y concentración de ácido giberélico.....	35
Tabla 8. Tratamientos de pre-germinación con remojo durante 24 horas en tres diferentes concentraciones de KNO ₃ para semillas de <i>C. pubescens</i> Vahl, con tres repeticiones cada uno.	36
Tabla 9. Tratamientos para la etapa de multiplicación con tres concentraciones de ANA y tres concentraciones de BAP.....	37
Tabla 10. Diseño completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial 2x7.....	38
Tabla 11. Tratamientos generados de la interacción entre medios de cultivo <i>Murashige & Skoog</i> (1962) y <i>Woody Plant</i> (1981) con siete combinaciones de ANA/BAP para etapa de multiplicación de <i>C. officinalis</i> L.....	38
Tabla 12. Resultados obtenidos en la evaluación de los distintos tratamientos con hipoclorito de sodio 2.5% para semillas de <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl.	40
Tabla 13. Porcentaje de germinación de semillas de <i>C. officinalis</i> L. y <i>C. pubescens</i> Vahl en medio MS (1962) con tres diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG ₃) después de 30 días.	44

INTRODUCCIÓN

El género *Cinchona*, comúnmente reconocido como el árbol de quina o cascarilla, engloba un conjunto de 23 especies pertenecientes a la familia *Rubiaceae*. Estas plantas, caracterizadas por su tendencia a adoptar forma arbórea de tamaño mediano o pequeño, o bien presentarse como arbustos de corteza amarga, prosperan en la región tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes, abarcando desde los 10° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (1).

Género *Cinchona* que se caracteriza principalmente por su contenido de quinina; sustancia que se utilizó durante siglos para curar la malaria, esta especie tiene múltiples beneficios como: estimular el apetito, tonificar el organismo, arritmias cardíacas, crecimiento del cabello y evitar su caída; se utiliza también para combatir el estrés psíquico y físico; por lo tanto, es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica (2). En el Perú, el género *Cinchona* es considerado como uno de los géneros de mayor importancia, por su valor medicinal y cultural (3), en los bosques del pueblo de La Cascarilla se explotó *C. officinalis* L., hasta el siglo XIX, debido a sus propiedades medicinales antes mencionadas, ya que contiene metabolitos secundarios (alcaloides) en su corteza. Tradicionalmente el género *Cinchona* ha sido utilizado con fines medicinales, uso antropogénico y la expansión agrícola, lo cual ha causado una sobreexplotación de la misma, a tal punto que no es fácil encontrar poblaciones de cascarilla, únicamente están ubicadas en lugares apartados y en pequeños relictos boscosos, también se observa que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración natural (4).

Todos estos aspectos resaltan la necesidad de aplicar técnicas alternativas para la propagación sexual y asexual en condiciones de cultivo *in vitro*, como una herramienta para la conservación y rescate de las especies en peligro de extinción (3).

Es por ello, que existe una gran importancia en realizar estudios alternativos que permitan la protección y propagación de la especie, ya que aún no se reporta investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* de *C. officinalis* L. El cultivo de tejidos *in vitro* de dicha especie es un método alternativo que contribuye a obtener plántulas sanas en mayor número, menor espacio y tiempo (2)

HIPÓTESIS

La aplicación de tratamientos adecuados de desinfestación y el uso de fitorreguladores específicos en las fases de germinación y multiplicación influirán positivamente en el establecimiento *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* Vahl, permitiendo un crecimiento inicial eficiente y una posterior multiplicación óptima. De esta manera, será posible diseñar una metodología efectiva para la propagación *in vitro* de ambas especies, contribuyendo al fortalecimiento de estrategias de conservación y aprovechamiento sostenible.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer y multiplicar *in vitro* las semillas de *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* Vahl (Quina) mediante la aplicación de fitorreguladores y medios de cultivo nutritivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el método de desinfestación para el establecimiento *in vitro* de semillas de *C. officinalis* y *C. pubescens*.
2. Evaluar el efecto de la concentración de ácido giberélico en la germinación *in vitro* de *C. officinalis* y *C. pubescens*.
3. Evaluar el efecto del medio de cultivo en la tasa de multiplicación *in vitro* de *C. officinalis*.
4. Determinar el efecto de los reguladores hormonales en etapa de multiplicación *in vitro* de *C. officinalis*.



1.1. ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DEL GÉNERO CINCHONA

El árbol de la “Quina” es el nombre que reciben especies de árboles que representan al género *Cinchona*, los cuales tienen origen en América del Sur, los podemos encontrar en su hábitat natural en los bosques andinos presentes en Perú y Ecuador, pero también se puede encontrar en los bosques de Bolivia, Colombia y Venezuela (1).

Es un árbol muy importante para la civilización occidental, ya que, por sus “maravillosas” cualidades fue conocido como “el árbol de la vida” (2), ha sido utilizada desde el tiempo de los incas para curar fiebres palúdicas, en el siglo XVII, fue considerada como la “salvación de la humanidad”, por ser el remedio contra el paludismo o malaria, gracias a la extracción del sulfato de quinina de su corteza (3). Está clasificada como una de las plantas medicinales de mayor importancia, porque se puede extraer de su corteza quinina y otros compuestos fenólicos similares, que han sido remedios contra la malaria y otras enfermedades infecciosas por más de 300 años. Su uso fue reportado oficialmente en 1649, siendo los jesuitas los primeros que informaron a Europa sus propiedades terapéuticas; fue notable su uso durante las dos últimas guerras mundiales (4).

Desde que se reporta las propiedades antifebriles del polvo de la corteza del árbol de la quina, en la década de 1640 hasta mediados del siglo XVIII, se creía que solo existía una especie de árbol cuya corteza daba la mejor quinina. Este árbol fue descrito por primera vez por Charles Marie de La Condamine, después de visitar Ecuador, donde se encontró con estos árboles en la provincia de Loja en 1738. Carl Von Linneo clasificó y nombró más tarde el género *Cinchona*, en honor a la Condesa de Chinchón, esposa del Virrey del Perú. Según la leyenda, se curó de unas fiebres intermitentes (malaria) gracias a la ingerir una decocción de un macerado de esta planta (5)

El árbol *Cinchona* tiene una importancia cívica para nuestro país, ya que está representado en la esquina superior derecha del escudo nacional, simbolizando la riqueza del recurso botánico del Perú (6). Medicinalmente, el género *Cinchona* incluye varias especies conocidas comúnmente como “cascarilla” o “quina”. Casi todas ellas contienen quinina, un alcaloide de propiedades antipiréticas. La especie más importante en términos de valor medicinal es la *C. officinalis*, cuya corteza produce un promedio de 40% de alcaloides cristalizables y el 1% de sulfato de quinina (4). Se utiliza tanto en prevención y tratamiento de la malaria, como para curar neumonías, ayudar en el parto, mejorar la salud capilar, tratar las arritmias cardíacas, aliviar los calambres y la indigestión, así como para desintoxicar el cuerpo al promover la eliminación de toxinas a través del sudor y la orina (6).

Después de la segunda guerra mundial, las especies de *Cinchona* ganaron prominencia como árboles “maderables” con base en estudios realizados en Ecuador. Su madera fue considerada de alta calidad para tablas y mueblería debido a su durabilidad, ya que resiste el agrietamiento y la descomposición en campo. La madera es de color rosado o carne, con un grano fino o medio y una textura media; es flexible o elástica, lo que la hace ideal para ebanistería, tiene peso específico de 0.58 (579 kilogramo por metro cúbico), su uso fue confirmado en la construcción de viviendas en comunidades como Colasay (Jaén, Cajamarca) y Keromarca (Callacuy, Cutervo, Cajamarca) (4).

Ecológicamente, el género *Cinchona* depende en gran medida de condiciones ambientales específicas. Por ejemplo, se menciona que *C. officinalis* rara vez es una especie dominante en un bosque nublado, pero puede exhibir una amplia gama de formas incluso dentro de sola población. La alta concentración de especies endémicas de *Cinchona* está vinculada a la estabilidad ambiental, en particular al requisito de alta humedad atmosférica, lo que hace que estas plantas sean extremadamente sensibles a las perturbaciones. Estos factores resaltan la necesidad de priorizar los esfuerzos de conservación, ya que pequeños cambios en sus hábitats limitados pueden llevar la extinción de muchas especies (7).

1.2.DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El género *Cinchona* es de origen sudamericano y nativo de los bosques andinos de Perú, y Ecuador donde prosperan silvestremente. Estos árboles prosperan exclusivamente en los bosques densos de montaña exterior de las cordilleras, formando una faja altitudinal entre los 640 hasta los 3200 m.s.n.m. Florecen en ambientes característicos con temperaturas entre los 10°C y 23°C, con alta humedad y lluvias frecuentes (8).

C. officinalis es un árbol de tamaño mediano, caracterizado por presentar alturas de 11 a 15 metros normalmente, con un diámetro de tronco aproximado de 30 a 40 cm, su tronco es cilíndrico y leñoso, ramificación simpodial y una copa globosa de forma irregular (9). La corteza externa se presenta ligeramente fisurada, de color marrón oscuro y con pequeñas placas que se desprenden de forma irregular. Sus hojas son coriáceas con nervaduras de 1.8 a 2.7 cm de largo, color verde oscuro, su textura puede ser lisas o pubescentes, opuestas y recurvadas, de forma elíptica-ovalada, con presencia de peciolo. Las dimensiones de las hojas varían entre 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho (7). Las flores son pediceladas y pueden aparecer en racimos dispersos o abundantes, mostrando colores rosadas o purpúreas. El fruto consiste en cápsulas de 1-2 cm de largo, mientras que las semillas de 5 mm de largo

se disponen ascendentemente y de manera imbricada, son de tipo aladas de margen entero o irregular, adaptadas para la dispersión en sus hábitats nativos. (10).



Figura 1. Morfología de *C. officinalis* L. a) árbol con follaje (7); b) frutos; c) inflorescencia (1); d) Semilla (7).

C. pubescens es un árbol que puede alcanzar una altura de entre 11 y 15 metros, con tronco cilíndrico irregular de 30 a 40 cm de diámetro, y presenta una copa globosa a globosa irregular (6). La corteza exterior de color gris plomizo o marrón plomizo, ligeramente fisurada, mientras que la corteza interna presenta un tono rojizo, rojo amarillento, presenta un sabor amargo, pero ligeramente dulce y sin olor distintivo (6). Las hojas son simples, opuestas y decusadas, pudiendo medir entre 8 a 29 cm de largo y entre 5 a 20 cm de ancho, presentan un ápice agudo o acuminado y base obtusa, las hojas son densamente pubescentes, con pelos de hasta 2 mm de largo, la superficie superior de las hojas no presenta pelos, mientras que el envés es muy pubescente, todas las hojas tienen una vena central bien desarrollada con venas laterales moderadamente prominentes. Las flores forman panículas terminales de hasta 15 cm de longitud y son hermafroditas, con una corola blanca – roja o rosada, cubiertas abundantemente con pelos. El fruto consiste en cápsulas elipsoidales de un color marrón oscuro que miden de 1.5 a 2.5 cm de longitud y forma elipsoide. Las semillas

son fusiformes, rodeadas por un ala membranosa, y miden entre 7 a 10 mm de largo, de 2 a 3 de ancho, lo que las hace ligeras y bien adaptadas para la dispersión (6).

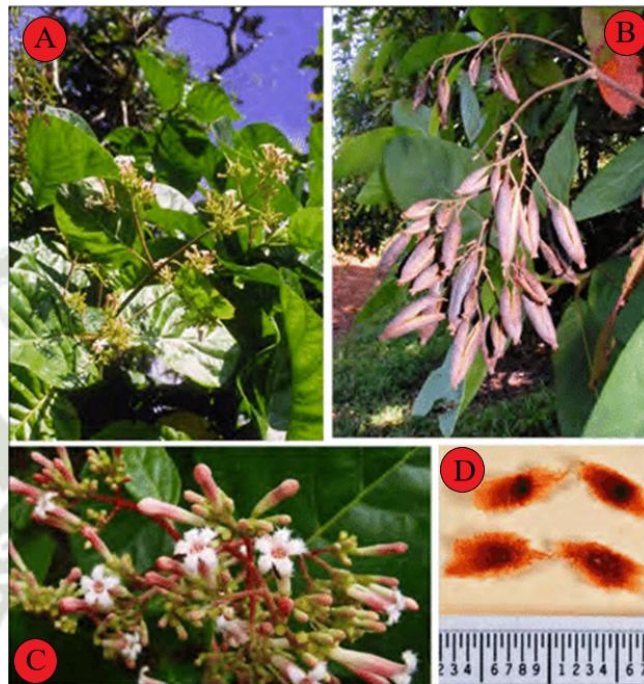


Figura 2. Morfología de *C. pubescens* Vahl. a) inflorescencia y hojas; b) frutos; c) flores; d) semillas (11).

FENOLOGIA

Según descripciones de varios autores la floración se inicia en febrero y declina en mayo, fructificación se inicia en abril y declina en junio, por ende, la recolección de semillas se puede realizar en los meses de mayo y junio. Sin embargo, también se ha observado que la fenología puede variar en diferentes lugares (8).

1.3.ASPECTOS ECOLÓGICOS

a) **Clima:**

Se encuentra principalmente en regiones de Ceja de Selva (bosque nuboso) o Ceja de Montaña (bosque montano), prospera en climas cálidos y húmedos, con presencia de precipitaciones abundantes y persistentes durante todo el año y una cobertura de nubes persistente (4).

b) **Suelos:**

Los suelos más adecuados para el cultivo de *Cinchona*, son fértiles, con textura y drenaje específicos, afectados por la posición en la pendiente, es importante un buen drenaje (12) y generalmente se desarrollan en suelos de origen volcánico

intemperizado, con una espesa cubierta de materia orgánica, capacidad retentiva y humedad y ricos en calcio (1).

c) Asociación vegetal:

Se puede encontrar asociada con las siguientes especies: Romerillo (*Podocarpus rospiglosii*), Tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*), Cedro de altura (*Cedrela sp*), Barejón (*Cordia alliodora*), Guayacán (*Tabebuia sp*), Bolaina (*Guazuma crinita*), etc. (6).

1.4. PROPIEDADES

La corteza del árbol produce un metabolito llamado “quinina”, que tiene propiedades antipalúdicas (9). Su principal uso es en la medicina, particularmente para tratar las fiebres tropicales y especialmente el paludismo, así como fiebres periódicas caracterizadas por piel húmeda y ausencia de irritación nerviosa. Además, actúa como tónico para el organismo, estimula el apetito, regula las arritmias cardíacas, alivia el estrés físico y mental, favorece el crecimiento del cabello y previene su caída (3).

Hoy en día, la corteza de *Cinchona* sigue siendo una opción terapéutica para tratar casos graves de malaria (7).

En el mundo culinario se utiliza en mixología a través de mezclas con agua tónica. La quinina extraída de la corteza de los árboles da el sabor amargo a este tónico (9). La madera de esta especie también tiene aplicaciones, siendo utilizada para puntales, vigas, soportes, postes, leña y carbón (1).

1.5. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

1.5.1. Clasificación Botánica de *C. officinalis* L.

Es una especie perteneciente al reino *Plantae*, división *Angiosperms* y clase *Equisetopsida*. Se clasifica dentro del orden *Gentianales*, familia *Rubiaceae*, el género *Cinchona* y especie *officinalis* (12).

1.5.2. Clasificación Botánica de la *C. pubescens* Valh.

Es una especie perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta* y clase *Magnoliopsida*. Se clasifica dentro del orden *Rubiales*, familia *Rubiaceae*, el género *Cinchona* y especie *pubescens* (13).

1.6. REPRODUCCIÓN DEL GÉNERO

Esta especie se propaga a través de semillas, presentando germinación epigea (1), la dispersión de las semillas es facilitada por el viento, mientras que el agente polinizador son las aves (8); cabe destacar que, las plantas que crecen a partir de estas semillas se desarrollan lentamente (1).

En la actualidad, las poblaciones de *Cinchona* son reducidas y están limitadas a áreas donde se cumplen con las condiciones específicas para la germinación y crecimiento de las plántulas (8).

1.7. GERMINACIÓN

1.7.1. SEMILLA

Las semillas son estructuras características de las plantas que contienen un embrión, reservas nutritivas y una cubierta protectora (15). Algunas características importantes de las semillas incluyen:

- Diversidad estructural, química y funcional entre diferentes especies de plantas.
- Importancia para la reproducción y propagación de las plantas.
- Características como el tamaño, la dormancia y la heterogeneidad dentro de una población de semillas.
- Procesos de desarrollo y germinación que determinan el crecimiento y el rendimiento de los cultivos.
- Adaptaciones evolutivas y ecológicas, como la tolerancia a la desecación (16).

Las partes de una semilla son:

- **Embrión:** Es la parte de la semilla que dará origen a la nueva planta.
- **Reservas nutritivas:** Sustancias almacenadas en la semilla que proporcionan energía y nutrientes para el crecimiento inicial de la planta (17).
- **Cubierta protectora (testa):** Estructura externa de la semilla que la protege de daños físicos y ambientales.
- **Micrópilo:** Pequeña abertura en la cubierta de la semilla que permite la entrada de agua y aire durante la germinación.
- **Chalaza:** Estructura en la base de la semilla que conecta el saco embrionario con el tejido materno (18).

Además, algunas semillas pueden contener otras estructuras especializadas, como los cotiledones (hojas embrionarias) y el endospermo (tejido de reserva) (19)

1.7.2. SEMILLA DE CALIDAD

La semilla de calidad se define como aquella que posee las siguientes características:

- Vigor de la semilla: capacidad de la semilla para germinar y producir una plántula vigorosa bajo una amplia gama de condiciones ambientales
- Sanidad de la semilla: ausencia de enfermedades, plagas o contaminantes que puedan afectar el desarrollo de una nueva planta.
- Pureza física: libertad de contaminación por otros materiales como semillas de malezas, restos vegetales, etc.
- Características genéticas: conformidad con los atributos varietales deseados, como el potencial de rendimiento, calidad del producto, entre otros (20).

El porcentaje de germinación no es suficiente para expresar la calidad de la semilla (7).

La mejor época de recolección de los frutos se realiza cuando estos han llegado a su madurez fisiológica, y luego deben ser guardados preferentemente en fundas de papel o tela para facilitar el secado (8).

La calidad de una semilla es un concepto que depende del propósito específico para el cual será utilizada. En el ámbito de la conservación de recursos genéticos, las semillas de alta calidad deben garantizar la preservación de la diversidad genética y la viabilidad a largo plazo. Para la producción en viveros, las características incluyen principalmente una alta tasa de germinación, uniformidad y vigor, lo que asegura un desarrollo exitoso en plántulas sanas. Finalmente, para el uso en alimentación, las semillas deben cumplir con criterios de inocuidad, contenido nutricional y sostenibilidad (21).

1.7.3. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA SEMILLA

Algunos factores comunes que afectan la calidad de la semilla son:

- Condiciones de almacenamiento: Un aumento en la humedad relativa del almacenamiento no solo conduce a un envejecimiento más rápido de la semilla, sino que también aumenta la actividad de hongos saprofitos, insectos y ácaros.
- Contenido de humedad en la semilla: El contenido de humedad de la semilla afecta directamente su capacidad de almacenamiento y la actividad de patógenos e insectos.
- Calidad inicial de la semilla: En países tropicales con alta humedad y temperatura, las semillas ortodoxas almacenadas en malas condiciones pierden rápidamente su capacidad de germinación, especialmente si la calidad inicial era baja.

- Enfermedades transmitidas por la semilla: La presencia de enfermedades transmitidas por la semilla puede reducir no solo el rendimiento, sino también el valor comercial de los productos.
- Baja germinación y vigor: La baja germinación y vigor de la semilla afectan la densidad de plantas en el campo o invernadero, lo que puede causar diferencias en el crecimiento de las plantas (22).

1.7.4. CONDICIONES AMBIENTALES NECESARIAS PARA LA GERMINACIÓN

Las condiciones ambientales necesarias para germinación de semillas incluyen:

- **Temperatura:** Las semillas germinan mejor dentro de un rango de temperatura óptimo, que varía según la especie.
- **Humedad:** La disponibilidad de agua es crucial para la imbibición de la semilla y el inicio de la germinación.
- **Luz:** Algunas especies requieren exposición a la luz para germinar, mientras que otras son indiferentes o prefieren la oscuridad.
- **Composición química del suelo:** Factores como el pH, la presencia de nutrientes y compuestos químicos pueden afectar la germinación.
- **Interacciones biológicas:** La presencia de microorganismos, insectos u otras plantas puede influir en la germinación de las semillas.

Además, las condiciones ambientales durante la formación y maduración de las semillas en la planta madre también pueden afectar su capacidad de germinación posterior (23).

1.8.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Cinchona* se distribuye en el norte de los andes entre los territorios de Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia, en el Perú se le puede encontrar en ambas vertientes de la cordillera de los Andes, lo que abarca los departamentos de Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, Huánuco, Pasco, Junín y Puno, desde los 1000 a 3000 m.s.n.m. (6)

1.9.CATEGORÍA DE AMENAZA

En el Perú, el género *Cinchona spp.* comprende 18 especies, algunas de las cuales están clasificadas como vulnerables o en peligro de extinción, con tendencias poblacionales aún desconocidas según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (24). Este género enfrenta un riesgo significativo de desaparición debido a su

sobreexplotación para fines medicinales, constructivos y alimenticios. De acuerdo con un estudio del Instituto para el Desarrollo Sostenible de la Ceja de Selva, basado en modelaciones realizadas con el software MaxEnt, se identificó que dentro del área de estudio el 10,30 % (133 172,56 km²) y el 19,20 % (247 371,32 km²) de la superficie del Perú presentan altas (> 0,6) y moderadas (0,4–0,6) probabilidades, respectivamente, de albergar especies de *Cinchona*. Sin embargo, solo el 7,6 % (17 305,32 km²) y el 22,0 % (50 153,73 km²) de estas áreas con alto y moderado potencial de distribución, respectivamente, se encuentran dentro de áreas naturales protegidas. Además, el 11,90 % (21 738,75 km²) y el 33,20 % (60 789,17 km²) de las áreas con alta y moderada probabilidad corresponden a zonas degradadas, consideradas prioritarias para programas de restauración con *Cinchona spp.* (25). Actualmente, los remanentes de bosques donde estas especies sobreviven se limitan a áreas de difícil acceso, mientras que la expansión de la frontera agrícola, el uso intensivo por parte del ser humano y la baja tasa de germinación y regeneración natural han contribuido significativamente a que este género se encuentre en peligro de extinción. (16).

1.10. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La biotecnología vegetal se refiere al uso de técnicas de la biología molecular y celular para mejorar plantas y procesos agrícolas. Esto incluye el uso de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que es la técnica de cultivar células, tejidos u órganos de plantas en un medio de cultivo artificial, bajo condiciones particulares controladas en laboratorio (26).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta importante en la biotecnología vegetal, ya que permite la propagación, regeneración y mejoramiento genético de plantas a través de técnicas como la micropropagación, la embriogénesis somática y la transformación genética (27).

1.11. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es una multiplicación masiva *in vitro* (6). Para lograr una rápida multiplicación de plantas, se emplean diversas técnicas, cada una adaptada a necesidades específicas de regeneración vegetal:

- **Cultivo de meristemos:** Consiste en el cultivo de pequeños segmentos de tejido meristemático, lo que permite generar plantas genéticamente idénticas al material de origen. Este método es particularmente útil para obtener plantas libres de enfermedades.

- **Embriogénesis somática:** Implica la formación de embriones a partir de células somáticas, facilitando la regeneración de plantas completas de manera eficiente y con alto potencial de producción masiva.
- **Cultivo de órganos:** Este procedimiento utiliza órganos vegetales como ápices caulinares, yemas axilares o raíces como material inicial, promoviendo su desarrollo y multiplicación para la propagación de la especie.
- **Cultivo de callos:** Se induce la formación de masas celulares indiferenciadas, conocidas como callos, a partir de las cuales es posible regenerar plantas completas bajo condiciones controladas (28).

Estas técnicas, permiten incrementar significativamente la producción de plantas en un tiempo relativamente corto, asegurando su calidad genética y sanitaria.

1.11.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

1.11.1.1. Ventajas de la Micropropagación

Algunas de las principales ventajas de la micropropagación incluyen:

- Esta técnica permite una rápida multiplicación de plantas genéticamente idénticas
- Facilita la conservación y preservación de especies de alto valor genético (29)
- Permite la producción de plantas con alta calidad sanitaria, libres de patógenos
- Disminuye el tiempo de mejoramiento genético en comparación con los métodos tradicionales (30)
- Brinda la posibilidad de cultivo de plantas en ambientes controlados y estériles (31)
- Facilita la propagación de plantas con dificultades de enraizamiento o reproducción de métodos convencionales
- Alto potencial de aplicación en producción de plantas medicinales y ornamentales (32).

1.11.1.2. Desventajas de la Micropropagación

Algunas de las principales desventajas de la micropropagación incluyen:

- Puede generar variación somaclonal, lo que puede ser una desventaja dependiendo de la aplicación (29)

- Requiere un mayor control y monitoreo del ambiente *in vitro*, lo que aumenta los costos de producción (31)
- Es un proceso más complejo y laborioso en comparación con los métodos de propagación tradicionales
- Se puede generar problemas de enraizamiento y aclimatación de las plantas propagadas (33)
- Existe riesgo de contaminación microbiana durante el proceso de micropropagación (30).

1.12.1. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La regeneración de plantas *in vitro* presenta las siguientes etapas:

- **Etapa 0: Selección de la planta madre**

En esta etapa se elige la planta que se usará en el cultivo (17). Es recomendable mantener a las plantas donadoras de yemas durante un periodo de tiempo en un invernadero bajo condiciones controladas, este periodo de tiempo varía según la especie pudiendo ser entre unas semanas a meses (18), lo que se busca material vegetal sin enfermedades y fisiológicamente mejor adaptado (17), se considera que teniendo como material inicial los órganos jóvenes y semillas se puede obtener una mejor respuesta en la etapa de establecimiento (3).

- **Etapa 1: Establecimiento**

El establecimiento busca introducir el explante libre de contaminantes en un medio de cultivo, para esto se requiere procedimientos:

El explante, que puede ser un segmento de tejido como yemas axilares, ápices caulinares o segmentos foliares, debe seleccionarse cuidadosamente de plantas madre saludables y bien desarrolladas; posteriormente, el material recolectado se debe transportar en condiciones asépticas al laboratorio, usando recipientes estériles para minimizar la contaminación. Para la esterilización, se debe seguir un protocolo que comienza con lavado inicial del material vegetal para eliminar residuos de tierra y otros contaminantes visibles. A continuación, el explante se someterá a un pretratamiento con detergente suave o agentes tensioactivos, seguidos de enjuagues con agua destilada estéril, este protocolo puede variar según cada especie. Se puede utilizar desinfectantes como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, entre otros. Una vez esterilizado el material vegetal, este se transfiere en condiciones de flujo laminar para su manipulación aséptica (36). Se debe colocar cuidadosamente en un

medio de cultivo específicamente, que debe estar suplementado con los nutrientes esenciales para su desarrollo. El medio de cultivo más comúnmente empleado es el de Murashige y Skoog (MS), el cual se puede modificar según las necesidades de las especies a propagar (17).

- **Etapa 2: Multiplicación**

Esta etapa implica la regulación de los niveles de fitohormonas para promover el crecimiento y la división celular, algunas especies pueden ser recalcitrantes al cultivo *in vitro*, lo que limita su potencial de multiplicación (37).

El éxito del cultivo depende de que los explantes se adapten a las condiciones *in vitro* sin presentar contaminación (3), una vez logrado este objetivo, un solo explante tiene el potencial de generar numerosos individuos, dependiendo de las características de la especie y las condiciones del medio de cultivo, este incremento exponencial se logra mediante la inducción de brotes múltiples, que puede ser estimulada mediante la adición de fitohormonas específicas al medio de cultivo, como citoquininas, auxinas, entre otros. (17).

El propósito principal de esta etapa es mantener un sistema sostenible de producción de brotes. Paralelamente una fracción de los brotes generados se destina a las siguientes etapas del proceso como el enraizamiento o la aclimatación (3). Cabe destacar que, independientemente de la vía regenerativa utilizada, es fundamental evitar la formación de callos durante esta fase. Esto se debe a que los callos, al estar compuestos por células no diferenciadas, aumentan el riesgo de variación somaclonal, lo que puede comprometer la estabilidad genética de las plantas regeneradas (38).

- **Etapa 3: Elongación y enraizamiento**

La elongación y el enraizamiento *in vitro* requieren modificaciones o ajustes específicos de las condiciones de cultivo para garantizar el desarrollo de los brotes generados en las fases anteriores. Durante esta etapa, los brotes son sometidos a un medio de cultivo específico que promueve la elongación y posteriormente se debe transferir a un medio optimizado para la inducción de raíces (17). Estos medios de cultivo suelen contener reguladores de crecimiento, como auxinas, que estiman la formación de raíces adventicias de un tamaño aproximado de 2 cm, lo que podría asegurar un mejor manejo y resultados consistentes (39). Sin embargo, algunas especies vegetales presentan características que les permiten desarrollar raíces en el

mismo medio de cultivo en el que ocurre la formación de yemas, evitando así la necesidad de una etapa diferenciada de enraizamiento (40).

- **Etapa 4: Aclimatación**

La aclimatación de las plantas propagadas *in vitro* tiene como finalidad la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales *ex vitro*. Las plantas *in vitro* están expuestas a condiciones de crecimiento controladas en el laboratorio, lo que puede dificultar su adaptación al ambiente externo.

En esta fase, las plántulas desarrolladas son transferidas desde el entorno aséptico del laboratorio a un invernadero *ex vitro*, donde las condiciones ambientales se ajustan gradualmente para imitar su hábitat natural. Con este procedimiento, se busca garantizar una alta tasa de supervivencia, se tiene que realizar una reducción progresiva de la humedad y un aumento de la exposición a la luz natural. Además, el proceso tiene como meta principal promover el cambio de la planta de un estado heterótrofo, en el que depende de los nutrientes suministrados en el medio de cultivo, a un estado autótrofo, en el que puede realizar su propio metabolismo y desarrollarse independientemente en el medio natural (41).

1.12.2. MEDIOS DE CULTIVO

El éxito en el cultivo *in vitro* depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física (19); es una mezcla de componentes determinados sobre o dentro de los cuales se busca fomentar el crecimiento de los explantes, este medio de cultivo tiene que estar esterilizado para su uso (3). Los nutrientes se agrupan en: a) macronutrientes y micronutrientes; b) fuentes de carbono; c) vitaminas; y d) reguladores de crecimiento (6).

Una vez definido el objetivo con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio de cultivo nutritivo apropiado, en el cual se debe considerar no solo sus componentes sino también su técnica de preparación (20).

Tabla 1. Componentes principales en los medios de cultivo para células vegetales (44)

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS
Agua destilada	Proporciona el medio acuoso necesario para el crecimiento y desarrollo de las células vegetales, representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita por que los explantes

	no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i> .
Sustancias inorgánicas	Incluye macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) necesarios para el crecimiento y desarrollo de las células.
Vitaminas	Compuestos orgánicos esenciales para el metabolismo celular, como vitaminas B1, B2, B6, Vitamina H, Vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Reguladores de crecimiento	Compuestos que regular y controlan los procesos de crecimiento y desarrollo, siendo los principales las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, entre otros. Auxinas: Promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes auxiliares adventicios y, a veces inhiben la embriogénesis. Citoquininas: Promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezcla de sustancias poco definidas	Pueden incluir extracto de levadura, extractos vegetales, caseína hidrolizada, jugo de tomate, entre otros, que aportan compuestos orgánicos complejos
Materiales inertes	Se usan como soporte: agar, agarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel filtro, arena, entre otros.

*Tomado de Chamba (44) y Sudheer (45)

1.12.3.1. Componentes del medio

1.12.3.1.1. Componentes minerales

- **Macronutrientes:** Proporcionan nutrientes esenciales en grandes cantidades, se requieren en concentraciones mayores a 0.5 mmol/L (17) y sirven como principales fuentes de energía y elementos estructurales para el crecimiento y desarrollo de células y tejidos. Los macronutrientes incluyen al Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Azufre (S) (22).

Tabla 2. Macronutrientes y función en el crecimiento de la planta (17).

MACRONUTRIENTE	FUNCIÓN
----------------	---------

Nitrógeno (N)	Forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos; suministrado como nitrato y amonio.
Fósforo (P)	Componente de moléculas que almacenan y transfieren energía química en ácidos nucleicos, apoyando la energía celular.
Potasio (K)	Participa en la regulación osmótica y en la actividad enzimática.
Calcio (Ca)	Constituyente de la pared celular, involucrado en la respuesta al crecimiento.
Magnesio (Mg)	Es parte de la molécula de clorofila y ribosomas, clave en la fotosíntesis y síntesis de proteínas.
Azufre (S)	Necesario para la síntesis de aminoácidos esenciales.

- **Micronutrientes:** Son llamadas también oligoelementos, son necesarios en pequeñas cantidades par procesos metabólicos y fisiológicos, en concentraciones menores que 0.5 mmol/L y su exceso produce toxicidad en la planta (17). En este grupo se incluyen al Yodo (I), Boro (B), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Cloro (Cl), Molibdeno (Mo), Cobre (Cu), Cobalto (Co) (22).

Tabla 3. Micronutrientes y función en el crecimiento de la planta, tomado de (17).

MICRONUTRIENTE	FUNCIÓN
Yodo (I)	Incrementa la capacidad antioxidante, protegiendo a las células del estrés oxidativo.
Boro (B)	Es esencial para el mantenimiento de la actividad meristemática y participa en la síntesis de bases nitrogenadas como el uracilo.
Manganeso (Mn)	Induce la síntesis de clorofila y es crucial en la formación de oxígeno durante la fotosíntesis.
Zinc (Zn)	Necesario para los procesos de oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
Cloro (Cl)	Desempeña un papel clave en las reacciones de evolución del oxígeno durante la fotosíntesis.
Molibdeno (Mo)	Indispensable para la actividad de la enzima nitrato reductasa, que interviene en el metabolismo del nitrógeno.
Cobre (Cu)	Facilita la oxidación respiratoria final y está involucrado en el proceso de lignificación.

Cobalto (Co)

Participa en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, actuando en diversos sistemas enzimáticos.

- **Fuentes de Hierro:** El hierro usualmente es agregado al medio como sulfato de hierro conjuntamente con el EDTA (17).

1.12.3.1.2. Fuentes de carbono

La mayoría de los cultivos *in vitro* no son capaces de realizar la fotosíntesis de manera eficiente, por lo que dependen de una fuente externa de carbono para favorecer el crecimiento, desarrollo, proliferación celular y la regeneración de brotes (34). En este contexto, la sacarosa es la fuente de carbono más utilizada, empleándose en concentraciones que varían entre el 2 % y el 5 %, ya que es un compuesto que las plantas sintetizan y transportan de manera natural. No obstante, la sacarosa puede ser reemplazada por otros azúcares como fructosa, maltosa o galactosa, aunque estas alternativas suelen ser menos efectivas (47). Las concentraciones de azúcar requeridas en el medio de cultivo dependen en gran medida del tipo de tejido y su estado de desarrollo. Por ejemplo, los embriones en etapas tempranas y las anteras suelen necesitar concentraciones altas de azúcar (entre 6 % y 12 %), mientras que los protoplastos utilizan concentraciones más bajas, alrededor del 1.5 % (47).

1.12.3.1.3. Vitaminas y/o aminoácidos

Proporcionan al medio de cultivo compuestos orgánicos esenciales para el metabolismo celular, se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo de tejidos a la Tiamina (24).

Las más usadas con frecuencia en el cultivo *in vitro* son: Tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido ascórbico, entre otros (23).

1.12.3.1.4. Agente gelificante

Los agentes gelificantes son utilizados en la preparación de medios sólidos y semisólidos, ya que estos componentes buscan aumentar la viscosidad del medio, pueden afectar la absorción de nutrientes y el crecimiento de las células vegetales (17).

El uso de agar es el más provechoso, ya que tolera altas temperaturas sin descomponerse, se disuelve a 100°C y se solidifica a 45°C; en adición, no es asimilada por la planta y no reacciona con los otros constituyentes del medio de

cultivo, siendo una adición que no cambia la estabilidad del medio (23). Presenta desventajas, ya que puede ofrecer una aireación insuficiente al medio, lo que afectaría el crecimiento de tejidos, las concentraciones más utilizadas varían entre 6-10 g/L (22).

1.12.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Las hormonas vegetales desempeñan un papel fundamental en la regulación de los procesos morfogénicos en las plantas, influyendo en su desarrollo y crecimiento en función de su concentración y combinación. En condiciones *in vitro*, la presencia y proporción de reguladores de crecimiento determinan la respuesta celular y tisular. Por ejemplo, cuando los niveles de auxinas y citocininas son relativamente altos y equilibrados, se promueve la proliferación celular sin diferenciación específica (47). En contraste, un aumento en la concentración de citocininas con respecto a las auxinas favorece la formación de brotes, mientras que la relación inversa estimula la formación de raíces. Este fenómeno resalta la capacidad de las células vegetales para modular su estado meristemático y regenerar órganos específicos bajo condiciones controladas (50).

A continuación, se describen los principales reguladores de crecimiento utilizados en la propagación *in vitro*:

a) Auxinas

El término "auxina" proviene del griego y significa "crecer" (49). Estas fitohormonas regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, siendo el ácido indolacético (AIA) la forma más común y biológicamente activa en las plantas. Las auxinas se transportan de manera polar a través de un mecanismo dependiente de energía, moviéndose en dirección basípeta, es decir, desde la región apical hacia la base de la planta. Este flujo mantiene la dominancia apical al inhibir el desarrollo de brotes laterales, lo que permite la regulación del crecimiento del tallo y la formación de órganos específicos (47).

b) Giberelinas

Las giberelinas (GA) son hormonas de crecimiento pertenecientes a la familia de los diterpenoides tetracíclicos y participan en múltiples procesos fisiológicos (39). Su función principal en cultivos *in vitro* está relacionada con la elongación de los entrenudos y el estímulo del crecimiento de meristemas o yemas. Además, son capaces de romper la dormancia de embriones y yemas, aunque generalmente

inhiben la formación de raíces adventicias. A diferencia de las auxinas, su transporte dentro de la planta no es polar, sino que se distribuyen libremente en los tejidos. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en la germinación de semillas, ya que promueven la movilización de reservas y el crecimiento del embrión tras la imbibición de la semilla (51).

c) **Citocininas**

Las citocininas son compuestos derivados de la adenina y su principal función es estimular la división celular (46). Además, regulan otros procesos fisiológicos como la proliferación de yemas axilares, la senescencia foliar y la floración (49). Su transporte ocurre a través de ambos sistemas vasculares, la xilema y el floema, y su presencia en la planta suele estar asociada con la disponibilidad de nutrientes en el suelo (50). Las citocininas más utilizadas en cultivos *in vitro* incluyen la benciladenina (BA), la cinetina (KIN), la zeatina (Zea) y la isopentenil adenina (2-*iP*) (52). La relación entre citocininas y auxinas es determinante en la organogénesis *in vitro*: una proporción elevada de citocininas con respecto a las auxinas favorece la formación de brotes, mientras que una relación baja induce el desarrollo de raíces (53).

1.12.5. FACTORES AMBIENTALES DE INCUBACIÓN

El control de las condiciones ambientales durante la incubación de cultivos *in vitro* es fundamental para su desarrollo óptimo. Entre los factores más relevantes se encuentran el pH, la temperatura, la humedad, el oxígeno y la luz, los cuales influyen directamente en el crecimiento y diferenciación celular. Sin embargo, la información disponible sobre estos aspectos es aún limitada y, en algunos casos, contradictoria (39).

1.12.5.1. pH

El pH del medio de cultivo es crucial para el crecimiento y desarrollo, ya que regula la solubilidad y disponibilidad de los iones minerales, además de afectar la capacidad de gelificación del agar. En especies leñosas cultivadas *in vitro*, el pH óptimo se encuentra entre 5.0 y 6.0; valores fuera de este rango pueden inhibir el crecimiento celular (48). Para su ajuste, se emplean soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH) para aumentar el pH, mientras que el ácido clorhídrico (HCl) se utiliza para disminuirlo. Comúnmente, estas soluciones tienen una concentración de 1N (51)

1.12.5.2. Temperatura

La temperatura óptima de incubación varía según la especie vegetal, siendo generalmente más alta en plantas tropicales en comparación con especies de climas templados. En términos generales, las temperaturas utilizadas en el cultivo de tejidos oscilan entre 20 y 25°C (54), aunque estos valores pueden ajustarse en función de las necesidades específicas de cada material vegetal y del tipo de órgano cultivado (48).

1.12.5.3. Humedad

La humedad relativa dentro de los recipientes de cultivo debe mantenerse entre 70-100%. Una humedad inadecuada puede causar estrés hídrico y anomalías en las plantas (31). El control de la humedad relativa en la cámara de incubación es esencial para evitar la deshidratación de los tejidos y la evaporación del medio de cultivo (48). Sin embargo, una humedad excesiva en la cámara de incubación puede aumentar la incidencia de infecciones fúngicas y bacterianas (55)

Fundamentalmente se refiere a la humedad relativa de los ambientes de tejidos vegetales, la cual debe ser permanentemente controlada, pudiendo ser aproximadamente de 70%, una alta temperatura puede ser causal de pérdida de agua en los medios, aún en aquellos que se encuentran en estado líquido (23). La humedad de la cámara de crecimiento influirá en la pérdida del agua desde los tubos, sin embargo, una elevada humedad en la cámara producirá una mayor cantidad de infecciones (21).

1.12.5.4. Oxígeno

La concentración de oxígeno debe ser adecuada, pero no excesiva, para evitar efectos adversos (56). La disponibilidad de oxígeno influye significativamente en la proliferación celular y la formación de órganos. Un suministro adecuado de oxígeno es especialmente relevante para la inducción de raíces adventicias, particularmente en especies leñosas, donde la regeneración radicular suele ser más dificultosa en medios sólidos con agar (48). En condiciones in vivo, la formación de raíces se ve favorecida en comparación con los medios líquidos o los sustratos bien aireados (53).

1.12.5.5. Luz

La intensidad, calidad y fotoperiodo de la luz afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas en micropropagación, siendo estos requerimientos de luz variables según la especie y objetivo del cultivo (57)

a luz desempeña un papel crucial en el desarrollo de los órganos fotosintéticos, regulando procesos como la fotosíntesis, el fototropismo, la germinación y la floración. La clorofila y otros pigmentos fotosintéticos captan la energía luminosa para integrarla en las reacciones bioquímicas. Por ello, es fundamental controlar la calidad, intensidad y duración de la luz durante el cultivo in vitro (58).

1.12.5.6. Irradiación

La irradiación, incluyendo la radiación UV, puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales, cantidad de luz que recibe la planta afecta su capacidad fotosintética (31). En cultivos in vitro, las necesidades lumínicas son menores en comparación con las plantas en condiciones naturales, debido a la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, lo que reduce la dependencia de la fotosíntesis. No obstante, una irradiación excesiva puede provocar un aumento de la temperatura en los recipientes de cultivo debido al efecto invernadero (51).

1.12.5.7. El espectro

El espectro de luz afecta de manera diferenciada los procesos fisiológicos de las plantas. Algunos espectros pueden promover o inhibir el crecimiento y desarrollo de las plantas (57). Es crucial seleccionar fuentes de iluminación que reproduzcan el espectro más adecuado para el crecimiento vegetal. En la mayoría de los laboratorios de cultivo in vitro, las lámparas fluorescentes son la fuente de luz más utilizada (54).

1.12.5.8. Fotoperiodo

El fotoperiodo, es decir, la duración del periodo de luz y oscuridad, influye en la morfogénesis y desarrollo de las plantas (58). En términos generales, el fotoperiodo óptimo en condiciones in vitro suele coincidir con el requerido en condiciones naturales para cada especie en particular (54).

1.12.6. PROBLEMAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

El cultivo in vitro de plantas presenta diversas dificultades que pueden afectar la eficiencia del proceso y la calidad de los explantes regenerados. Entre los principales problemas se encuentran la contaminación microbiana, la oxidación fenólica, la hiperhidricidad y la

variación somaclonal, los cuales pueden comprometer el desarrollo normal de los cultivos y su posterior aclimatación (39):

1.12.6.1. Contaminación

La contaminación por microorganismos es un problema crucial en el cultivo de tejidos vegetales, afectando tanto a nivel comercial como en investigación. Diversos patógenos y organismos no patogénicos, como hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides, pueden ser introducidos en el medio de cultivo a partir del explante inicial, durante la manipulación en el laboratorio o a través de microartrópodos (42). Entre estos, las bacterias son consideradas los agentes más perjudiciales, ya que pueden proliferar rápidamente y alterar el medio de cultivo, afectando la viabilidad de los tejidos vegetales. Para prevenir la contaminación, se deben seguir estrictos protocolos de esterilización y manipulación en condiciones asépticas (59).

1.12.6.2. Oxidación Fenólica

Los compuestos fenólicos liberados por los explantes pueden oxidarse y causar problemas de crecimiento y desarrollo (30). La oxidación fenólica, también denominada oscurecimiento del tejido, es el resultado de la generación de radicales libres que desencadenan la oxidación de diversos componentes celulares. Este proceso es catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO), que convierte los compuestos fenólicos en quinonas, sustancias altamente reactivas capaces de inducir daño celular e incluso provocar la muerte del tejido. Estas especies reactivas del oxígeno (ROS) son subproductos del metabolismo celular y pueden comprometer el éxito del cultivo *in vitro* (55). Para evitarla, se pueden utilizar antioxidantes, ajustar el pH del medio y minimizar el daño a los explantes (60).

1.12.6.3. Hiperhidricidad

La hiperhidricidad o vitrificación, es un trastorno fisiológico que puede afectar a cualquier tipo de tejido cultivado *in vitro* y se manifiesta con un crecimiento anómalo de los explantes, caracterizado por una textura translúcida y frágil debido a una acumulación excesiva de agua en las células (42). Este fenómeno suele estar asociado a condiciones de estrés *in vitro*, tales como una humedad relativa elevada, una concentración excesiva de reguladores de crecimiento, una acumulación de gases en la atmósfera de los frascos de cultivo o una alta intensidad lumínica. La hiperhidricidad puede comprometer la calidad de los explantes, reduciendo sus posibilidades de aclimatación y supervivencia en condiciones *ex vitro* (53). Para

prevenir la hiperhidricidad, se pueden ajustar factores como la humedad, la aireación y la composición del medio (61).

1.12.6.4. Variación Somaclonal

La variación somaclonal se refiere a la aparición de características fenotípicas y genotípicas distintas a las de la planta madre como resultado del cultivo in vitro (42). Estas variaciones pueden manifestarse como cambios en el tamaño y forma de las plantas, alteraciones en la coloración del follaje, modificaciones en el hábito de crecimiento (incluyendo variaciones en el vigor, porte y morfología foliar) y alteraciones en la capacidad reproductiva, tales como esterilidad o prolongación de la fase juvenil. En algunos casos, estas modificaciones pueden ser indeseables, ya que afectan la uniformidad del material propagado; sin embargo, en otros, pueden dar lugar a la generación de nuevas variedades con características potencialmente valiosas para la agricultura y la horticultura (62).



CAPÍTULO II

2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material Biológico

- Semillas viables de *C. officinalis* L.
- Semillas viables de *C. pubescens* Vahl.

2.1.2. Material de laboratorio

- Matraz, 250 ml, 100 ml.
- Beaker, 250 ml, 100 ml.
- Tubos de ensayo 10 ml.
- Vaso de vidrio.
- Bagueta.
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml.
- Probeta 1000 ml.
- Frascos de vidrio.

2.1.3. Insumos y reactivos químicos

- Medio de cultivo *Murashige & Skoog*, Caisson Laboratories, Inc.
- Medio de cultivo Lloyd & McCown's *Woody Plant* Medium, Caisson Laboratories, Inc.
- Sacarosa
- Ácido 1-naftalenacético (ANA)
- 6-Bencilaminopurina (BAP)
- Ácido giberélico (AG₃)
- Bacto-agar
- Etanol al 70% y 90%
- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada esterilizada

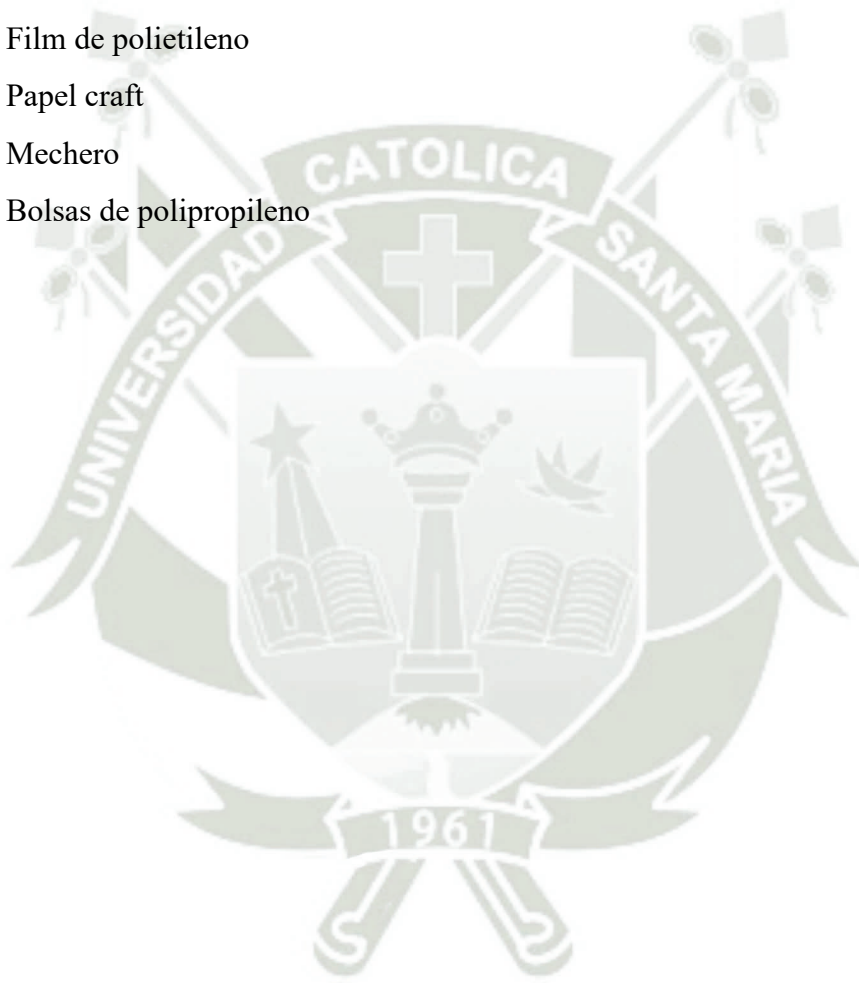
2.1.4. Equipos e instrumentación

- Autoclave All American No. 75X
- Balanza analítica Sartorius Quintix224-1S
- Hot plate H. W. Kessel Thermo Scientific Super-Nuova Multi-Place
- Refrigerador BOSCH
- Cámara de flujo laminar horizontal ESCO Laminar Flow Cabinet

- Estufa MELAG

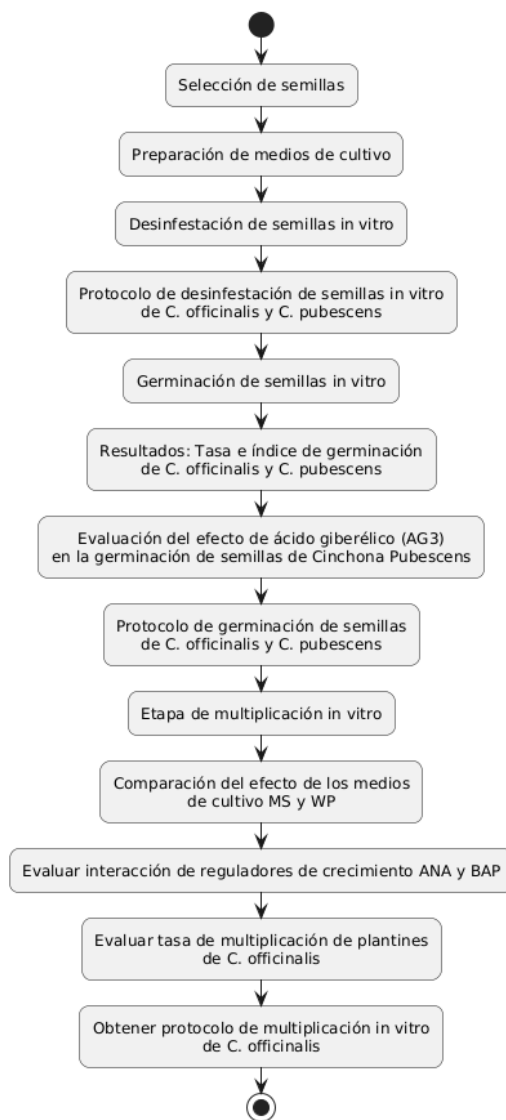
2.1.5. Otros

- Pinza ratón
- Bisturí número 3
- Hojas de bisturí número 11
- Algodón
- Ligas
- Film de polietileno
- Papel craft
- Mechero
- Bolsas de polipropileno



2.2.MÉTODOS

2.2.1. Flujograma de actividades



Fuente: Elaboración propia

2.2.2. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio

Fase de campo

La recolección del material vegetal se realizó de árboles identificados en la provincia de Chanchamayo, departamento de Junín.

Fase de laboratorio

Se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Vivero de Uchumayo de Sociedad Minera Cerro Verde, localizado en el distrito de Uchumayo, pueblo tradicional de Congata.

2.2.3. Etapa de Establecimiento *in vitro* de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl en medio de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) con tres variaciones de concentración de ácido giberélico (AG3) y tres tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio.

2.2.3.1. Selección y desinfestación de semillas

Selección de semillas

Las semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl se seleccionaron según sus características fenotípicas sobresalientes, tales como: forma, tamaño, color, madurez fisiológica y buenas condiciones fitosanitarias. En un inicio se quitó las impurezas y se seleccionaron las mejores semillas que presentaron germen activo. En la **Figura 3 y 4** podemos observar las diferentes semillas y sus características de cada tipo de semilla

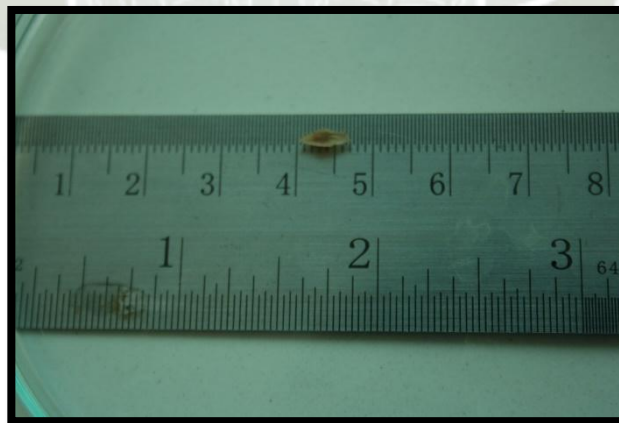


Figura 3. Semilla de *C. officinalis* L. con mejores características fenotípicas.

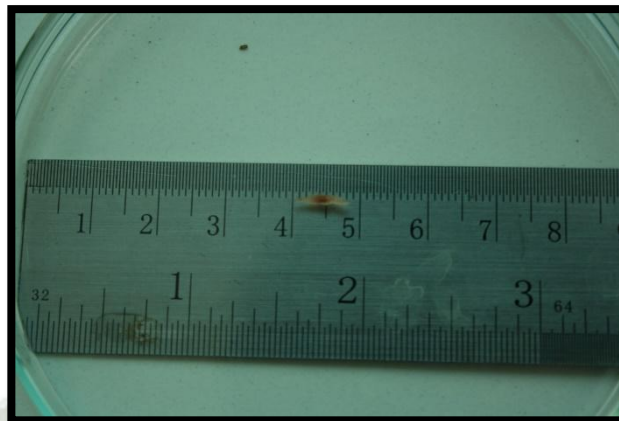


Figura 4. Semilla de *C. pubescens* Vahl con mejores características fenotípicas

Desinfestación de semillas

Las semillas seleccionadas fueron agrupadas en conjuntos de 50 unidades para facilitar la manipulación, esto debido a que las semillas tienen un tamaño pequeño, luego se colocaron dentro de un trozo de gaza. La desinfestación se realizó dentro de cámara de flujo laminar en condiciones asépticas bajo el siguiente orden: primero las semillas se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 50 segundos, seguidamente utilizando 2.5% de concentración de hipoclorito de sodio se sumergieron los grupos de semilla según su tratamiento en los diferentes tiempos de exposición (5, 8 y 10 minutos), culminado este tiempo todas las semillas recibieron 3 enjuagues consecutivos de 3 minutos cada uno en agua destilada esterilizada.

Se evaluó el porcentaje de semillas contaminadas por cada tratamiento.

En la **Tabla 4** se muestran los diferentes tratamientos de desinfestación con hipoclorito de sodio 2.5% que se realizaron.

Tabla 4. Tratamientos de desinfestación de las semillas en tres tiempos diferentes de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5% para las especies *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl con tres repeticiones cada uno.

TRATAMIENTO	ESPECIE	TIEMPO
E1D1	<i>C. officinalis</i>	5 minutos
E1D2		8 minutos
E1D3		10 minutos
E2D1	<i>C. pubescens</i>	5 minutos
E2D2		8 minutos
E2D3		10 minutos



Figura 5. Semillas agrupadas en conjuntos de 50 unidades para la desinfestación.



Figura 6. Batería de desinfestación para semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

2.2.3.2. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo fue preparado con sales minerales MS (*Murashige & Skoog*, 1962) con vitaminas + glicina de Caisson Laboratories®, sacarosa al 2% como fuente de carbohidratos, agar al 0.6% como agente gelificante y ácido giberélico (AG₃) en tres diferentes concentraciones (0, 10 y 20 μ M). El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 , con HCl (ácido clorhídrico) o NaOH (hidróxido de sodio) 1N.

Se pesó 4.43 g/L del polvo de medio *Murashige & Skoog* (1962), incorporó sacarosa y agar, llevándolo a ebullición en el hot plate con agitación a 200 rpm para poder diluirlo y se

distribuyó 20 mL de medio nutritivo en cada frasco de vidrio; finalmente se sometió a esterilización en autoclave a 120°C de temperatura y 1.5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos.

En la **Tabla 5** se muestran los diferentes tratamientos de ácido giberélico con los que se trabajó para evaluar germinación de las semillas.

Tabla 5. Tratamientos de diferentes concentraciones de ácido giberélico en medio *Murashige & Skoog* (1962) para la germinación de semillas de las especies *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl con tres repeticiones cada uno.

TRATAMIENTO	ESPECIE	CONCENTRACIÓN AG ₃
E1T1	<i>C. officinalis</i>	0 μM
E1T2		10 μM
E1T3		20 μM
E2T1	<i>C. pubescens</i>	0 μM
E2T2		10 μM
E2T3		20 μM

2.2.3.3. Siembra *in vitro* de explantes y condiciones de incubación

La inoculación *in vitro* de semillas se llevó a cabo en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar, garantizando un ambiente libre de contaminantes. Luego de completar el proceso de desinfestación, se procedió a la siembra, colocando cinco semillas por frasco de cultivo. Posteriormente, cada unidad experimental fue debidamente identificada y trasladada a la cámara de incubación, donde fueron sometidas a un régimen de luz blanca, manteniéndose a una temperatura aproximada de 23 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, condiciones óptimas para su desarrollo inicial (39).

2.2.4. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente randomizado (DCR), con un arreglo factorial 2x3x3, con 18 tratamientos y 3 repeticiones. Las **Tablas 6 y 7**, presentan los tratamientos aplicados en la desinfestación y concentración de ácido giberélico para la germinación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

Tabla 6 Diseño completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial 2x3x3.

FACTORES	NIVELES
A. Especies de <i>Cinchona</i>	1. <i>C. officinalis</i> L. (E1) 2. <i>C. pubescens</i> Vahl. (E2)
B. Tiempo de inmersión (min) en hipoclorito de sodio 2.5%	1. 5 min(D1) 2. 8 min (D2) 3. 10 min (D3)
C. Concentración de ácido giberélico (AG ₃) en medio MS (1962)	1. 0 μM (T1) 2. 10 μM (T2) 3. 20 μM (T3)

Tabla 7. Tratamientos generados de la combinación entre Especies de *Cinchona*, tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 2.5% y concentración de ácido giberélico.

TRAT.	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	<i>C. officinalis</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E1D1T1
2	<i>C. officinalis</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E1D2T1
3	<i>C. officinalis</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E1D3T1
4	<i>C. officinalis</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E1D1T2
5	<i>C. officinalis</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E1D2T2
6	<i>C. officinalis</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E1D3T2
7	<i>C. officinalis</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E1D1T3
8	<i>C. officinalis</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E1D2T3
9	<i>C. officinalis</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E1D3T3
10	<i>C. pubescens</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E2D1T1
11	<i>C. pubescens</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E2D2T1
12	<i>C. pubescens</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 0μM AG ₃	E2D3T1
13	<i>C. pubescens</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E2D1T2
14	<i>C. pubescens</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E2D2T2
15	<i>C. pubescens</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 10μM AG ₃	E2D3T2
16	<i>C. pubescens</i> + 5 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E2D1T3
17	<i>C. pubescens</i> + 8 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E2D2T3
18	<i>C. pubescens</i> + 10 min NaClO (2.5%) + 20μM AG ₃	E2D3T3

2.2.4.1. Unidad experimental y evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de frascos conformado por 10 semillas cada uno. La evaluación se realizó por observación directa, durante 30 días para *C. officinalis* L. y durante 45 días para *C. pubescens* Vahl, observando diariamente después de la siembra, los parámetros evaluados fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de semillas germinadas y días a la germinación.

2.2.4.2. Pre-tratamiento de germinación con remojo en tres concentraciones diferentes de nitrato de potasio KNO₃ para *C. pubescens* Vahl.

Debido a los resultados obtenidos en la germinación de *C. pubescens* Vahl se realizó un ensayo con un tratamiento de pre-germinación sometiendo las semillas de esta especie a un remojo por 24 horas en diferentes concentraciones de nitrato de potasio KNO_3 (0, 500 y 100 ppm de KNO_3) y posteriormente se inocularon en medio de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) with vitamins + glycine de Caisson Laboratories®, sacarosa al 2% como fuente de carbohidratos, agar al 0.6% como agente gelificante sin hormonas.

Tabla 8. Tratamientos de pre-germinación con remojo durante 24 horas en tres diferentes concentraciones de KNO_3 para semillas de *C. pubescens* Vahl, con tres repeticiones cada uno.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN KNO_3 (ppm)
P1	0 ppm
P2	500 ppm
P3	1000 ppm

2.2.5. Etapa de multiplicación *in vitro* de *C. officinalis* L. en medio de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) y *Woody Plant* (1981) con siete diferentes combinaciones de ANA y BAP

Esta fase tuvo como propósito evaluar la interacción entre la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina benzilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0, 0.5 y 1 μM de ANA y 0, 5 y 10 μM de BAP, con el objetivo de promover la elongación de los explantes y la regeneración de tejidos. Para ello, se emplearon vitroplantas de *C. officinalis* L. obtenidas en la etapa de crecimiento, evitando la necesidad de desinfección adicional debido a su origen aséptico. No obstante, dado que los tratamientos aplicados en la fase de establecimiento *in vitro* para la germinación de *C. pubescens* Vahl no lograron obtener un número suficiente de individuos ni un desarrollo adecuado para su multiplicación, esta etapa se llevó a cabo exclusivamente con *C. officinalis* L.

- **Preparación del medio de cultivo**

Se utilizaron los medios *Murashige & Skoog* (1962) y *Woody Plant* (1981), suplementados con vitaminas y glicina de Caisson Laboratories®, así como sacarosa al 2 % como fuente de carbohidratos y agar al 0.6 % como agente gelificante. Se añadieron las combinaciones hormonales de ANA y BAP en concentraciones de 0, 0.25 y 0.5 μM para ANA, y 0, 5 y 10 μM para BAP, generando catorce tratamientos con tres repeticiones cada uno. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.2 mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Para la preparación del medio, se pesaron 4.43 g/L de *Murashige & Skoog* (1962) y 2.5 g/L de *Woody Plant* (1981), incorporando posteriormente la sacarosa y el agar. La mezcla fue calentada hasta ebullición en una placa de agitación a 200 rpm para garantizar su disolución homogénea. Finalmente, se distribuyeron 20 mL de medio en frascos de vidrio y se esterilizó mediante autoclave a 120 °C y 1.5 kg/cm² de presión durante 25 minutos.

En la **Tabla 9** se puede observar las diferentes las combinaciones hormonales de ANA/BAP que se utilizarán en los medios de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) y *Woody Plant* (1981).

Tabla 9. Tratamientos para la etapa de multiplicación con tres concentraciones de ANA y tres concentraciones de BAP.

ANA (μM)	BAP (μM)		
	0	5	10
0	0/0	0/5	0/10
0.25	-	0.25/5	0.25/10
0.5	-	0.5/5	0.5/10

- **Inoculación de explantes y condiciones de incubación**

La inoculación de los explantes se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia, utilizando placas Petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas en estufa. Para el trasplante, se seleccionaron explantes con un tamaño promedio de 2 a 3 cm, estableciendo una densidad de cinco explantes por frasco de vidrio.

Posteriormente, cada tratamiento fue debidamente identificado y trasladado a la sala de incubación, donde se mantuvieron bajo iluminación blanca, a una temperatura aproximada de 23°C y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

2.2.6. Diseño Experimental

Se realizó un diseño completamente randomizado (DCR), con arreglo factorial 2x7, con 14 tratamientos y 3 repeticiones.

Las **Tablas 10** y **11**, presentan los tratamientos aplicados con los medios de cultivo MS (1962) y WP (1981) con las siete combinaciones hormonales de ANA/BAP para la etapa de multiplicación de *C. officinalis* L.

Tabla 10. Diseño completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial 2x7.

FACTORES	NIVELES
A. Medios de cultivo	1. <i>Murashige & Skoog</i> (1962) (M1) 2. <i>Woody Plant</i> (1981) (M2)
B. Combinación hormonal ANA/BAP	1. 0/0 (T1) 2. 0/5 (T2) 3. 0/10 (T3) 4. 0.25/5 (T4) 5. 0.25/10 (T5) 6. 0.5/5 (T6) 7. 0.5/10 (T7)

Tabla 11. Tratamientos generados de la interacción entre medios de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) y *Woody Plant* (1981) con siete combinaciones de ANA/BAP para etapa de multiplicación de *C. officinalis* L.

TRAT.	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	<i>Murashige & Skoog</i> + 0/0 ANA/BAP	M1T1
2	<i>Murashige & Skoog</i> + 0/5 ANA/BAP	M1T2
3	<i>Murashige & Skoog</i> + 0/10 ANA/BAP	M1T3
4	<i>Murashige & Skoog</i> + 0.25/5 ANA/BAP	M1T4
5	<i>Murashige & Skoog</i> + 0.25/10 ANA/BAP	M1T5
6	<i>Murashige & Skoog</i> + 0.5/5 ANA/BAP	M1T6
7	<i>Murashige & Skoog</i> + 0.5/10 ANA/BAP	M1T7
8	<i>Woody Plant</i> + 0/0 ANA/BAP	M2T1
9	<i>Woody Plant</i> + 0/5 ANA/BAP	M2T2
10	<i>Woody Plant</i> + 0/10 ANA/BAP	M2T3
11	<i>Woody Plant</i> + 0.25/5 ANA/BAP	M2T4
12	<i>Woody Plant</i> + 0.25/10 ANA/BAP	M2T5
13	<i>Woody Plant</i> + 0.5/5 ANA/BAP	M2T6
14	<i>Woody Plant</i> + 0.5/10 ANA/BAP	M2T7

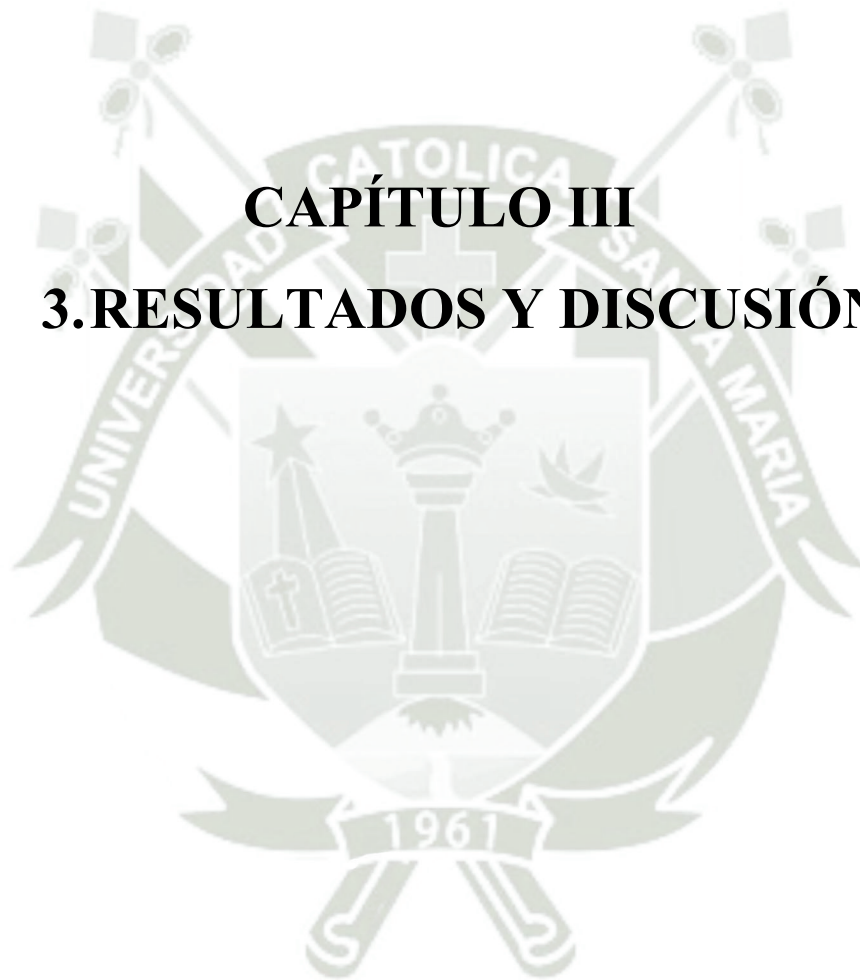
2.2.6.1. Evaluación

La unidad experimental fue el conjunto de frascos de vidrios, en los cuales se inocularon 5 plántulas por frasco y tres repeticiones.

La evaluación se realizó por observación directa, semanalmente durante 6 semanas. Los parámetros evaluados fueron: longitud del tallo (mm), número de hojas, número de nudos, longitud de brotes (mm).

CAPÍTULO III

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1.FASE DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *C. officinalis* L. Y *C. pubescens* VAHL

La fase de establecimiento *in vitro* comprendió la desinfestación e inoculación de semillas colectadas de las especies *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl en la provincia de Chanchamayo, en frascos de vidrio con medio de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) suplementado con ácido giberélico en tres concentraciones (0, 10 y 20 μM). Previo a la inoculación se realizó un proceso de desinfestación de las semillas evaluando el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio 2.5% (5, 8 y 10 min)

Se evaluó el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) para evitar la contaminación y tratamiento con diferentes concentraciones de ácido giberélico para estimular la germinación de las semillas.

En caso de *C. pubescens* Vahl se realizó un pre-tratamiento de germinación consistente en un remojo durante 24 horas en soluciones con diferentes concentraciones de KNO_3 (0, 500 y 1000 ppm), esto para activar la semilla. Finalizando el pre-tratamiento las semillas se inocularon en los frascos de vidrio con medio de cultivo *Murashige & Skoog* (1962) sin hormonas.

3.1.1. TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN CON HIPOCLORITO DE SODIO

Para la desinfestación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl se utilizó el hipoclorito de sodio (NaOCl) como desinfectante ya que tiene la ventaja de enjuagarse más fácilmente después de la esterilización y así eliminar los agentes contaminantes no deseados (22). La solución de hipoclorito de sodio que se utilizó tuvo una concentración de 2.5% debido a que es la concentración a la cual no se registra contaminación según lo citado por Lima, 2018.

Se aplicó la concentración de hipoclorito de sodio al 2.5 % en tres tiempos de inmersión (5, 8 y 10 min); en los cuales después del análisis estadístico no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.9168$) de desinfestación (anexo 7.3)

Los resultados del ensayo para semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados obtenidos en la evaluación de los distintos tratamientos con hipoclorito de sodio 2.5% para semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

TRAT.	ESPECIE	INMERSIÓN	% CONTAMINACIÓN
E1D1	<i>C. officinalis</i>	5 min	11.11 ± 7.86
E1D2	<i>C. officinalis</i>	8min	22.22 ± 7.86
E1D3	<i>C. officinalis</i>	10 min	0.00 ± 0.00
E2D1	<i>C. pubescens</i>	5 min	0.00 ± 0.00
E2D2	<i>C. pubescens</i>	8min	5.56 ± 7.86
E2D3	<i>C. pubescens</i>	10 min	0.00 ± 0.00

Promedio correspondiente a 30 semillas por tratamiento con tres repeticiones cada uno.

Podemos ver que en los resultados obtenidos el tratamiento E1D2 (*C. officinalis* + 8 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) presenta el valor más alto de contaminación con 22.22 %, en comparación con E1D1 (*C. officinalis* + 5 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) que presenta un valor de 11.11 % de contaminación provocada por hongos y bacterias. En el caso de E1D3 (*C. officinalis* + 10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) no se registró contaminación.

El E2D2 (*C. pubescens* + 8 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) presenta el valor más alto de contaminación con 5.56 %, en comparación con E2D1 (*C. pubescens* + 5 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) y E2D3 (*C. pubescens* + 10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio 2.5 %) en los cuales no se registró contaminación. Estos resultados comparados entre las dos especies de *Cinchona* se pueden observar en la **Figura 7**.

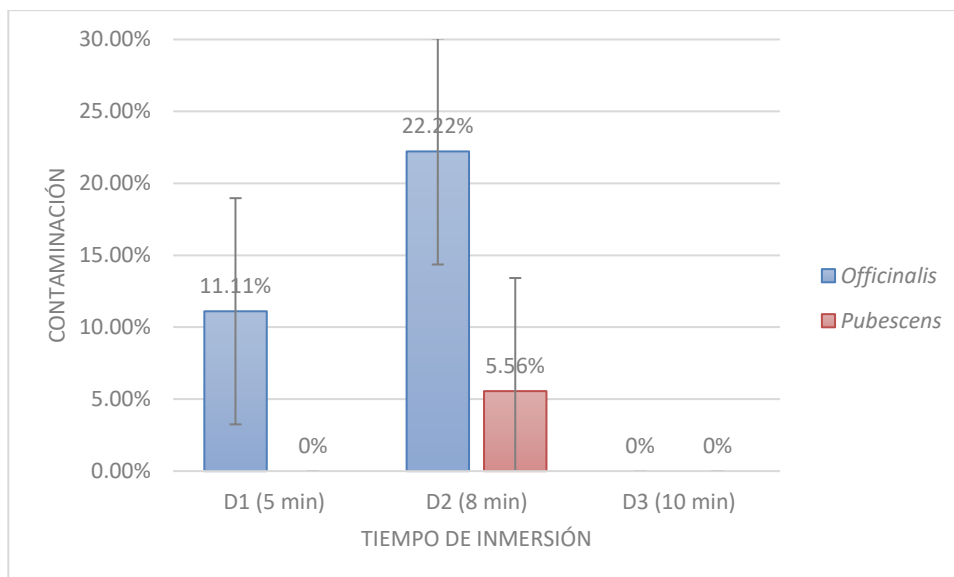


Figura 7. Porcentaje promedio de contaminación de los tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.



Figura 8. Frasco con semillas de *C. officinalis* L. contaminado después del tratamiento de desinfección.



Figura 9. Frasco con semillas de *C. pubescens* Vahl. contaminado después del tratamiento de desinfestación.

3.1.2. TRATAMIENTO CON ÁCIDO GIBERÉLICO PARA GERMINACIÓN DE *Cinchona. officinalis* L y *C. pubescens* VAHL.

La última etapa de la fase de establecimiento fue el tratamiento con ácido giberélico (AG_3) que es utilizado comúnmente para romper la dormancia de las semillas ya que no pertenecen a la zona. El empleo del ácido giberélico permite incrementar tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas (22).

3.1.2.1. Porcentaje de semillas germinadas

Se trabajó con tres tratamientos de ácido giberélico y se evaluó el porcentaje de germinación tras 30 días de sembradas. Después del análisis estadístico de los resultados obtenidos en la germinación *in vitro* de semillas, se encontró diferencia significativa en las concentraciones de AG_3 por cada tratamiento ($p=0.0271$) y la interacción entre las 2 especies y las diferentes concentraciones de AG_3 ($p=0.0138$) para la germinación de semillas (anexo 2); los resultados del porcentaje de germinación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl podemos observarlos en la **Tabla 13** y en la **Figura 10** se muestra la comparación del porcentaje germinación entre los dos tipos de semillas

Tabla 13. Porcentaje de germinación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl en medio MS (1962) con tres diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃) después de 30 días.

TRAT.	ESPECIE	AG ₃ (μM)	% GERMINADO
E1D1	<i>C. officinalis</i>	0	80.00 ± 4.71 ^c
E1D2	<i>C. officinalis</i>	10	58.89 ± 8.31 ^c
E1D3	<i>C. officinalis</i>	20	34.44 ± 7.86 ^b
E2D1	<i>C. pubescens</i>	0	1.11 ± 1.57 ^a
E2D2	<i>C. pubescens</i>	10	3.33 ± 0.00 ^a
E2D3	<i>C. pubescens</i>	20	3.33 ± 2.72 ^a

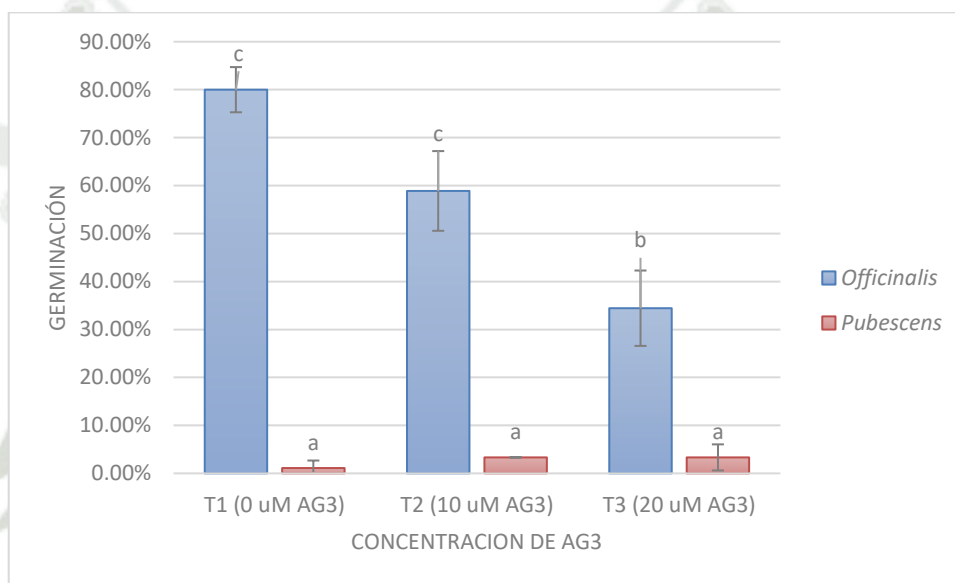


Figura 10. Comparación del porcentaje promedio de germinación en los diferentes tratamientos de ácido giberélico aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

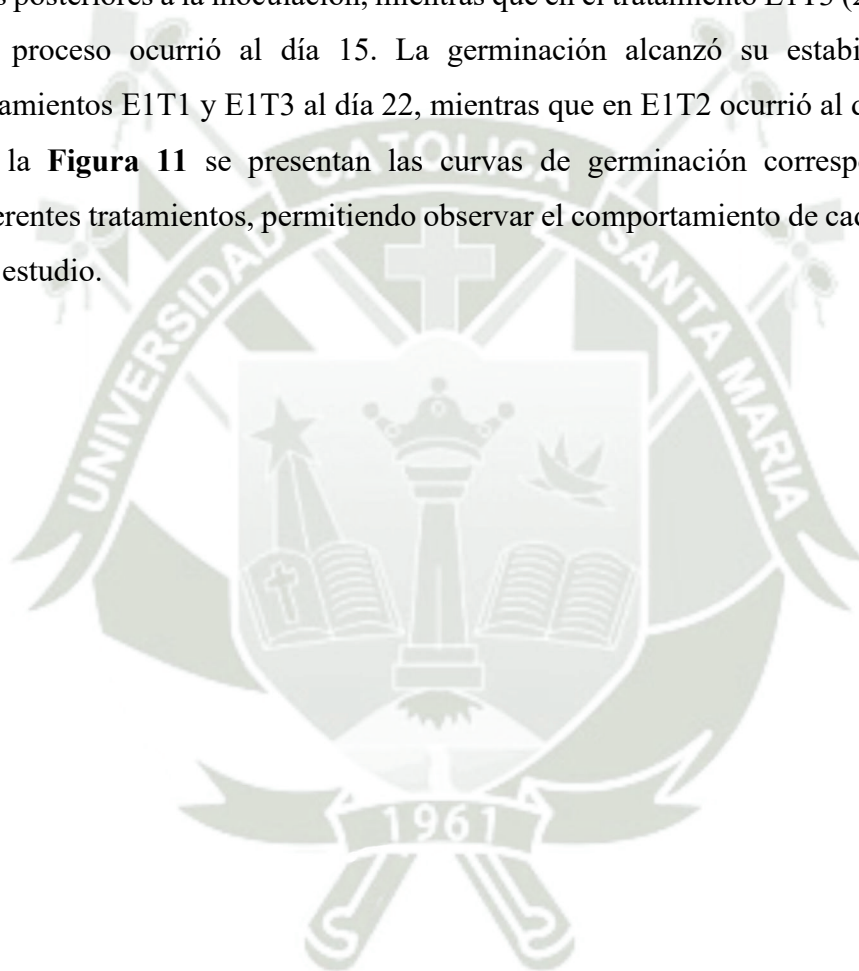
Podemos ver que los resultados obtenidos, aplicando las distintas concentraciones de ácido giberélico (AG₃) a semillas de *C. officinalis* L. en el E1T3 (*C. officinalis* + 20 μM AG₃) se presentó el valor más bajo de germinación con 34.44 %, el E1T2 (*C. officinalis* + 10 μM AG₃) tuvo un valor de 58.89 % y el T1 (*C. officinalis* + 0 μM AG₃) tuvo el valor más alto de germinación con 80 %, siendo el promedio total de germinación 57.78 % entre los tres tratamientos. Para semillas de *C. pubescens* Vahl en el tratamiento E2T1 (*C. pubescens* + 0 μM AG₃) se presentó el valor más bajo de germinación con 1.11 %, el tratamiento E2T1 (*C. pubescens* + 10 μM AG₃)

y el tratamiento E2T2 (*C. pubescens* + 20 μM AG_3) tuvieron el valor más alto de germinación de 3.33 %, siendo el promedio total de germinación 2.59 % entre los tres tratamientos.

3.1.2.2. Tiempo de germinación de *C. officinalis* L.

El proceso de germinación de *C. officinalis* L. varió según los tratamientos evaluados. En los tratamientos E1T1 (0 μM) y E2T2 (10 μM), la germinación se inició a los 14 días posteriores a la inoculación, mientras que en el tratamiento E1T3 (20 μM), el inicio del proceso ocurrió al día 15. La germinación alcanzó su estabilización en los tratamientos E1T1 y E1T3 al día 22, mientras que en E1T2 ocurrió al día 23.

En la **Figura 11** se presentan las curvas de germinación correspondientes a los diferentes tratamientos, permitiendo observar el comportamiento de cada uno a lo largo del estudio.



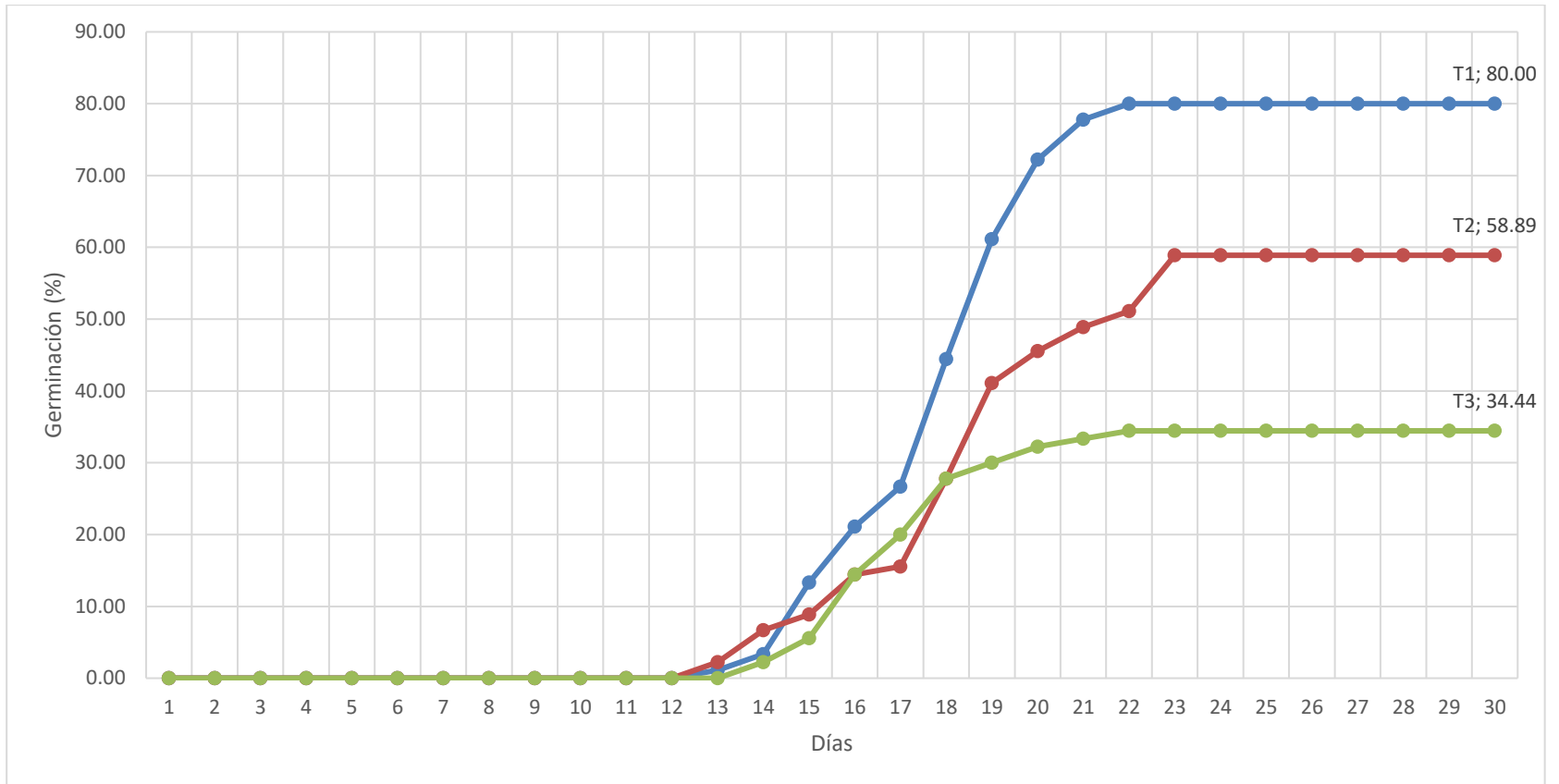


Figura 11. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG₃ aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L.

La germinación de *C. pubescens* Vahl se presentó diferente para los distintos tratamientos evaluados, en E2T2 (10 μM) la germinación se inició a los veinte días de inoculadas las semillas, en el tratamiento E2T3 (20 μM) la germinación se inició a los veintitrés días de inoculadas, en comparación con el tratamiento E2T1 (0 μM) que la germinación inició en el día treinta. La germinación se estabilizó en E2T2 y E2T3 al día veinte, y en E2T1 al día treinta, debido a que solo germinó una semilla. En la **Figura 12** se muestran las curvas de germinación para los distintos tratamientos, observándose los resultados de los tratamientos durante la investigación.



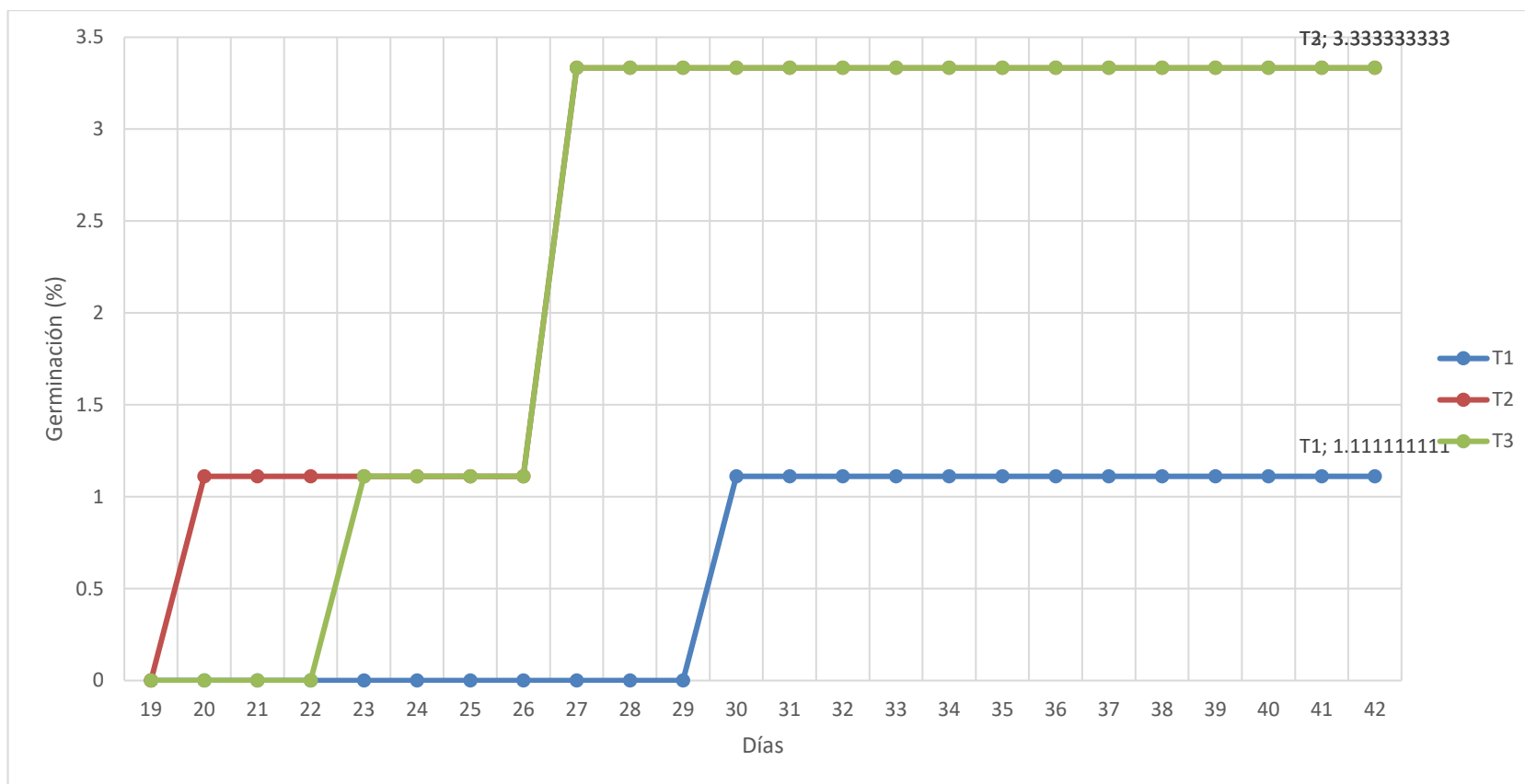


Figura 12. Curva de germinación acumulativa de los tres tratamientos con AG₃ aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *C. pubescens* Vahl.



Figura 13. Semillas de *C. officinalis* L. germinadas

3.1.3. TRATAMIENTO CON NITRATO DE POTASIO PARA LA GERMINACIÓN DE *C. pubescens* VAHL.

3.1.1.1. Porcentaje de semillas germinadas

Se trabajó con tres tratamientos de remojo por 24 horas en diferentes concentraciones de nitrato de potasio (KNO_3) y se evaluó el porcentaje de germinación tras 30 días de la siembra, Después del análisis estadístico de los resultados obtenidos en la germinación *in vitro* de semillas de *C. pubescens* Vahl, se encontró si existía diferencia significativa en las concentraciones de KNO_3 por cada tratamiento ($p=0.0033$) para la germinación de semillas (anexo 7.11); los resultados del porcentaje de germinación de semillas de *C. pubescens* Vahl podemos observarlos en la **Figura 14.**

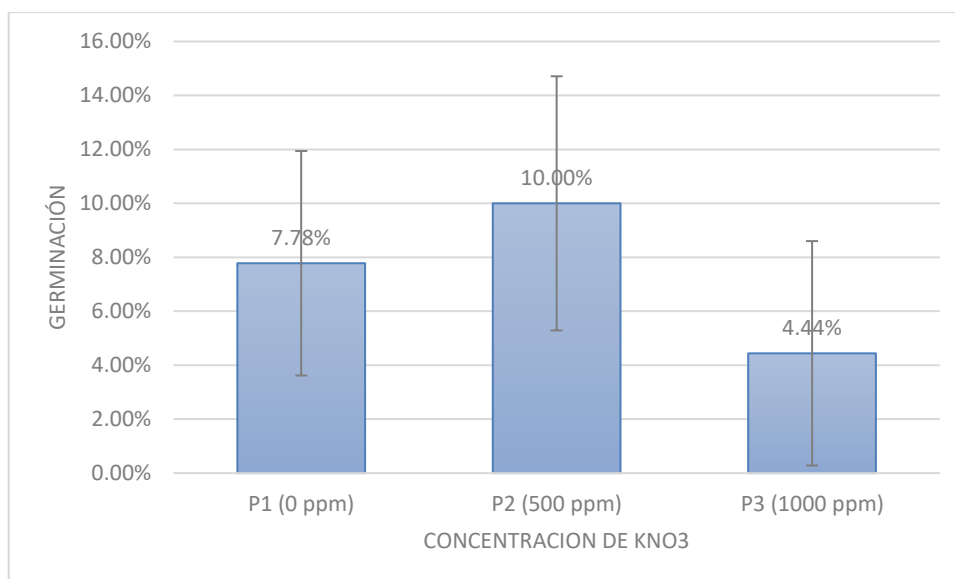


Figura 14. Porcentaje medio de germinación en los distintos tratamientos utilizados en la germinación in vitro de semillas de *C. pubescens* Valh.

Podemos ver que los resultados obtenidos, aplicando las distintas concentraciones de nitrato de potasio (KNO₃) a semillas de *C. officinalis* L. después de la prueba de especificidad de Duncan, obtenemos que el mejor tratamiento es el P2 (500 ppm KNO₃) que presentó el valor más alto de germinación (10 %), el P1 (0 ppm KNO₃) tuvo un valor de 7.78 % y el P3 (1000 ppm KNO₃) tuvo el valor más bajo de germinación con 4.44 %, siendo el promedio total de germinación 7.41 % entre los tres tratamientos.

3.1.1.2. Tiempo de germinación de *C. pubescens* Valh

La germinación se presentó diferente para los distintos tratamientos evaluados, en P1 (0 ppm KNO₃) y P2 (500 ppm KNO₃) la germinación se inició a los trece días de inoculadas, en comparación con el P3 (1000 ppm KNO₃) que la germinación inició en el día quince. La germinación se estabilizó en T1 y T3 al día 18, y en T2 al día 20. En la **Figura 15** se muestran las curvas de germinación de los distintos tratamientos, observándose el resultado de los tratamientos durante la investigación.

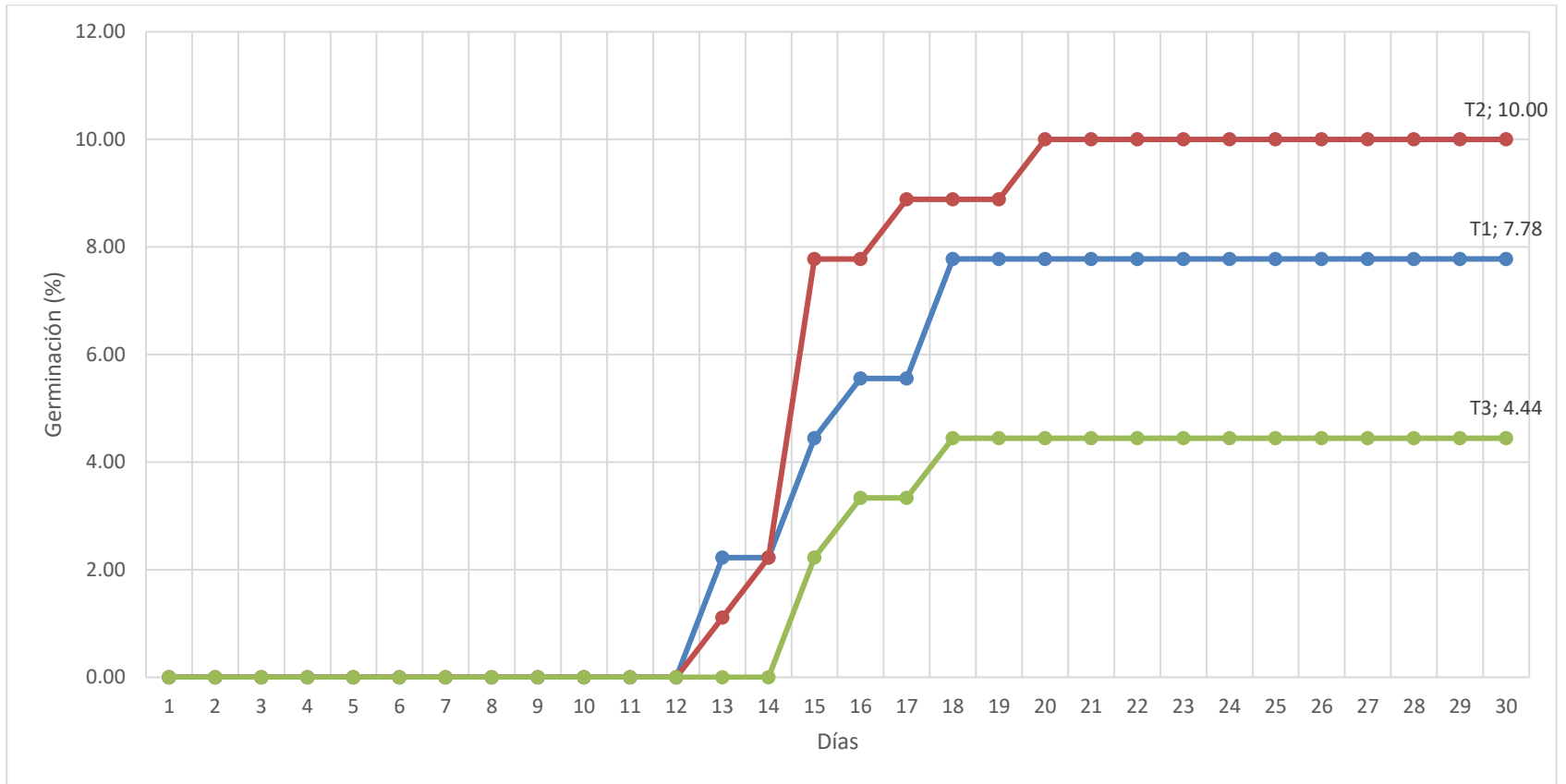


Figura 15. Porcentaje medio de germinación en los distintos tratamientos con KNO_3 aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *C. pubescens* Vahl.



Figura 16. Semillas de *C. pubescens* Vahl germinadas

3.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *C. officinalis* L.

Tras la etapa de establecimiento *in vitro*, se seleccionaron y propagaron plántulas con el propósito de obtener una cantidad adecuada para la fase de multiplicación. En esta etapa, se evaluó el impacto de los reguladores de crecimiento mediante la aplicación de tres concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y tres concentraciones de benzilaminopurina (BAP), lo que permitió establecer siete tratamientos por cada medio de cultivo utilizado.

La interacción entre los reguladores de crecimiento desempeña un papel crucial en los procesos morfogénicos. En este sentido, se buscó analizar la influencia de las combinaciones de citoquininas y auxinas en la inducción de brotes en plántulas previamente establecidas. Para evaluar el efecto de las concentraciones de BAP en combinación con ANA, se seleccionaron los tejidos que presentaron mayores niveles de formación de brotes viables, los cuales fueron posteriormente transferidos a un medio de cultivo fresco con la misma formulación y concentración de fitoreguladores.

3.2.1. ENSAYO CON REGULADORES DE CRECIMIENTO ANA Y BAP EN MEDIOS *MURASHIGE & SKOOG* y *WOODY PLANT*

Se evaluó el desarrollo de las plántulas de *C. officinalis* L. mediante la observación y medida de cuatro parámetros: longitud (mm) de tallo por explante, número de hojas por explante, número de nudos por explante y longitud (mm) de brotes por explante en cada uno de los 14 tratamientos generados.

3.2.1.1. Longitud (mm) de Tallo

En la evaluación de la variable Longitud (mm) de tallo promedio por explante, al realizar el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos no se encontró diferencias significativas ($p=0.0791$) entre los tratamientos (anexo 7.12), los promedios de longitud de tallos por explante durante seis semanas en los catorce tratamientos generados se muestran en la **Figura 17**.

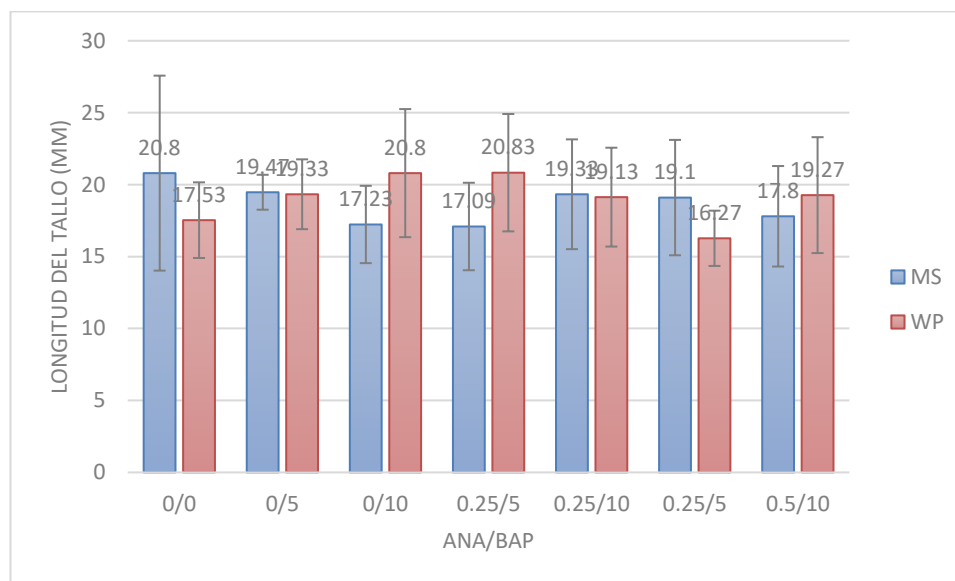


Figura 17. Promedio de longitud (mm) de tallos tras seis semanas de los catorce tratamientos con interacción ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L.

El mayor valor obtenido es del tratamiento M1T4 (WP + 0.25 μ M ANA + 5 μ M BAP) con 20.83 mm, seguido de los tratamientos M1T1 (MS + 0 μ M ANA + 0 μ M BAP) y M2T3 (WP + 0 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 20.80 mm respectivamente, el menor valor obtenido de longitud de tallos es para el tratamiento M2T6 (WP + 0.5 μ M ANA + 5 μ M BAP) con 16.27 mm de promedio de longitud de tallo por explante.

3.2.1.2. Número de hojas

En la evaluación de la variable número de hojas promedio por explante, al realizar el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos se encontró diferencias significativas ($p=0.0184$) entre las diferentes combinaciones

hormonales (anexo 7.13), los promedios de número de hojas por explante durante seis semanas en los catorce tratamientos generados se muestran en la **Figura 18**.

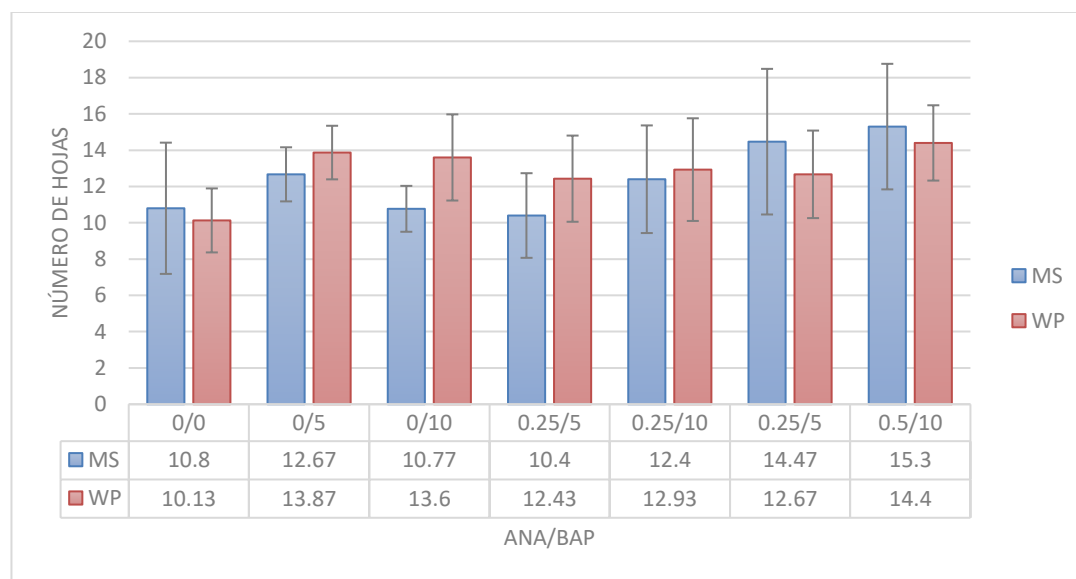


Figura 18. Promedio de número de hojas por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L.

Luego de la prueba de especificidad Duncan obtenemos que el mejor tratamiento es el M1T7 (MS + 0.5 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 15.30 hojas promedio por explante, seguido de los tratamientos M1T6 (MS + 0.5 μ M ANA + 5 μ M BAP) y M2T7 (WP + 0.5 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 14.47 y 14.40 hojas promedio por explante respectivamente, el menor valor obtenido de número de hojas es para el tratamiento M2T1 (WP + 0 μ M ANA + 0 μ M BAP) con 10.13 número de hojas promedio por explante.

3.2.1.3. Número de nudos

En la evaluación de la variable número de nudos promedio por explante, al realizar el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos se encontró diferencias significativas ($p=0.0295$) entre las diferentes combinaciones hormonales (anexo 7.14), los promedios de número de nudos por explante

durante seis semanas en los catorce tratamientos generados se muestran en la **Figura 19**.

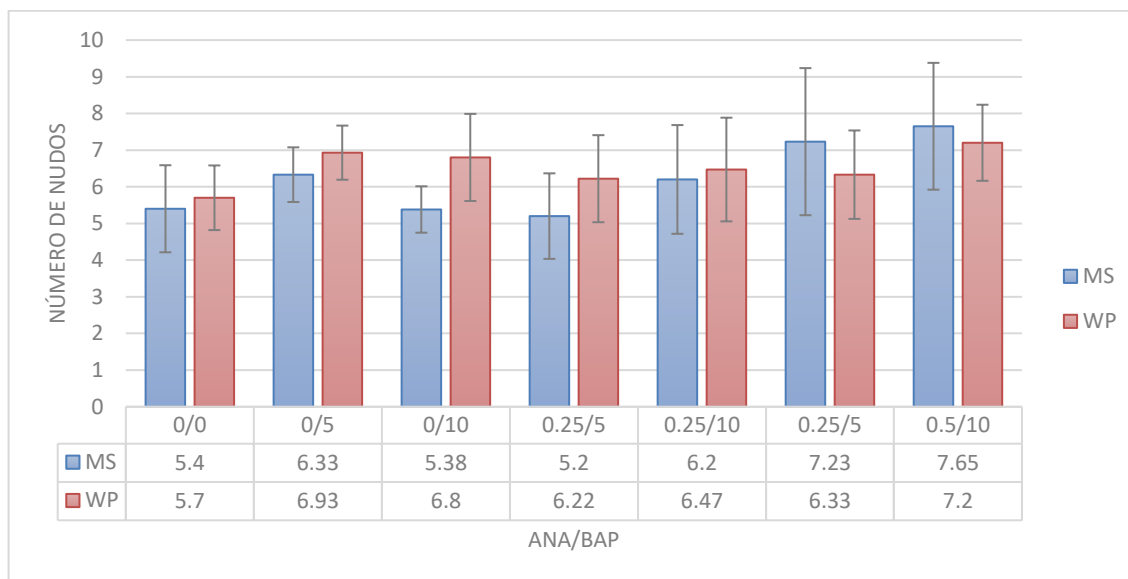


Figura 19. Promedio de número de nudos por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L.

Luego de la prueba de especificidad Duncan obtenemos que el mejor tratamiento es el M1T7 (MS + 0.5 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 7.65 nudos promedio por explante, seguido de los tratamientos M1T6 (MS + 0.5 μ M ANA + 5 μ M BAP) y M2T7 (WP + 0.5 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 7.23 y 7.20 nudos promedio por explante respectivamente, el menor valor obtenido de número de nudos es para el tratamiento M2T1 (WP + 0 μ M ANA + 0 μ M BAP) con 5.07 número de hojas promedio por explante.

3.2.1.4. Longitud (mm) de brotes

Evaluando la variable correspondiente a Longitud (mm) de brotes promedio por explante, luego de realizar el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos no se encontró diferencias significativas ($p=0.3964$) entre los tratamientos (anexo 7.15), los promedios de longitud de brotes por explante

durante seis semanas en los catorce tratamientos generados se muestran en la **Figura 20**.

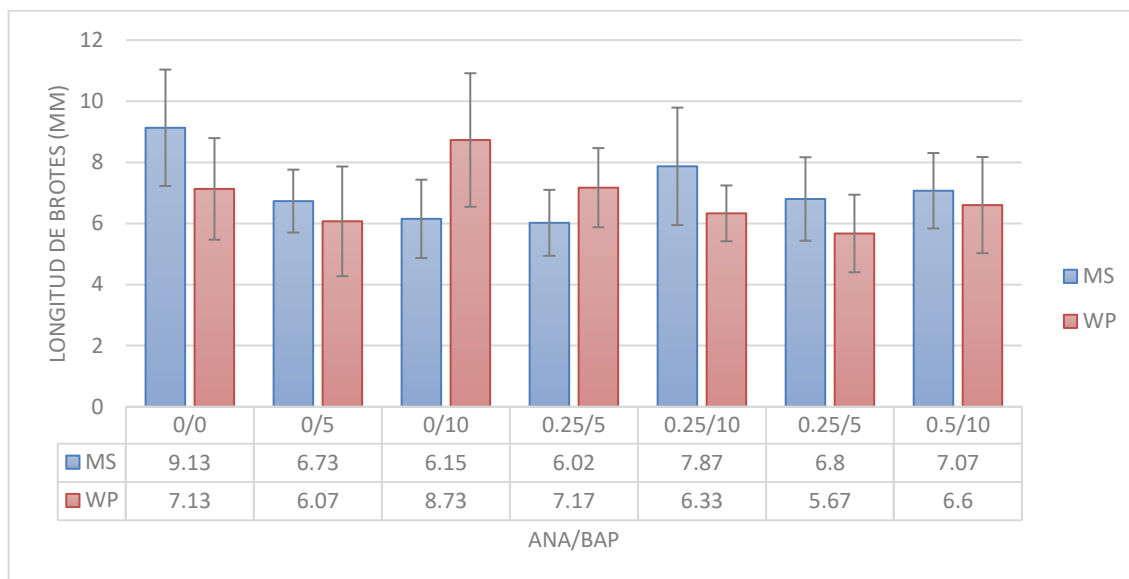


Figura 20. Promedio de longitud de brotes (mm) por explante tras seis semanas de los catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP en medios MS y WP para *C. officinalis* L.

El mayor valor obtenido es del tratamiento M1T1 (MS + 0 μ M ANA + 0 μ M BAP) con 9.13 mm, seguido de los tratamientos M2T3 (WP + 0 μ M ANA + 10 μ M BAP) y M1T5 (MS + 0.25 μ M ANA + 10 μ M BAP) con 7.87 mm respectivamente, el menor valor obtenido de longitud de tallos es para el tratamiento M2T6 (WP + 0.5 μ M ANA + 5 μ M BAP) con 5.67 mm de promedio de longitud de brotes por explante.



Figura 21. Plántula de *C. officinalis* L. en medio de cultivo *Murashige & Skoog* en etapa de multiplicación.

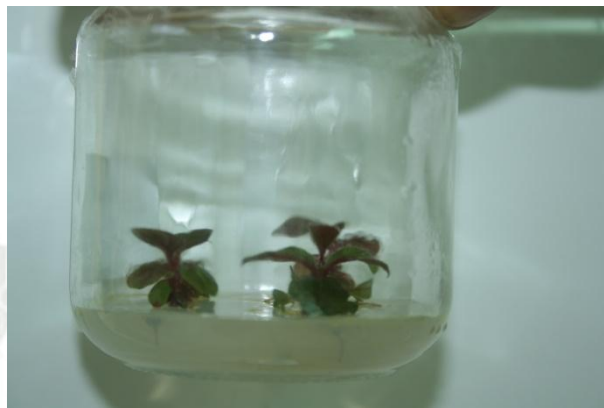


Figura 22. Plántula de *C. officinalis* L. en medio de cultivo *Woody Plant* en etapa de multiplicación.

3.3. DISCUSIÓN

3.3.1. FASE DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

La contaminación microbiana representa uno de los principales desafíos en la micropropagación *in vitro* de especies vegetales, ya que puede afectar tanto la germinación como el crecimiento inicial de las plántulas. En el presente estudio, la contaminación inicial por hongos y bacterias en semillas de *C. officinalis* L. influyó negativamente en la germinación y supervivencia de los explantes, lo que concuerda con estudios previos que evidencian la alta presencia de microorganismos asociados a semillas de especies forestales tropicales (63). Esta asociación microbiana, aunque en condiciones naturales puede facilitar ciertos procesos fisiológicos, representa una limitante para los trabajos *in vitro*, dado que puede generar pérdida de material vegetal y afectar la eficiencia de los protocolos de establecimiento (64).

Se ha documentado que los microorganismos contaminantes pueden ser clasificados en dos grandes grupos: aquellos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y aquellos introducidos durante la manipulación en el laboratorio. Entre los más comunes se encuentran hongos, bacterias y levaduras, denominados "vitropatógenos", los cuales pueden competir con el explante por los nutrientes del medio de cultivo, además de liberar compuestos tóxicos que afectan el desarrollo celular (59). Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en la literatura

científica, donde se destaca que los contaminantes microbianos no solo interfieren en el crecimiento de los explantes, sino que pueden inducir respuestas de estrés en los tejidos vegetales, afectando su viabilidad y capacidad de regeneración (65).

Para mitigar la contaminación, el uso de agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaOCl) es una estrategia comúnmente empleada en la desinfección de semillas. En el presente estudio, se determinó que la inmersión de las semillas en una solución de NaOCl al 50 % durante tiempos variables (5, 8 y 10 minutos) redujo significativamente la presencia de microorganismos contaminantes, alcanzando una tasa de contaminación del 0 %. Estos resultados coinciden con los reportados por Lima, quien demostró que concentraciones del 50 % de NaOCl son efectivas para disminuir la carga microbiana en explantes vegetales (24). Estudios similares han reportado que concentraciones adecuadas y tiempos de exposición controlados permiten una desinfección efectiva sin comprometer la viabilidad de los embriones (39).

No obstante, si bien el aumento en la concentración de NaOCl puede reducir la contaminación, su uso en niveles excesivos puede generar efectos fitotóxicos en los explantes, afectando su crecimiento y desarrollo. Investigaciones previas han señalado que una exposición prolongada o a concentraciones elevadas de NaOCl puede causar daño oxidativo en los tejidos, provocando necrosis y reducción en la tasa de germinación (66). Por ello, es crucial establecer protocolos de desinfección óptimos que minimicen la contaminación sin comprometer la integridad fisiológica de los explantes.

Germinación in vitro de *C. officinalis* L.

Las giberelinas son reguladores del crecimiento que inducen varios procesos del crecimiento y desarrollo como, la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (6). Además, Mroginski menciona que las hormonas desempeñan un papel muy importante en la fisiología de las semillas; en la mayoría el de ácido giberélico (AG3) mejora la velocidad de germinación, el porcentaje de germinación y apoya al crecimiento inicial de las plántulas (20).

En la presente investigación se aplicó tres concentraciones de AG3, (0,10 y 20 μM), la cual presentó diferencias significativas entre tratamientos fue el T1 con una concentración de 0 μM de AG3 obtuvo el valor más alto de 80.00 % de germinación, que coincide con estudios realizados en *C. officinalis* L., utilizando concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/l de AG3 arrojando el 88,67 y 83,33 % de germinación respectivamente. Sin embargo, al ensayar en *C. pubescens* aplicando una concentración de 1000 mg/l AG3 obtuvieron valores bajos de 33,34 % de germinación, lo que difiere con los resultados obtenidos en la presente investigación observado en el T3 con un 74,44 % de germinación a una concentración de 10 μM AG3 (6). Se manifiesta que se debe utilizar bajas concentraciones de AG3 (1,0 mg/l), ya que induce a la germinación de las semillas y en altas concentraciones inhibe la germinación. Con respecto a los días a la germinación in vitro las semillas, se presentó a los 15 días en el T3 y se estabilizó a los 45 días de sembradas, estos resultados son similares a los obtenidos por Jäger, quien afirma que las semillas de *C. pubescens* germinan entre 10 a 40 días utilizando la misma cantidad de 1,0 mg/l de AG3. El ácido giberélico en una concentración de 1,0 mg/l, incrementó esta variable, superior y diferente a lo reportado en los tratamientos de 0,0 y 0,5 mg/l (11). Las menores velocidades de germinación se presentaron en los tratamientos 0,0 y 0,5 mg/l de ácido giberélico, mientras que a una concentración de 1,0 mg/l se acortó el periodo de germinación de las semillas. En general se observó que conforme aumenta la concentración de ácido giberélico, aumenta la velocidad de germinación, lo cual concuerda con lo mencionado por los diferentes autores, quienes señalan que la germinación in vitro tiene ventajas, ya que aumenta la tasa de germinación, reduce el tiempo y homogeniza la germinación, gracias al fitorregulador de crecimiento de acción hormonal (AG3) que estimula la germinación de las semillas.

3.3.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN IN VITRO

Los explantes cultivados in vitro no se comportan completamente autotróficos, ya que el medio de cultivo proporciona agua, nutrientes, azúcares y reguladores de crecimiento (19). Los nutrientes están involucrados en diferentes procesos fisiológicos, como activación de enzimas, regulación del metabolismo y en los

componentes estructurales, se ha demostrado que las plantas con desbalance nutricional se convierten más susceptibles a las enfermedades (9). Una deficiencia puede desarrollarse cuando la concentración del AG3 en la solución nutritiva es baja, de tal manera que no puede ser utilizada por la planta. Los tejidos vegetales solo crecerán in vitro si se suministra un medio específico que cubra sus necesidades. Tanto el tipo de medio del cultivo como los suplementos necesarios, reguladores de crecimiento o vitaminas pueden requerir un ajuste de acuerdo a la especie (3). El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física. Pérez, asegura que, es necesario adicionar al medio de cultivo algunas hormonas especialmente (auxinas-citocininas), ya que en la micropropagación in vitro de explantes inducen a la división celular (24). Pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos (17). Las hormonas son claves para inducir la formación de nuevos brotes en diversos explantes in vitro (hojas, raíces, medula, cotiledones). En la presente investigación, de acuerdo a los resultados alcanzados en la fase de multiplicación in vitro de explantes, el tratamiento que obtuvo el mayor tamaño del brote fue el T3 (0,5 μ M de ANA + 10 μ M de BAP), con 22.30 mm de altura promedio; pero fue el tratamiento que menor número de brotes obtuvo, disminuyendo a la par el número de nudos y hojas. Esto se debe a que la combinación hormonal no permitió la brotación del explante, el cual solo se desarrolló en altura, indicando que los requerimientos hormonales son específicos para cada especie vegetal. De este modo, la mejor combinación hormonal (auxinas-citocininas) para la formación de brotes, nudos y hojas por explante en *C. officinalis* L., fue el T2 (0,2 mg/l de ANA + 2 mg/l de BAP), logrando obtener los mejores resultados con un número promedio de (4,73; 27 y 12,10) respectivamente, lo que corrobora con estudios realizados por Díaz, en *Cedrela montana* quien manifiesta que utilizando 2 mg/l de BAP sin combinación con ANA obtuvo un promedio de 3 brotes por cada explante, asegura que a medida que aumenta la concentración de BAP, se alcanzan mejores niveles de brotación en especies forestales (26). Otros estudios realizados por Santos, en *C. officinalis* L., sin adicionar al medio de cultivo MS ningún tipo de hormonas alcanzó una altura de 1.01 cm en brotes y un total de

4,1 brotes por cada explante, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que se alcanzó una altura promedio de 1,10 cm y se formó un número promedio de 4,73 brotes por cada explante (25). Sin embargo, el mismo autor, obtuvo esos resultados a los 90 días, en la presente investigación se adicionó al medio de cultivo una combinación hormonal en el T2 de (0,2 de ANA y 2,0 de BAP) la que permitió tener los mismos resultados, pero en 45 días. Esto demuestra que el ANA promueve la división celular, estimulando el crecimiento vegetativo de los explantes; y, el BAP induce la formación de nuevos brotes, permitiendo así la aparición de nudos y a su vez nuevas hojas.

En este mismo sentido, Jordan y Caseretto, afirman que si existe en el medio de cultivo un nivel relativamente alto de citoquininas (BAP) vs., auxinas (ANA), el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes. Si, por el contrario, los niveles de las dos hormonas se invierten, de manera que la relación de auxina es más alta vs. Las citoquininas, la expresión del tejido cambia y se originan raíces (25).

CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección *in vitro* de las semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl, se comprobó que el hipoclorito de sodio (NaOCl) a 2.5% en los tres tiempos de inmersión (5, 8 y 10 minutos), la contaminación de las semillas fue nula o casi nula.
- Para la germinación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl la adición de ácido giberélico (AG3) al medio de cultivo *Murashige & Skoog* (MS) influyó negativamente, se encontró que el mejor valor de germinación *in vitro* de las semillas de *C. officinalis* L, con un 80.00 % y de *C. pubescens* Vahl con 3.33 % fue con 0 μM de AG₃; para *C. pubescens* Vahl después del pre-tratamiento de remojo en KNO_3 durante 24 horas, se comprobó que la mejor concentración fue de 500 ppm KNO_3 logrando un 10.00 % de germinación.
- En fase de multiplicación *in vitro* al comparar el efecto de los medios de cultivo MS y WP no se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos.
- Al evaluar el efecto de las combinaciones hormonales durante la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *C. officinalis* L, el mejor resultado en longitud de tallo, hojas, nudos y formación de brotes se obtuvo en el tratamiento de la combinación hormonal MIT7 (0.5 μM de ANA + 10 μM de BAP); con un número promedio de 17.80 mm, 15.30, 7.65 y 7.07 mm respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl, se recomienda realizar la siembra a pocos días de haber realizado la recolección.
- En la germinación de semillas de *C. pubescens* Vahl se recomienda realizar un pre-tratamiento de germinación para activar el proceso, y continuar con estudios sobre la viabilidad de semillas.
- En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes, se recomienda adicionar al medio de cultivo MS un balance hormonal auxinas/citoquininas, con una menor concentración de ANA y una mayor concentración de BAP y probar la influencia de diferentes concentraciones de AG₃ en esta etapa de la micropropagación.
- Continuar con estudios similares con la especie *C. officinalis* L y *C. pubescens* Vahl., con la finalidad de lograr el enraizamiento y aclimatación de las especies a climas diferentes.
- En la fase de enraizamiento de la especie, probar concentraciones de auxinas superiores a las de citoquininas, ya que en estudios previos se pudo observar que el enraizamiento es muy bajo para estas especies.
- Realizar trabajos de investigación sobre la composición de diferentes sustratos para la fase de aclimatación, con la finalidad de generar mayores conocimientos y lograr la aclimatación de la especie al clima de la ciudad de Arequipa.
- Realizar estudios de la composición química de la corteza de las especies de *Cinchona* cuando son aclimatadas a un ecosistema diferente al que pertenecen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Padilla T. Estudio fenológico y análisis de las características del suelo donde se desarrolla *Cinchona officinalis* L. en cuatro relictos boscosos de la provincia de Loja. [Tesis pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2017.
2. Moya A. Auge y crisis de la Cascarilla en la Audiencia de Quina, siglo XVIII Quito: FLACSO; 1994.
3. Lima N. Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L. a partir de diferentes fuentes de material vegetal. [Tesis pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2016.
4. Zevallos P. Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Cinchona* en el Perú Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 1989.
5. Fernández J, Jiménez C, José F. Las Quinas de Caldas. En: VIII Congr. la Soc. Española Hist. las Ciencias y las Técnicas Madrid; 2004 p. 559-583.
6. Campos O. Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de *Cinchona pubescens* Vahl “Cascarilla”. [Tesis pregrado] Jaén: Universidad Nacional de Jaén; 2018.
7. Caraguay K. Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la provincia de Loja. [Tesis pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2016.
8. Jeréz E. Propagación sexual y asexual de la cascarilla (*Cinchona officinalis* L.), con fines de potencial reproductivo en el vivero Catiglata del consejo Provincial de Tungurahua. [Tesis pregrado] Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2017.
9. Gonzales K. Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja [Tesis pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2017.
10. Armijos R. Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo. [Tesis doctoral] Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2016.

11. Heinke J. Biology and Impacts of Pacific Island Invasive Species. 11. *Cinchona pubescens* (Red Quinine Tree). *Pacific Science*. 2015; 69(2): p. 133 – 153.
12. Young K, León B. Peru's humid eastern montane forest: An overview of their physical settings, biological diversity, human use and settlement, and conservation needs. 1st ed. Borgto H, editor. Baltimore: Centre of Research on Cultural and Biological Diversity of Andean Rainforest (DIVA); 1999.
13. Garden MB. Tropicos.org [Base de datos en línea]. [Online]; 2019. Acceso 4 de juniode 2019. Disponible en: <https://www.tropicos.org/Name/27900157>.
14. Garden MB. Tropicos.org. [Base de datos en línea]. [Online]; 2019. Acceso 4 de juniode 2019. Disponible en: <https://www.tropicos.org/Name/27900681>.
15. Kozlowski TT, Gunn CR. Seed Biology Importance, development, and germination. I ed. Kozlowski TT, editor. Londres: Academic Press, Inc; 1972.
16. Matilla A, Gallardo M, Puga-Hermida M. Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a reviw. 2nd ed.: Seed Science Research; 2005.
17. Bewley D, Black M. Seeds. En Bewley D, Black M. Seeds. Londres: Springer; 1994. p. 1-33.
18. Boesewinkel FD, Bouman F. Seed development and germination. En Boesewinkel F, Bouman F. The Seed: Structure and Function. Londres: Routledge; 2017. p. 24.
19. Prego I, Maldonado S, Otegui M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*. 1998; 82(4).
20. Elias S. Seed Quality Testing. En Sabry E. Handbook of Seed Science and Technology.: CRC Press; 2024. p. 561-601.
21. ISTA. International Rules for Seed Testing Association. [Online]; 2022. Acceso 23 de Enerode 2025. Disponible en: <https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing.html>.
22. Powell A. What is seed quality and how to measure it. En: Responding to the challenges of a changing world: The role of new plant varieties and high quality seed in agriculture. Proceedings of the Second World Seed Conference Roma; 2009 p. 8-10.
23. Ghorbani R, Seel W, Leifert C. Effects of environmental factors on germination and emergencia of *Amaranthus retroflexus*. *Weed Science*. 1999; 47(5).

24. Lima N, Moreno J, Eras V, Minchala J, Gonzáles D, Yaguana M, et al. Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Journal of High Andean Research*. 2018; 20(2): p. 169-178.
25. García L, Veneros J, Chavez SG, Oliva M, Rojas-Briceño NB. World historical mapping and potential distribution of *Cinchona* spp. in Peru as a contribution for its restoration and conservation. *Journal for Nature Conservation*. 2022; 70(126290).
26. Chawla H. *Introduction to Plant Biotechnology*. Tercera ed. Chawla H, editor. Boca Raton: CRC Press; 2009.
27. Prakash K, Chiang SL. *Plant tissue culture for biotechnology*. En Altman A, Hasegawa PM, editores. *Plant Biotechnology and Agriculture: prospects for the 21st century*. Londres: Elsevier; 2012. p. 131-138.
28. Pietrosiuk A, Furmanowa M, Łata B. *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*. 2007; 6(2-3): p. 459-473.
29. Duta-Cornescu G, Constantin N, Pojoga DM, Nicuta D, Simon-Gruita A. Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1): p. 838.
30. Abdalla N, El-Ramady H, Seliem MK, El-Mahrouk ME, Taha N, Bayoumi Y, et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*. 2022; 8(8): p. 677.
31. Kozai T, Fujiwara K, Aitken-Christie J. *The In Vitro Environment and its Control in Micropropagation*. En Kurata K, Kozai T, editores. *Transplant Production Systems*. Dordrecht: Springer eBooks; 1992. p. 247-282.
32. Altman A. *Agricultural Biotechnology*. Primera ed. Colwell R, First N, Schell J, Vasil I, editores. New York: CRC Press; 1997.
33. Al-Shara B, Mat Taha R, Rashid K. Biotechnological methods and limitations of micropropagation in papaya (*Carica papaya* L.) production: a review. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018; 28(5): p. 1208-1226.
34. Viveros P. *Cultivo in vitro de nudos de Croton ruizianus* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). [Tesis pregrado] Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2018.

35. Castillo A. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo Biotecnología Ud, editor. Uruguay: INIA Las Brujas; 2004.
36. Khan A, Jayanthi M, Nagavara Prasad G, Bhooshan N, Rao U. A rapid and efficient protocol for in vitro multiplication of genetically uniform *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016; 54: p. 477-481.
37. Benson E. Sepecial symposium: In vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2000; 36(2000): p. 141-148.
38. Kaçar YA. Somaclonal variation in in vitro culture. En: *In vitro culture of woody crops: Problem solving by new approaches: Book of proceedings*Jūrmala; 2024 p. 156-163.
39. George E, Hall M, De Klerk GJ. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Tercera ed. Dordrecht: The Netherland, The Back Ground Springer; 2008.
40. Thrope T. Morphogenesis and regeneration. En Thrope T. *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1994. p. 17-36.
41. Hazarika B, Teixeira da Silva JA, Talukdar A. Effective acclimatization of in vitro cultured plants: methods physiology and genetics. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. 2006; 2(55): p. 427-438.
42. Villalobos B, Thorpe T. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca W, Mroginski L, editores. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical); 1991. p. 128-141.
43. Roca W, Mroginski L. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. En Roca W, Mroginski L, editores. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical); 1991. p. 20-40.
44. Chamba L. Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L. a partir de vitroplantas, en la Argelia-Loja.[Tesis de pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2017.
45. Sudheer WN, Praveen N, Al-Khayri JM, Jain SM. Chapter 3 - Role of plant tissue culture medium components. En Chandra Rai A, Kumar A, Modi A, Singh M. *Advances in Plant Tissue Culture*.: Academic Press; 2022. p. 51-83.

46. Huamán A. Cultivo in vitro de *Polylepis incana* HBK. [Tesis pregrado] Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2012.
47. Zegarra K. Establecimiento in vitro de yemas y efecto de reguladores de crecimiento ANA y BAP en la micropropagación de *Polylepis rugulosa* (Queñua) de zonas altoandinas de Arequipa. [Tesis pregrado] Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2014.
48. Paredes D. Balance Hormonal para la fase de brotación y enraizamiento in vitro de explantes de *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja. [Tesis de pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2019.
49. Miguel Jordán JC. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Cardemil FAS&L. Fisiología Vegetal. La Serena: Ediciones Universidad de La Seren; 2006. p. 1-28.
50. Díaz GdC. Procesos Morfogénicos in vitro de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma Loja: Universidad Nacional de Loja; 2012.
51. Díaz APS. Modificación de nutrientes y agentes osmóticos sobre la limitación del crecimiento in vitro de *Cinchona officinalis*, L.: como herramienta de conservación Loja: Universidad Técnica Particular de Loja; 2011.
52. Apolo M. Germinación en el laboratorio e influencia de los hongos micorrízicos y la aplicación de nutrientes en el crecimiento de dos procedencias de *Cinchona pubescens*, a nivel de invernadero. [Tesis pregrado] Loja: Universidad Nacional de Loja; 2012.
53. Pérez C. Germinación de semillas de *Mimosa aculeaticarpa* var. *Biuncifera* (Benth) Barneby (Fabaceae). [Tesis pregrado] Pachuca de Soto: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007.

ANEXOS

Anexo 7.1 Macro y micronutrientes para medio *Murashige & Skoog* (1962).

Composición del medio		mg/L
MACROS	FÓRMULA	
- Nitrato de amonio	- NH_4NO_3	- 1650
- Nitrato de potasio	- KNO_3	- 1900
- Cloruro de Calcio	- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 440
- Sulfato de Magnesio	- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 370
- Fosfato monobásico de potasio	- KH_2PO_4	- 170
MICROS	FÓRMULA	mg/L
- Sulfato de magnesio	- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 22.3
- Sulfato de zinc	- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 8.6
- Ácido bórico	- H_3BO_3	- 6.2
- Yoduro de potasio	- KI	- 0.83
- Molibdato de sodio	- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 0.25
- Sulfato de cobre	- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	- 0.025
- Cloruro de cobalto	- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	- 0.025
FUENTE DE HIERRO	FÓRMULA	mg/L
- Ac. Etilendiamino tetra acético	- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 37.3
- Sulfato ferroso	- $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 27.8
VITAMINAS	FÓRMULA	mg/L
- Ácido ascórbico	- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	- 1980
- Glicina	- $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	- 75.1
- Acido nicotínico	- $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_2$	- 12.3
- Piridoxina.HCl		- 20.5
- Tiamina.HCl		- 33.73
- Mio-inositol		- 1800
CARBOHIDRATOS	FÓRMULA	mg/L
- Sacarosa	- $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	- 3000

Anexo 7.2 Macro y micronutrientes para medio *Woody Plant* (WP).

Composición del medio		mg/L
MACROS		
	FÓRMULA	
- Nitrato de amonio	- NH_4NO_3	- 400
- Cloruro de Calcio	- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 72.5
- Sulfato de Magnesio	- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 180.69
- Fosfato monobásico de potasio	- KH_2PO_4	- 170
- Sulfato de Potasio	- K_2SO_4	- 990
- Nitrato de Calcio	- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	- 386.34
MICROS		
	FÓRMULA	mg/L
- Sulfato de magnesio	- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 22.3
- Sulfato de zinc	- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 8.6
- Ácido bórico	- H_3BO_3	- 6.2
- Molibdato de sodio	- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 0.213
- Sulfato de cobre	- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	- 0.025
FUENTE DE HIERRO		
	FÓRMULA	mg/L
- Ac. Etilendiamino tetra acético	- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 37.3
- Sulfato ferroso	- $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 27.8
VITAMINAS		
	FÓRMULA	mg/L
- Ácido ascórbico	- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	- 1980
- Glicina	- $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	- 75.1
- Acido nicotínico	- $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_2$	- 12.3
- Piridoxina.HCl		- 20.5
- Tiamina.HCl		- 33.73
- Mio-inositol		- 1800
CARBOHIDRATOS		
	FÓRMULA	mg/L
- Sacarosa	- $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	- 3000

Anexo 7.3 Resultados obtenidos de la evaluación de desinfección con hipoclorito de sodio 2.5% en tres tiempos de inmersión para semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

TRAT.	ESPECIE	INMERSIÓN	REP.	TOTAL SEMILLAS	SEMILLAS CONT.	% CONT.
E1D1	<i>C. officinalis</i>	5 min	1	30	0	0.00
			2	30	5	16.67
			3	30	5	16.67
PROMEDIO						11.11
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						7.86
E1D2	<i>C. officinalis</i>	8 min	1	30	5	16.67
			2	30	10	33.33
			3	30	5	16.67
PROMEDIO						22.22
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						7.86
E1D3	<i>C. officinalis</i>	10 min	1	30	0	0.00
			2	30	0	0.00
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						0.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						0.00
E2D1	<i>C. pubescens</i>	5 min	1	30	0	0.00
			2	30	0	0.00
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						0.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						0.00
E2D2	<i>C. pubescens</i>	8 min	1	30	0	0.00
			2	30	5	16.67
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						5.56
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						7.86
E2D3	<i>C. pubescens</i>	10 min	1	30	0	0.00
			2	30	0	0.00
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						0.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						0.00

Anexo 7.4 Resultados obtenidos de la evaluación de concentración de ácido giberélico (AG3) sobre la germinación de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

TRATAMIENTO	ESPECIE	AG ₃ (μ M)	REP.	TOTAL SEMILLAS	SEMILLAS GERM.	% GERM.
E1T1	<i>C. officinalis</i>	0	1	30	26	86.67
			2	30	23	76.67
			3	30	23	76.67
PROMEDIO						80.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						4.71
E1T2	<i>C. officinalis</i>	10	1	30	21	70.00
			2	30	17	56.67
			3	30	15	50.00
PROMEDIO						58.89
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						8.31
E1T3	<i>C. officinalis</i>	20	1	30	7	23.33
			2	30	12	40.00
			3	30	12	40.00
PROMEDIO						34.44
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						7.86
E2T1	<i>C. pubescens</i>	0	1	30	0	0.00
			2	30	1	3.33
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						1.11
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						1.57
E2T2	<i>C. pubescens</i>	10	1	30	1	3.33
			2	30	1	3.33
			3	30	1	3.33
PROMEDIO						3.33
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						0.00
E1T3	<i>C. pubescens</i>	20	1	30	1	3.33
			2	30	2	6.67
			3	30	0	0.00
PROMEDIO						3.33
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						2.72

Anexo 7.5 Resultados obtenidos de la evaluación del pre-tratamiento con KNO_3 para la germinación de semillas de *C. pubescens* Vahl.

TRATAMIENTO	Concentración KNO_3 (ppm)	REP.	TOTAL SEMILLAS	SEMILLAS GERM.	% GERM.
P1	0	1	30	2	6.67
		2	30	4	13.33
		3	30	1	3.33
PROMEDIO					7.78
DESVIACIÓN ESTÁNDAR					4.16
P2	500	1	30	5	16.67
		2	30	2	6.67
		3	30	2	6.67
PROMEDIO					10.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR					4.71
P3	1000	1	30	1	3.33
		2	30	0	0.00
		3	30	3	10.00
PROMEDIO					4.44
DESVIACIÓN ESTÁNDAR					4.16

Anexo 7.6 Resultados obtenidos de longitud (mm) de tallos durante seis semanas en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP con tres repeticiones de *C. officinalis* L. en medio MS y WP.

Tratamiento	Medio	ANA/BAP	SEMANA					
			1	2	3	4	5	6
M1T1	MS	0-0	11.67	14.20	17.33	20.00	20.07	20.80
M1T2	MS	0-5	12.73	14.53	15.53	17.73	19.17	19.17
M1T3	MS	0-10	11.13	12.13	13.48	15.62	17.33	17.33
M1T4	MS	0.25-5	10.73	12.07	12.47	15.16	16.09	17.08
M1T5	MS	0.25-10	11.47	14.33	16.60	18.33	19.13	19.33
M1T6	MS	0.5-5	12.87	14.05	15.77	16.67	18.62	19.08
M1T7	MS	0.5-10	10.60	13.05	14.62	17.10	17.72	17.75
M2T1	WP	0-0	10.40	12.40	14.00	15.73	17.53	17.58
M2T2	WP	0-5	13.27	14.60	15.33	17.40	18.80	19.33
M2T3	WP	0-10	12.07	13.93	16.40	18.13	20.60	20.80
M2T4	WP	0.25-5	13.53	15.00	17.35	18.43	20.40	20.83
M2T5	WP	0.25-10	12.80	14.67	15.73	17.60	18.40	19.13
M2T6	WP	0.5-5	10.60	12.00	13.07	15.27	16.13	16.27
M2T7	WP	0.5-10	12.67	13.87	15.47	17.33	18.60	19.27

Anexo 7.7 Resultados obtenidos de número de hojas durante seis semanas en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP con tres repeticiones de *C. officinalis* L. en medio MS y WP.

Tratamiento	Medio	ANA/BAP	SEMANAS					
			1	2	3	4	5	6
M1T1	MS	0-0	6.00	7.33	8.80	10.67	11.73	10.80
M1T2	MS	0-5	5.73	6.80	8.53	10.27	12.67	12.67
M1T3	MS	0-10	5.60	6.57	7.83	8.53	10.30	10.77
M1T4	MS	0.25-5	5.87	7.60	8.44	9.64	10.00	10.40
M1T5	MS	0.25-10	6.27	6.80	9.20	10.67	12.13	12.40
M1T6	MS	0.5-5	6.53	8.07	9.17	11.70	13.40	14.47
M1T7	MS	0.5-10	6.40	7.67	9.17	12.23	12.77	15.30
M2T1	WP	0-0	5.87	6.40	7.33	7.73	10.13	10.13
M2T2	WP	0-5	5.87	7.20	8.40	10.00	12.80	13.87
M2T3	WP	0-10	6.27	6.40	8.80	10.67	12.80	13.60
M2T4	WP	0.25-5	5.87	7.13	8.70	10.07	11.83	12.43
M2T5	WP	0.25-10	6.00	7.33	8.67	10.13	12.00	12.93
M2T6	WP	0.5-5	6.13	7.33	9.20	11.33	11.60	12.67
M2T7	WP	0.5-10	6.40	7.20	8.27	10.67	12.80	14.40

Anexo 7.8 Resultados obtenidos de número de nudos durante seis semanas en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP con tres repeticiones de *C. officinalis* L. en medio MS y WP.

Tratamiento	Medio	ANA/BAP	SEMANAS					
			1	2	3	4	5	6
M1T1	MS	0-0	3.00	3.67	4.40	5.67	5.87	5.40
M1T2	MS	0-5	2.87	3.40	4.27	5.20	6.33	6.33
M1T3	MS	0-10	2.80	3.28	3.92	4.27	5.15	5.38
M1T4	MS	0.25-5	2.93	4.00	4.22	4.82	5.00	5.20
M1T5	MS	0.25-10	3.13	3.40	4.60	5.33	6.07	6.20
M1T6	MS	0.5-5	3.27	4.03	4.58	5.85	6.70	7.23
M1T7	MS	0.5-10	3.20	3.83	4.58	6.12	6.38	7.65
M2T1	WP	0-0	2.93	3.20	3.67	3.87	5.07	5.07
M2T2	WP	0-5	2.93	3.60	4.20	4.93	6.40	6.93
M2T3	WP	0-10	3.13	3.20	4.40	5.53	6.40	6.80
M2T4	WP	0.25-5	2.93	3.57	4.35	5.10	5.92	6.22
M2T5	WP	0.25-10	3.00	3.67	4.33	5.07	5.93	6.47
M2T6	WP	0.5-5	3.07	3.67	4.60	5.67	5.80	6.33
M2T7	WP	0.5-10	3.20	3.60	4.13	5.33	6.40	7.20

Anexo 7.9 Resultados obtenidos de longitud (mm) de brotes durante seis semanas en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP con tres repeticiones de *C. officinalis* L. en medio MS y WP.

Tratamiento	Medio	ANA/BAP	SEMANA					
			1	2	3	4	5	6
M1T1	MS	0-0	0.00	2.73	6.13	10.53	10.87	9.13
M1T2	MS	0-5	0.00	1.80	2.93	5.13	6.73	6.73
M1T3	MS	0-10	0.00	1.05	2.40	4.53	7.08	6.15
M1T4	MS	0.25-5	0.00	0.87	1.27	4.02	5.60	6.02
M1T5	MS	0.25-10	0.00	2.93	5.33	7.13	8.07	7.87
M1T6	MS	0.5-5	0.00	1.50	2.80	4.88	5.52	6.80
M1T7	MS	0.5-10	0.00	1.78	3.97	6.60	6.48	7.07
M2T1	WP	0-0	0.00	2.00	3.60	6.33	7.13	7.13
M2T2	WP	0-5	0.00	1.53	2.53	3.67	6.60	6.07
M2T3	WP	0-10	0.00	1.93	5.20	7.07	9.07	8.73
M2T4	WP	0.25-5	0.00	1.73	4.42	5.97	8.27	7.17
M2T5	WP	0.25-10	0.00	1.33	2.53	4.87	6.00	6.33
M2T6	WP	0.5-5	0.00	1.40	2.53	4.87	6.07	5.67
M2T7	WP	0.5-10	0.00	1.33	3.40	4.80	6.67	6.60

Anexo 7.10 Análisis de varianza y test de Duncan Alfa para la etapa de establecimiento *in vitro* de semillas de *C. officinalis* L. y *C. pubescens* Vahl.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	519.65	17	30.57	5.75	<0.0001
Especie	411.13	1	411.13	77.36	<0.0001
Desinfección	0.93	2	0.46	0.09	0.9168
Especie*Desinfección	0.48	2	0.24	0.05	0.9558
AG3	42.48	2	21.24	4.00	0.0271
Especie*AG3	51.37	2	25.69	4.83	0.0138
Desinfección*AG3	6.07	4	1.52	0.29	0.8853
Especie*Desinfección*AG3	7.19	4	1.80	0.34	0.8505
Error	191.33	36	5.31		
Total	710.98	53			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 5.3148 gl: 36

AG3	Medias	n	E.E.	
veinte	1.89	18	0.54	A
diez	3.11	18	0.54	A B
Cero	4.06	18	0.54	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Duncan Alfa=0.05

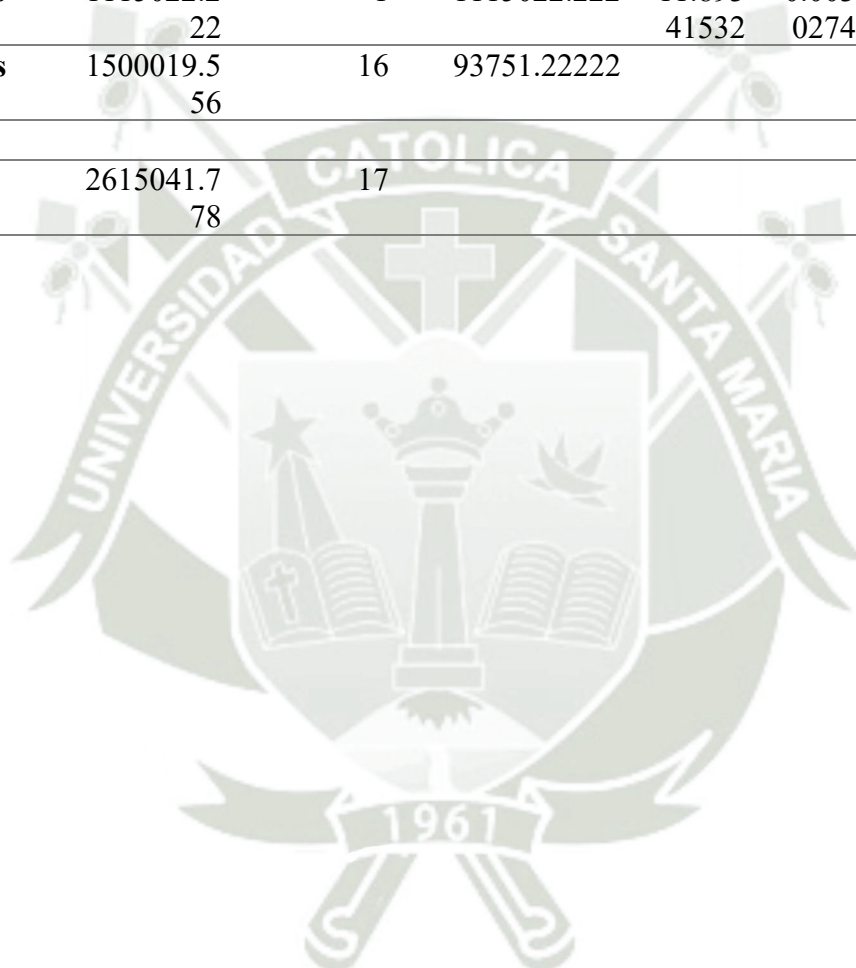
Error: 5.3148 gl: 36

Especie	AG3	Medias	n	E.E.	
Pubescens	Cero	0.11	9	0.77	A
Pubescens	diez	0.33	9	0.77	A
Pubescens	veinte	0.33	9	0.77	A
Officinalis	veinte	3.44	9	0.77	B
Officinalis	diez	5.89	9	0.77	C
Officinalis	Cero	8.00	9	0.77	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7.11 Análisis de varianza para la evaluación del efecto del nitrato de potasio en tres concentraciones para la germinación de semillas de *C. pubescens* Vahl.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1115022.2 22	1	1115022.222	11.893 41532	0.0033 02741	4.4939984 78
Dentro de los grupos	1500019.5 56	16	93751.22222			
Total	2615041.7 78	17				



Anexo 7.12 Análisis de varianza para la evaluación de longitud (mm) de tallos en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	1.17780423	1	1.17780423	0.2158 6227	0.6458 0358	4.19597182
Columnas	12.3057143	6	2.05095238	0.3758 8865	0.8880 8693	2.4452594
Interacción	70.2968254	6	11.7161376	2.1472 7712	0.0791 123	2.4452594
Dentro del grupo	152.775741	28	5.45627646			
Total	236.556085	41				

Anexo 7.13 Análisis de varianza para la evaluación de número de hojas en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	102.96	13	7.92	1.96	0.0662
Medio	2.24	1	2.24	0.55	0.4627
ANA/BAP	75.38	6	12.56	3.11	0.0184
Medio*ANA/BAP	25.33	6	4.22	1.05	0.4180
Error	113.11	28	4.04		
Total	216.07	41			

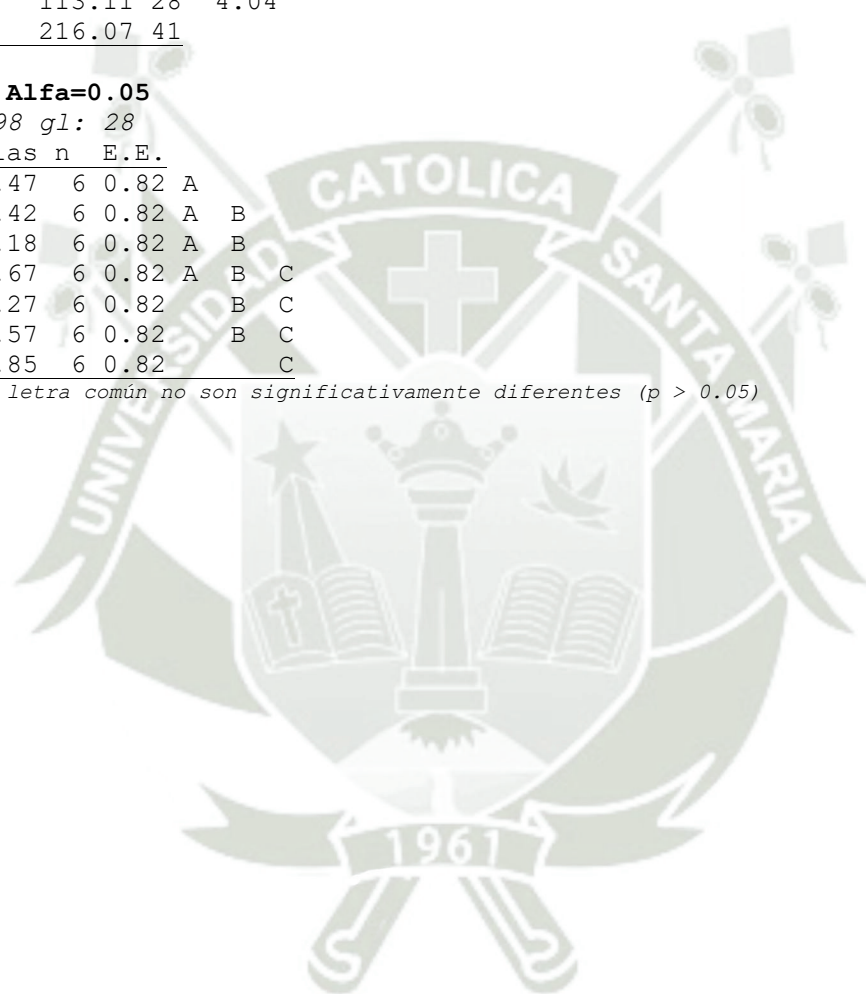
Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 4.0398 gl: 28

ANA/BAP Medias n E.E.

0/0	10.47	6	0.82	A	
0.25/5	11.42	6	0.82	A	B
0/10	12.18	6	0.82	A	B
0.25/10	12.67	6	0.82	A	B C
0/5	13.27	6	0.82	B	C
0.5/5	13.57	6	0.82	B	C
0.5/10	14.85	6	0.82	C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Anexo 7.14 Análisis de varianza para la evaluación de número de nudos en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22.84	13	1.76	1.80	0.0938
Medio	0.04	1	0.04	0.04	0.8345
ANA/BAP	16.36	6	2.73	2.79	0.0295
Medio*ANA/BAP	6.44	6	1.07	1.10	0.3869
Error	27.33	28	0.98		
Total	50.17	41			

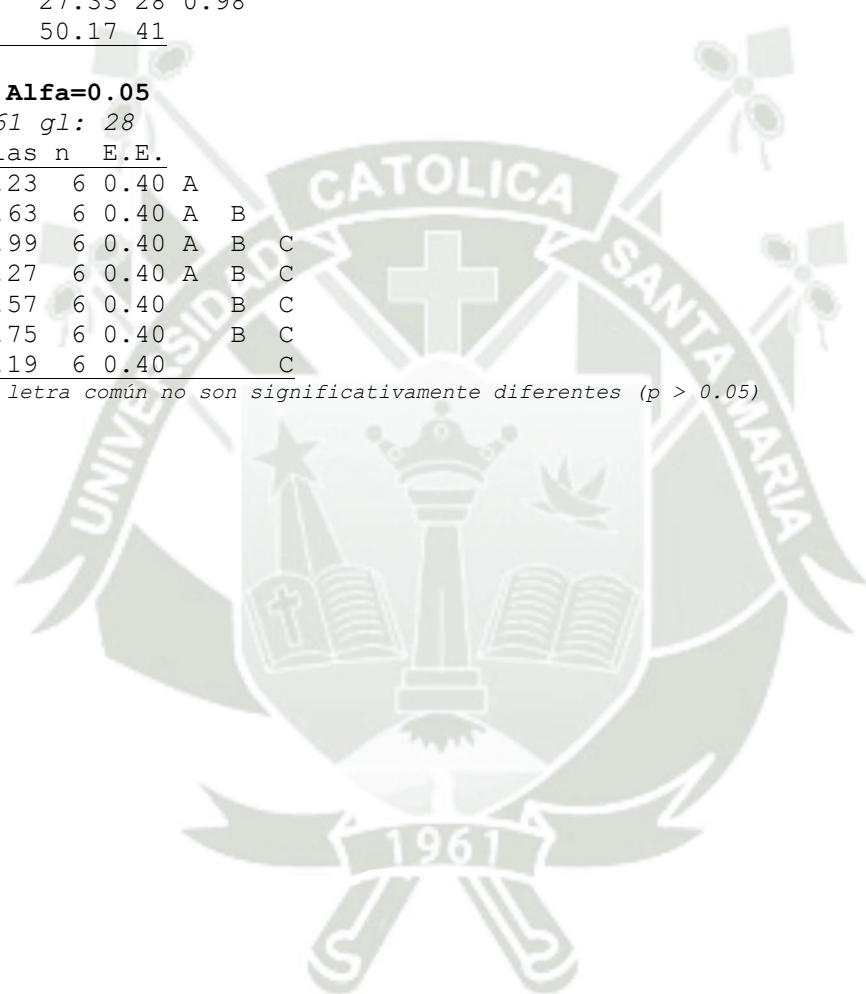
Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.9761 gl: 28

ANA/BAP Medias n E.E.

0/0	5.23	6	0.40	A	
0.25/5	5.63	6	0.40	A	B
0/10	5.99	6	0.40	A	B C
0.25/10	6.27	6	0.40	A	B C
0/5	6.57	6	0.40		B C
0.5/5	6.75	6	0.40		B C
0.5/10	7.19	6	0.40		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Anexo 7.15 Análisis de varianza para la evaluación de longitud (mm) de brotes en catorce tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BAP

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0.92016534	1	0.92016534	0.2543 9941	0.6179 405	4.19597182
Columnas	15.7175794	6	2.61959656	0.7242 4354	0.6337 0159	2.4452594
Interacción	23.5015476	6	3.9169246	1.0829 1765	0.3964 2642	2.4452594
Dentro del grupo	101.276296	28	3.61701058			
Total	141.415589	41				

