

PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE VITROPLANTAS DE *Cinchona officinalis* L., A NIVEL DE LABORATORIO EN LA PROVINCIA DE LOJA, ECUADOR

BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR THE INDUCTION OF CALLUSES FROM VITROPLANTAS OF *Cinchona officinalis* L., AT THE LABORATORY LEVEL IN THE PROVINCE OF LOJA, ECUADOR

Karina González Valdiviezo¹
Víctor Hugo Eras Guamán²
José Moreno Serrano³
Julia Minchala Patiño⁴
Magaly Yaguana Arévalo⁵
Cristian Valarezo Ortega⁶

Fecha de recepción: 20 enero 2018

Fecha de aprobación: 20 junio 2018

DOI: <https://doi.org/10.26495/rtzh1810.226115>



Resumen

Cinchona officinalis L., considerada una especie icónica del Ecuador, fue explotada durante el siglo XVIII el cultivo hasta el XIX que la llevó casi a la extinción. Hoy en día, utilizando como herramienta el cultivo de tejidos vegetales se puede dar solución a problemas naturales y/o inducidos en algunas especies forestales nativas, como el caso de *Cinchona*. Así, la presente investigación desarrollada en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja durante el año 2016, consistió en generar información sobre los procesos biotecnológicos que permitan la propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L., en sus fases de: implantación, inducción de callos e inducción de embriones. Se utilizó el medio de cultivo basal de Murashige & Skoog (MS) suplementado con vitaminas y hormonas. Se aplicó un diseño completamente al azar, analizado por medio de un ANAVA con prueba estadística de LSD Fisher. Para la desinfección de semillas, en la fase de implantación, se aplicó hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, donde los dos desinfectantes controlaron eficientemente la contaminación; mientras, en el ensayo de germinación el efecto de desinfección más la adición de AG3 al MS líquido resultó efectiva. En la fase de inducción de callos, los segmentos nodales se cultivaron en medio MS sólido, suplementado con auxinas y citoquininas; logrando los mejores resultados en la combinación hormonal. En la fase de inducción de embriones, los explantes se cultivaron en medio de MS sólido suplementado con auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones.

Palabras clave: *Cinchona officinalis* L., desinfección, germinación in vitro, callos, embriones.

Abstract

Cinchona officinalis L., considered an iconic species of Ecuador, was exploited during the eighteenth century until the nineteenth century that led it almost to extinction. Nowadays, using vegetable tissue culture as a tool can solve natural and/or induced problems in some native forest species, such as *Cinchona*. Thus, the present research developed in the Laboratory of Vegetal Micropropagation of the National University of Loja during the year 2016, consisted in generating information on the biotechnological processes that allow the in vitro

¹ Tesista de la Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja. Ecuador. Email: karogonzalezvaldiviezo@gmail.com

² Docente investigador, master en Desarrollo, Equidad y Género, Universidad Nacional de Loja. Ecuador. Email: victor.eras@unl.edu.ec

³ Docente investigador, master en Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

⁴ Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

⁵ Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

⁶ Técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

propagation of Cinchona officinalis L., in its phases of: implantation, callus induction and embryo induction. The basal culture medium of Murashige & Skoog (MS) supplemented with vitamins and hormones was used. A completely randomized design was applied, analyzed by means of an ANOVA with statistical test of Fisher LSD. For the disinfection of seeds, in the implantation phase, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide were applied, where the two disinfectants efficiently controlled the contamination; while, in the germination test the disinfection effect plus the addition of AG3 to the liquid MS was effective. In the induction phase of callus, the nodal segments were cultured in solid MS medium, supplemented with auxins and cytokinins; achieving the best results in the hormonal combination. In the embryo induction phase, the explants were cultured in solid MS medium supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations achieving the best results in the hormonal combination. In the embryo induction phase, the explants were cultured in solid MS medium supplemented with auxins and cytokinins in different concentrations.

Keywords: *Cinchona officinalis* L., disinfection, in vitro germination, callus, embryos.

1. Introducción

Cinchona officinalis L., “casarilla o quina”, simboliza la planta nacional del Ecuador y fue considerada como uno de los principales productos forestales económicamente importante desde el punto de vista medicinal. La Región Sur del Ecuador es el hábitat de muchas plantas útiles y entre ellas *Cinchona officinalis* L., la cual ha sido sobre-explotada y comercializada hacia otras partes del mundo (Acosta-Solís, 1947, 1989; Madsen, 2002).

Cinchona officinalis L., pertenece a la familia de las Rubiáceas, y es endémica de la provincia de Loja; sin embargo, la ocurrencia de esta especie también está registrada en Colombia y Perú a lo largo de la cordillera oriental y central de los Andes en los bosques montanos, desde los 2800 hasta los 3100 msnm (McComb, 1946; Harling, 1986; Garmendia, 2005; Missouri Botanical Garden, 2017). Se distribuye en "manchas" a diferentes altitudes y está asociada a otras especies que son usadas para detectar su presencia (Acosta-Solís, 1947).

El hábitat potencial de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja, abarca aproximadamente 9.836 km², de los cuales el 78,45% del hábitat se ha perdido y solo el 17,88% se encuentra protegido dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Parque Nacional Podocarpus y Yacuri) (Espinosa & Ríos, 2017). Según Acosta-Solís (1947); la casarilla por sus propiedades medicinales contra la malaria contribuyó durante más de dos siglos a las industrias de Europa y América (Hobhouse, 1985). Debido a esto, hizo que las poblaciones de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja fueran sobre-explotadas y comercializadas desde el siglo XVIII hasta el siglo XIX.

No obstante, actualmente en ecosistemas de la provincia de Loja todavía pueden encontrarse individuos aislados en potreros, formando grupos numerosos de arbustos grandes y rebrotes vegetativos, distanciados unos de otros, ubicados en suelos con poca cantidad de materia orgánica y pendientes pronunciadas (Garmendia, 2005). Sin embargo, actividades antrópicas como la agricultura, ganadería y deforestación, han tenido un impacto mucho más significativo en la destrucción de su hábitat que la propia extracción de la corteza (Madsen, 2002). Posiblemente la reducción del hábitat de *Cinchona officinalis* L., esté afectando la germinación y reclutamiento de individuos en las poblaciones remanentes (Reaka-Kudla, Wilson & Wilson, 1996; Rentería, 2002). Por tal razón, otras especies de *Cinchona* comparten la misma historia de sobre-explotación y comercialización debido a sus propiedades medicinales como: *Cinchona calisaya* en Bolivia y Perú, *Cinchona pitayensis* y *Cinchona lancifolia* en Colombia (Cuvi, 2009).

El futuro de *Cinchona officinalis* L., en el Ecuador es incierto, ya que en condiciones naturales presenta baja tasa de germinación y regeneración natural; y está catalogada como una especie en peligro de extinción; además, el país posee la mayor tasa de deforestación de la región, por lo que son urgentes los esfuerzos para la conservación eficiente de la especie (MacDicken et al., 2016). Bajo esta perspectiva, la presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal desde octubre de 2016 a julio de 2017 perteneciente a la Universidad Nacional de Loja, provincia de

Loja, en el marco del proyecto “Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro*”; con el propósito de generar información relevante sobre la propagación masiva (germinación *in vitro* e inducción de callos) de *Cinchona officinalis* L., a través de la utilización de metodologías alternativas (procesos biotecnológicos), y así aportar al manejo sustentable de la especie, asegurando su permanencia en los frágiles ecosistemas naturales. Todo esto con la finalidad de emprender programas de forestación y reforestación para recuperar los ecosistemas nativos degradados de la región sur del Ecuador.

2. Material y métodos

Ubicación del área de estudio

El presente trabajo de investigación se ejecutó durante el año 2016, en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja –UNL; ubicado al sur de la ciudad de Loja a 3 km del centro de la misma.

Fase de implantación (desinfección y germinación)

Se obtuvieron semillas del sector Uritusinga, cantón Catamayo, provincia de Loja; y se utilizó el medio de cultivo basal conformado por sales minerales de MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado con vitaminas y sacarosa al 2,0 %. Se ajustó el pH a 5.8 ± 0.2 con NaOH o HCL.

Las semillas se desinfectaron en la superficie con agua corriente más jabón líquido, seguido de inmersión en alcohol al 70 % por unos segundos, para luego sumergirlas en dos soluciones: hipoclorito de sodio (NaClO) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) durante diferentes tiempos de exposición. Así, el T1 (NaClO al 50 %, x 5 minutos + 1,0 mh/l AG3), T2 (NaClO al 50 %, x 10 minutos + 1,0 mh/l AG3), T3 (H₂O₂ al 2 %, x 5 minutos + 1,0 mh/l AG3) y, T4 (H₂O₂ al 2 %, x 10 minutos + 1,0 mh/l AG3). Luego de cada inmersión se realizó de 2 a 3 aclareos con agua destilada estéril. Se sembraron 2 semillas por tubo de ensayo y se incubaron a una temperatura de ± 23 °C en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. En el diseño experimental se utilizó un diseño complementa al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 75 días, cada 3 días después de realizada la siembra *in vitro*. Las variables que se evaluó fueron: porcentaje de contaminación y porcentaje de germinación.

Fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L.

Para esta fase, se utilizó segmentos nodales a partir de vitroplantas. Los explantes se cultivaron en el medio MS, suplementado con vitaminas, sacarosa 2, 0 % y, agar 0,6 %; se adicionó auxinas: 2,4-D y citoquininas: BAP, en diferentes concentraciones. Así, el T1 (1,0 mg/l 2, 4-D), T2 (2,0 mg/l 2, 4-D), T3 (3,0 mg/l 2, 4-D), T4 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP), T5 (2,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP), y T6 (3,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l BAP). El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$. Se sembraron 2 explantes por frasco y se incubaron a una temperatura de ± 23 °C; y, en total oscuridad. En el diseño experimental se utilizó un DCA, con 6 tratamientos y 3 repeticiones. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 80 días, cada 5 días después de realizada la siembra. Los variables que se evaluó fueron: número de días a la formación del callo, porcentaje de formación de callos, color, y, apariencia del callo

Fase de inducción de embriones de *Cinchona officinalis* L.

Se utilizó material proveniente de la fase de inducción de callos. Los explantes se cultivaron en medio de MS, suplementado con vitaminas, sacarosa 2, 0 % y, agar 0,6 %; se adicionó auxinas: 2,4-D y citoquininas: BAP, en diferentes concentraciones. Así, el T1 (sin hormonas), T2 (0,1 mg/l de 2, 4-D), y T3 (1,0 mg/l de 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN). Se ajustó el pH a $5,8 \pm 0,2$. Se sembraron 2 explantes por frasco y se incubaron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. En el diseño experimental se utilizó un DCA, con 3 tratamientos y 3 repeticiones. La evaluación se llevó a cabo por observación directa, durante 90 días, cada 5 días después de realizada la siembra. Los variables que se evaluó fueron: porcentaje de formación de embriones y porcentaje de contaminación.

Análisis estadístico de datos

Se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2016), en el cual se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para cada una de las variables en las tres fases: fase de implantación, fase de inducción de callos y, fase de inducción de embriones. Se estableció diferencias significativas con el test de LSD Fisher al 0,05 % de probabilidad con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias significativas en sus medias

3. Resultados

Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, en la fase de germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L

Contaminación de las semillas de *Cinchona officinalis* L.

Los resultados obtenidos referente a la contaminación de semillas de *Cinchona officinalis* L., en los tratamientos ensayados fue del 0 %. Durante los 30 días de evaluación en cada uno de los cuatro tratamientos (T1: 50 % NaClO + 5 min, T2: 50 % NaClO + 10 min, T3: 2 % de H₂O₂ + 5 min y, T4: 2 % de H₂O₂ + 10 min) se logró obtener un 100 % de semillas libre de contaminantes (vitropatógenos: hongos, bacterias y levaduras).

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

La germinación *in vitro* de las semillas se empezó a los 15 días para el tratamiento T1, T2 y T3, valores que se estabilizaron a los 57 días durante el tiempo de evaluación; mientras que en el T4 se evidenció a los 21 días, valor que se estabilizó a los 66 días de instalado el ensayo (Figura 1). El T1 y T3 obtuvieron el mayor porcentaje de germinación con el 86,67 % y 80,00 %.

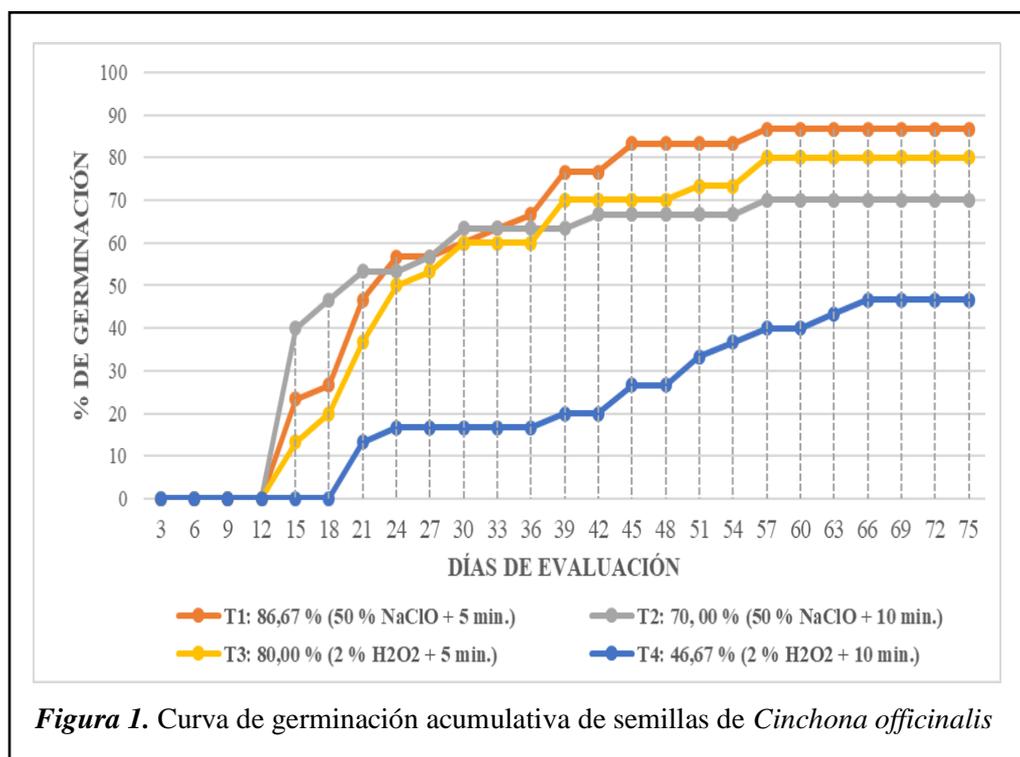
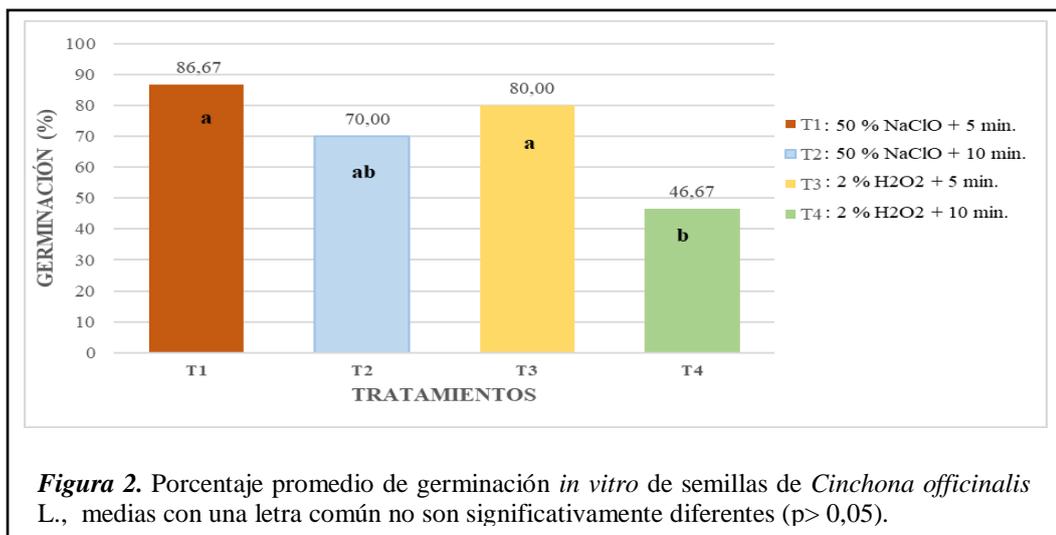


Figura 1. Curva de germinación acumulativa de semillas de *Cinchona officinalis*

Según el análisis de varianza si existe una diferencia estadística entre tratamientos con un p-valor de 0,0580; y según la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % si arroja rangos de significación: en el rango A, se encuentra el T1 y T3 que presentaron los porcentajes más elevados de semillas germinadas; mientras que el T4 con el menor porcentaje de germinación (46,67 %) se encuentra en el rango B (Figura 2).

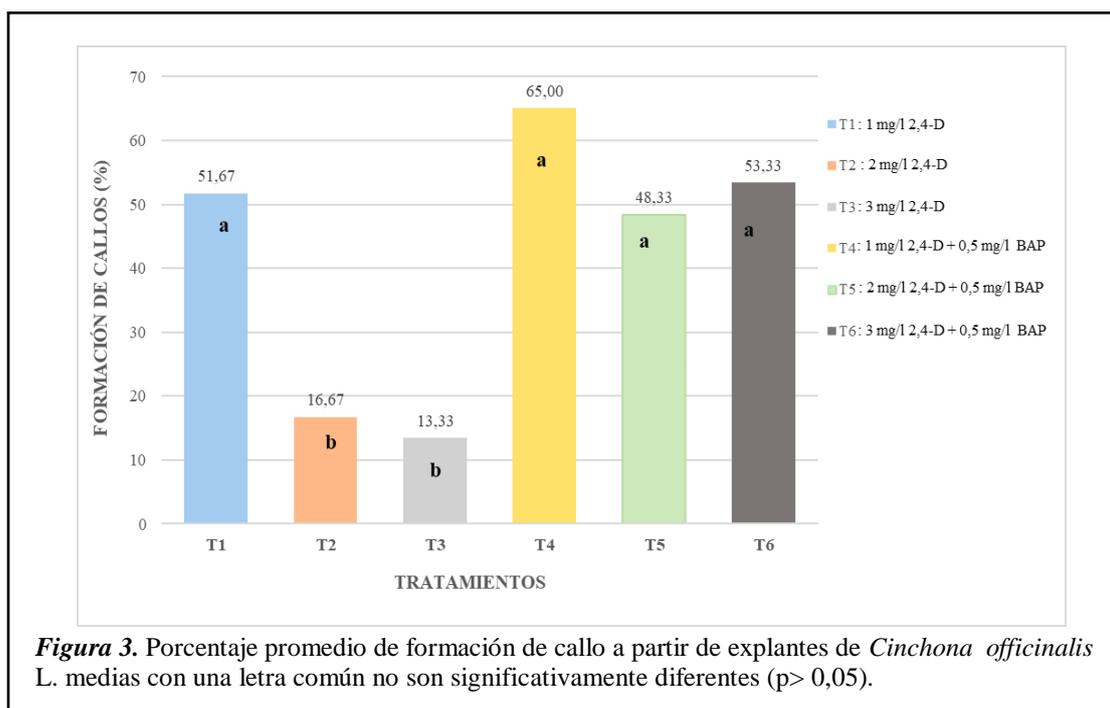


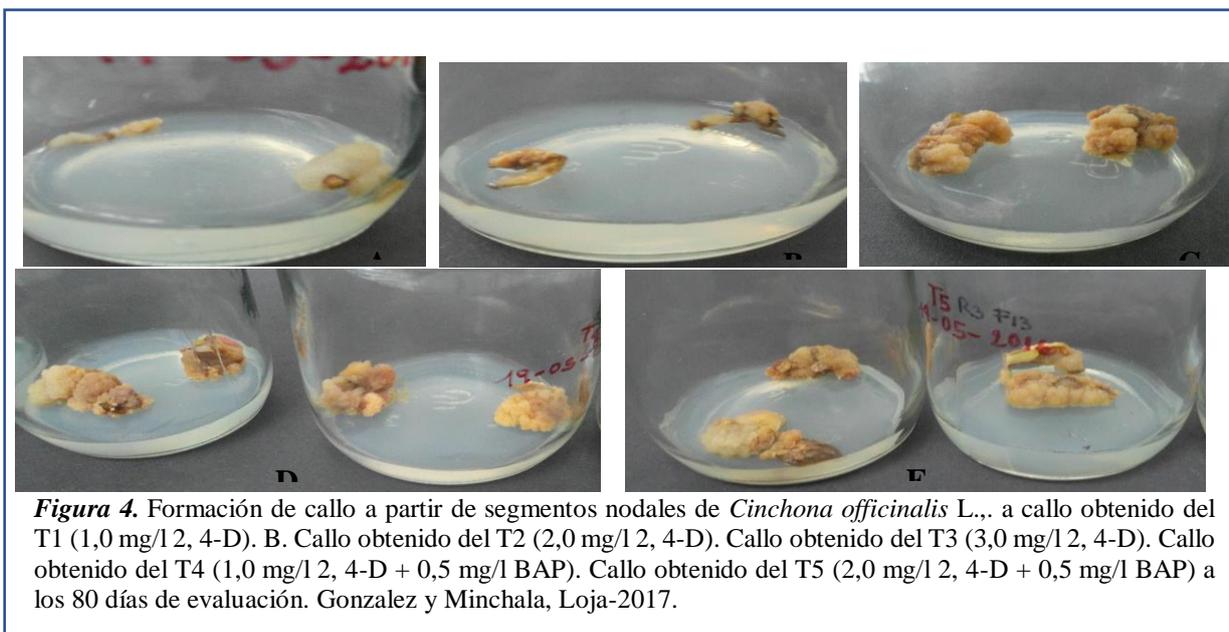
Determinación del balance hormonal adecuado en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L.

Fase de inducción de callos

Porcentaje de formación de callos

En este ensayo se logró la formación de callos de *Cinchona officinalis* L., con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados (Figura 4); a los 80 días de evaluación el T4 alcanzó el mayor porcentaje de formación de callo con el 65,00 %; seguido del T6 con un valor de 53,33 %; en comparación al T3 que presentó el menor porcentaje (13,33 %) de formación de callos (Figura 3). Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,0173 (Figura 3).





Color del callo a los 80 días de evaluación

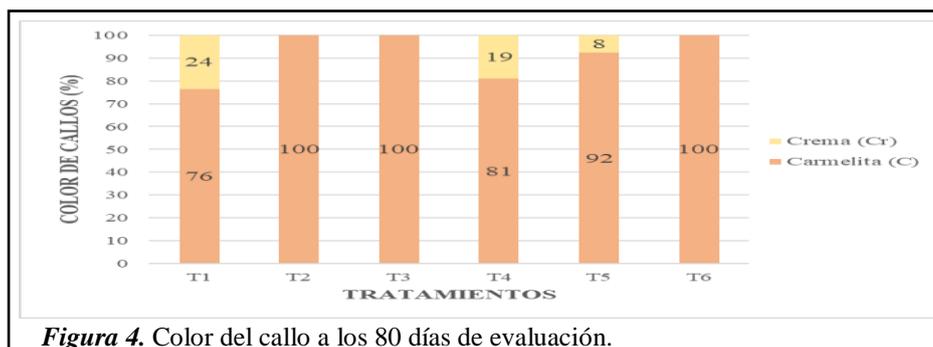
En el Cuadro 5, se muestra que a los 80 días de evaluación los callos obtenidos presentaron una coloración carmelita y crema.

Tabla 1.

Color del callo de *Cinchona officinalis* L., a los 80 días de evaluación.

Tratamiento	# Explantes formaron callo	# Callos de color		% De callos de color		Total
		Carmelita	Crema	Carmelita	Crema	
T1	17	13	4	76	24	100
T2	14	14	0	100	0	100
T3	12	12	0	100	0	100
T4	21	17	4	81	19	100
T5	26	24	2	92	8	100
T6	29	29	0	100	0	100

En la Figura 5, se observa que el tratamiento T2, T3 y T6 obtuvieron el más alto porcentaje de callos de color carmelita con el 100 % (callos no friables); en comparación a los demás tratamientos que obtuvieron dos tipos de tonalidades, el T5 obtuvo un 92 % de callos de coloración carmelita y un 8 % de coloración crema (callos friables), el T4 con el 81 % de color carmelita y 19 % color crema (Cr), y finalmente el T1 con el 76 % y 24 % (Figura 6 C, D, E). Cabe mencionar que todos los callos adquirieron una coloración crema en los primeros días de evaluación (Figura 6 A, B).



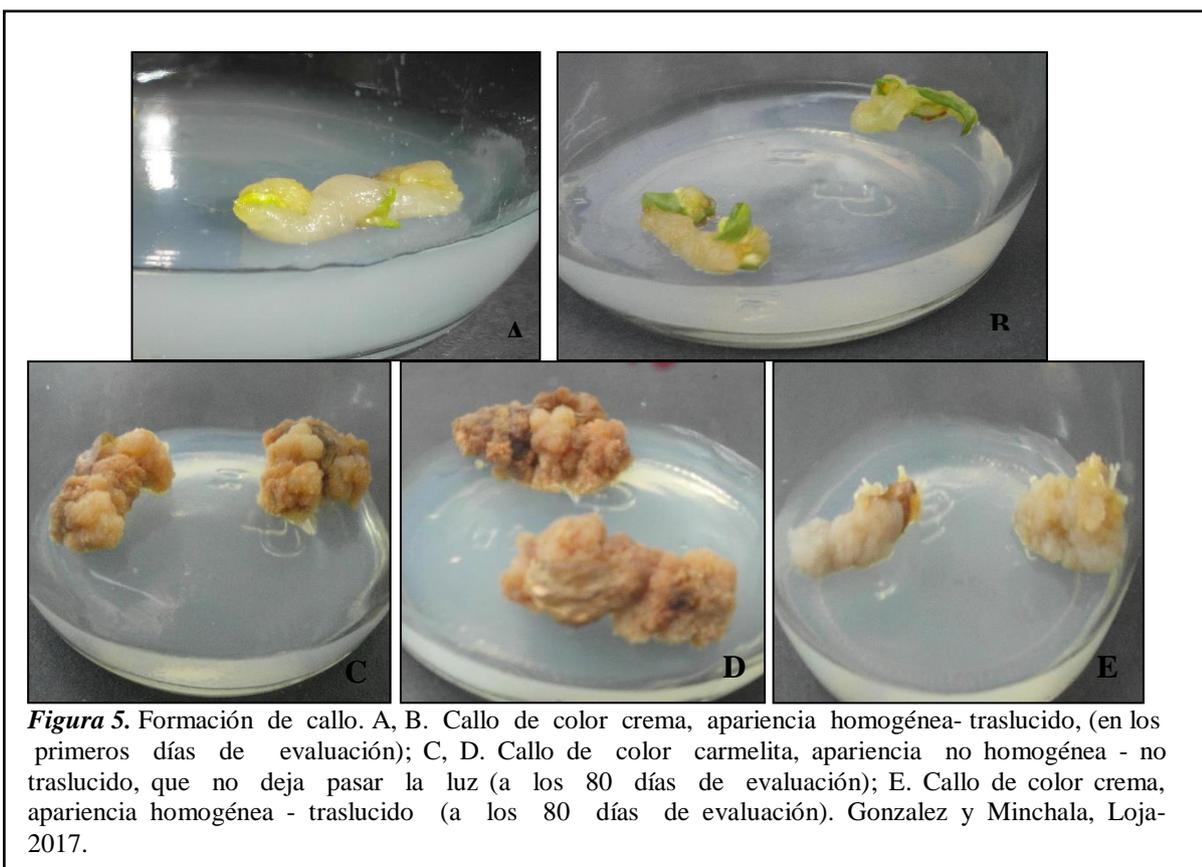


Figura 5. Formación de callo. A, B. Callo de color crema, apariencia homogénea- traslucido, (en los primeros días de evaluación); C, D. Callo de color carmelita, apariencia no homogénea - no traslucido, que no deja pasar la luz (a los 80 días de evaluación); E. Callo de color crema, apariencia homogénea - traslucido (a los 80 días de evaluación). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

Apariencia del callo a los 80 días de evaluación

La Tabla 2, muestra que a los 80 días de evaluación los callos obtenidos presentaron una apariencia homogénea - Traslucido (H-T); y una apariencia No Homogénea – No Traslucido (NH-NT)

Tabla 2

Apariencia del callo a los 80 días de evaluación

Tratamiento	# explantes que formaron callo	# explantes con apariencia		% de explantes con apariencia (90 días de evaluación)		Total
		Homogénea Traslucido (H-T)	No Homogénea No Traslucido (NH-NT)	Homogénea Traslucido (H-T)	No Homogénea No Traslucido (NH-NT)	
T1	17	4	13	24	76	100
T2	14	0	14	0	100	100
T3	12	0	12	0	100	100
T4	21	4	17	19	81	100
T5	26	2	24	8	92	100
T6	29	0	29	0	100	100

En la Figura 7, se observa que el tratamiento T2, T3 y T6 obtuvieron el más alto porcentaje de callos con apariencia no homogénea - no traslucido (NH-NT) con el 100 %; mientras que en los restantes tratamientos los callos obtuvieron dos tipos de apariencia, el T5 obtuvo un 92 % de callos con apariencia NH-NT y un 8 % con apariencia homogénea - traslucido (H-T), el T4 con el 81 % con apariencia NH-NT y 19 % con apariencia H-T, y finalmente el T1 con el 76 % y 24 % (Figura 6 C, D, E). Cabe señalar

que en los primeros días de evaluación los callos adquirieron una apariencia homogénea-traslúcido, es decir, que dejaba pasar la luz (Figura 6 A ,B).

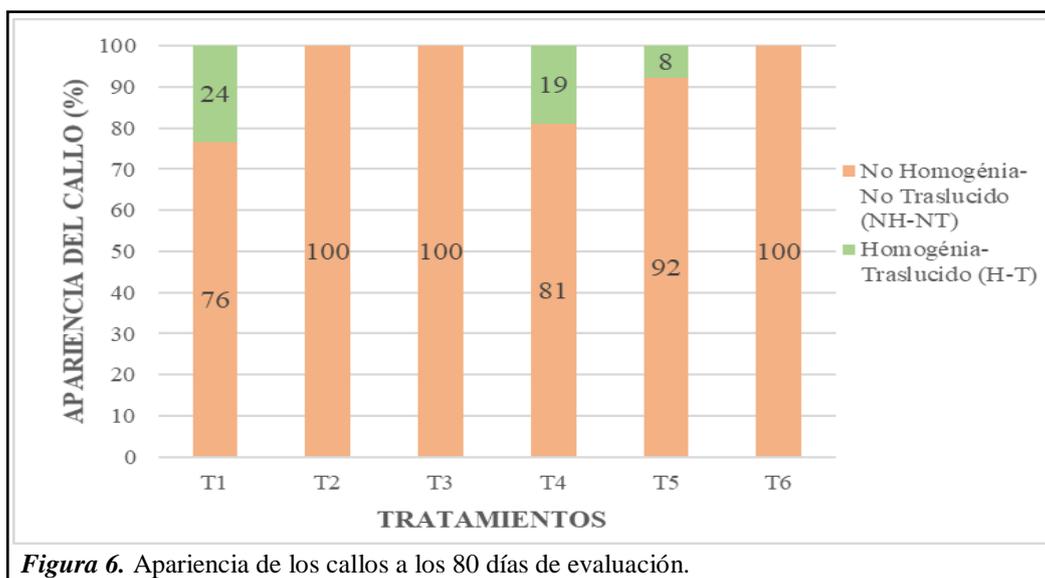


Figura 6. Apariencia de los callos a los 80 días de evaluación.

Fase de inducción de embriones

Porcentaje de formación de embriones somáticos

En este ensayo se logró la formación de embriones somáticos de *C. officinalis* L., con la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados (Figura 9); a los 90 días de evaluación el T3 alcanzó el mayor porcentaje con 28,33 %; seguido del T2 con un porcentaje de 17,00 %; en comparación al T1 que presentó el menor promedio con un valor de 15,00 % (Figura 8). Por otro parte, a los 80 días de evaluación en el T3 se obtuvo la presencia de dos hojas, tal como se muestra en la Figura 9, C2. Según el análisis de varianza y la prueba de significación de LSD Fisher al 5 % no existe diferencia significativa entre tratamientos con un p-valor de 0,1072 (Figura 8).

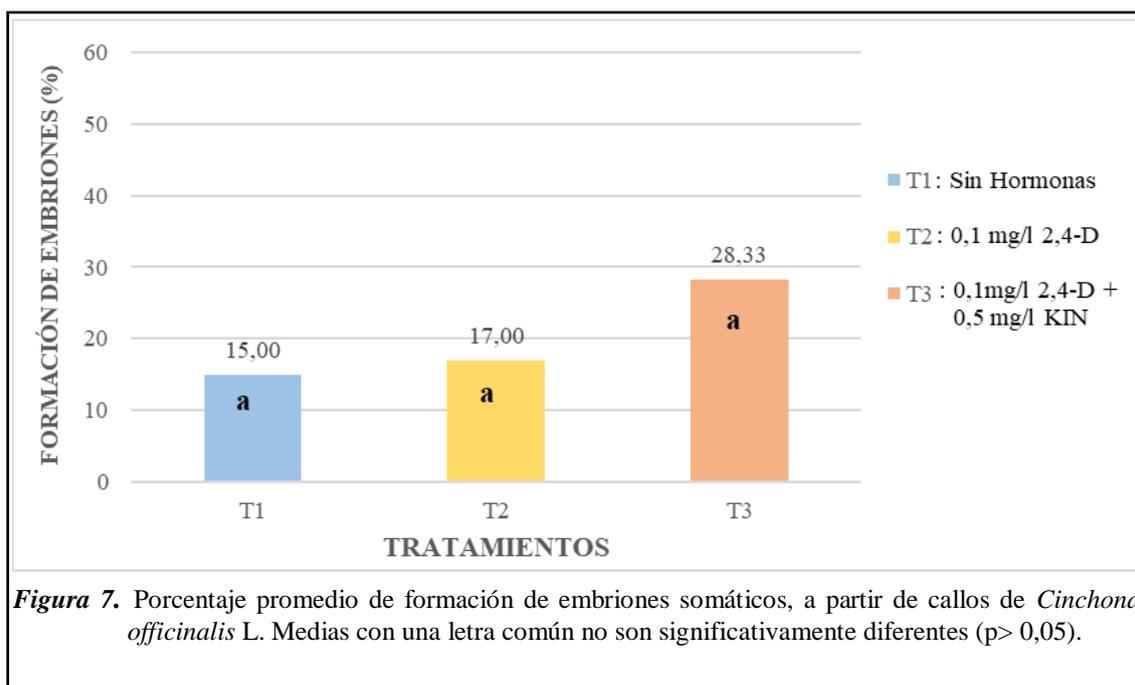


Figura 7. Porcentaje promedio de formación de embriones somáticos, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

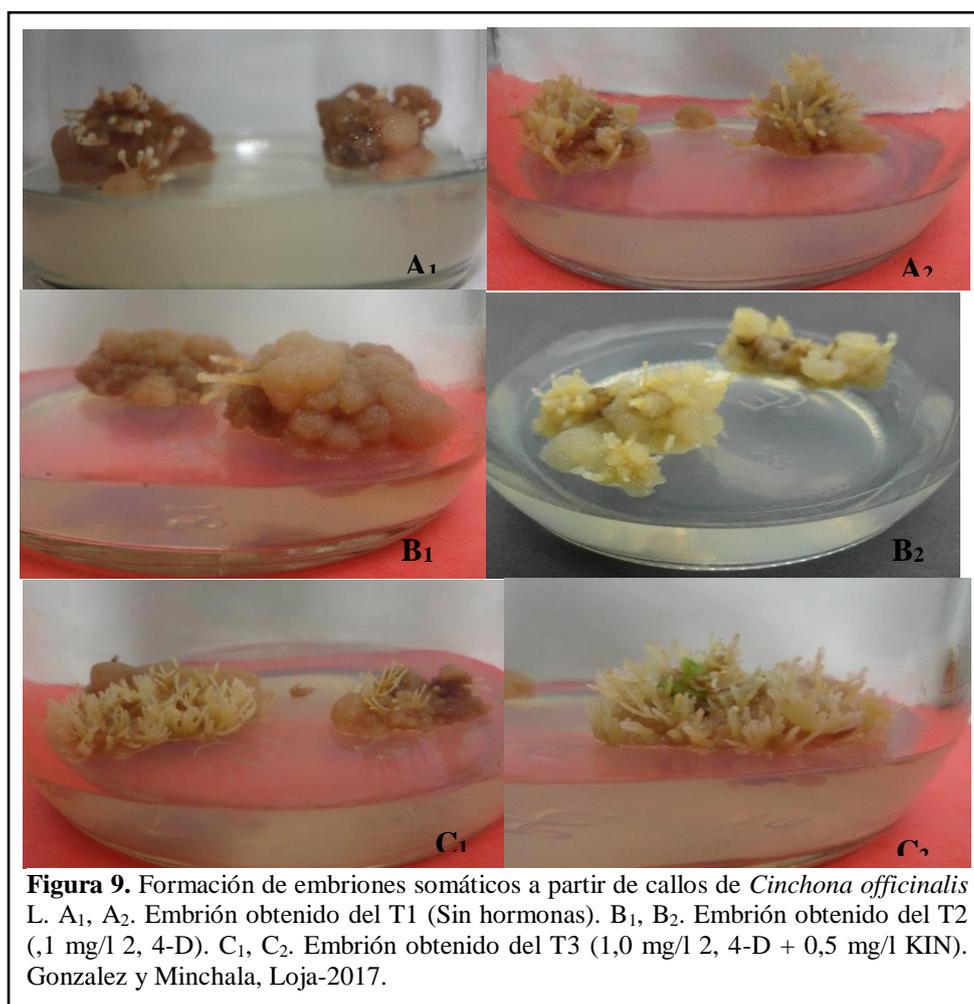


Figura 9. Formación de embriones somáticos a partir de callos de *Cinchona officinalis* L. A₁, A₂. Embrión obtenido del T1 (Sin hormonas). B₁, B₂. Embrión obtenido del T2 (1 mg/l 2, 4-D). C₁, C₂. Embrión obtenido del T3 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN). Gonzalez y Minchala, Loja-2017.

4. Discusión

Fase de implantación: Efecto de dos desinfectantes con diferentes tiempos de exposición, en la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Cinchona officinalis* L., proveniente de relictos boscosos.

En la presente investigación, los tratamientos aplicados en la desinfección de las semillas de *Cinchona officinalis* L.; se demostró que el NaClO y H₂O₂ en diferentes tiempos juegan un papel importante para controlar la contaminación de las semillas, observándose que para el T1 (50 % NaClO + 5 min.), T2: (50 % de NaClO + 10 min.), T3 (2 % de H₂O₂ + 5 min.), y T4 (2 % de H₂O₂ + 10 min.), presentaron 0 % de contaminación; resultados que se corroboran con los obtenidos por Jiménez, (2016) quien al utilizar concentraciones similares de NaClO (50%) en diferentes tiempos de inmersión (5 min., 10 min., y 15 min) en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., obtuvo 0 % de contaminación. Sin embargo, el mismo autor (Jiménez, 2016) al utilizar concentraciones bajas de NaClO, obtuvo un porcentaje de 13,33 % de contaminación al aplicar 15 % de NaOCl durante 5 min., y 10 min., y un 6,67 % con el 25 % NaOCl durante 5 min., y 15min.

Con ello se deduce que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio disminuye el porcentaje de contaminación, lo cual concuerda con lo mencionado por Conde (2015); quien al utilizar concentraciones de NaOCl al 50 % disminuyó el porcentaje de contaminación en semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Así mismo, en el presente estudio se evidencio que los tratamientos (T3 y T4) en los que se aplicó H₂O₂ dio buenos resultados con un porcentaje de contaminación de 0 %; demostrando que es un buen agente desinfectante. Varios autores han corroborado esto, ya que al utilizar similares concentraciones de H₂O₂ aplicadas en diferentes especies no obtuvieron ningún porcentaje de contaminación (Flores et al., 2008); demostrando que, a más de tener una efectiva capacidad de esterilización en semillas forestales, también incrementa la germinación de algunas semillas (pino) (Barnett, 1998).

Por otra parte, el efecto de desinfección con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno más la adición de 1,0 mg/l AG3, sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L., se muestra en la Figura 2. El mayor porcentaje de germinación 86,67 % se encontró en las semillas tratadas con hipoclorito de sodio al 50 % durante 5 minutos (T1), y el menor 70,00 % en el T2 con mayor tiempo (10 min.). De acuerdo con estos resultados, se puede decir que el porcentaje de germinación es relativamente alto y posiblemente ligado al uso del hipoclorito de sodio durante la desinfección superficial de las semillas de *Cinchona officinalis* L.

Los resultados descritos en el párrafo anterior son similares e incluso mayores o menores a los obtenidos por Jiménez (2016), quien al utilizar una concentración de NaClO al 50 % mas 1,0 mg/l de AG3 encontró un porcentaje de germinación de 74,44 %; pues, autores como Araya et al., (2000); Rännbäck (2007); Vasudevan & Staden (2010) manifiestan que esto se debe a que el NaClO escarifica la cubierta de las semillas y promueve la germinación de varias especies; también han observado un efecto aditivo con el ácido giberelico o con tratamientos de frío (Watkinson & Pill, 1998). Por ello, se puede observar que a mayor tiempo de inmersión de las semillas en la solución de NaClO se obtiene menor porcentaje de germinación y viceversa.

De igual forma, en un estudio realizado en *Cinchona officinalis* L., por ANACAFE (2004), en el cual utilizaron AG3 en concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/l obtuvieron un porcentaje de germinación de 88,67 % y 83,33 % respectivamente; mientras que, Campos, et al. (2014), en estudios realizados en *Cinchona pubescens* obtuvieron valores bajos de germinación con 33,34 %, al utilizar una concentración de 1000 mg/l AG3 y NaClO al 2 % durante 2 minutos; lo que difiere con los resultados obtenidos en la presente investigación.

De igual manera, al aplicar H₂O₂ en tiempos de 5 y 10 minutos, el T3 (2 % de H₂O₂ + 5 min.) obtuvo el valor más alto de germinación con un 80,00 %, resultado que es similar al alcanzado por Armijos & Pérez (2016) en investigaciones realizadas sobre *Cinchona officinalis* L., con un 72,2 % y 86,7 % de germinación con un fotoperiodo de 12 y 24 horas respectivamente, en la cual utilizó H₂O₂ al 100 % durante 1 minuto. Por el contrario, el porcentaje más bajo de germinación (46,67 %) se logró con la aplicación de 2 % de H₂O₂ durante 10 minutos, valor que se encuentra dentro de los rangos obtenidos (35,6 % y 62,2 % de germinación en un fotoperiodo de 12 y 24 horas respectivamente) por Armijos & Pérez (2016) en *Cinchona pubescens*., en la cual utilizó H₂O₂ al 100 % durante 1 minuto, la cual llegó a la conclusión de que el peróxido de hidrógeno en *Cinchona pubescens* causó daño a la capa de la semilla y a los embriones. Según Verkhoturov & Frantenko (2008); Bailly et al., (2008); Lu et al., (2013), esto puede deberse a que el peróxido de hidrógeno es un rompedor de la latencia de las semillas o estimulador de la germinación, debido a que incrementa la actividad en el embrión y estimula el proceso de oxidación durante la germinación.

Con ello, se deduce que la aplicación de H₂O₂ al 2 % en tiempos de inmersión bajos, son excelentes para la germinación, y en tiempos de exposición altos aparentemente causo daños en los embriones de las semillas, motivo por el cual se obtuvo menor porcentaje de germinación.

Finalmente, respecto a los días a la germinación *in vitro*, esta se inició a los 15 días en el T1, T2 y T3 estabilizándose a los 57 días de sembradas, dichos resultados son casi similares a los obtenidos por Jiménez (2016), pues en su investigación, la germinación *in vitro* se inició a los 15 días y se estabilizó a los 45 días.

Determinación del balance hormonal adecuado en la fase de inducción de callos, a partir de explantes de vitroplantas de la especie *Cinchona officinalis* L.

Fase de inducción de callos

La formación de tejido callogénico en diferentes explantes puede ser estimada por una variedad de auxinas, siendo la más frecuentemente utilizada 2,4-D a diferentes concentraciones, en muchos casos se hace necesario la interacción con una citoquinina para romper el balance hormonal endógeno y estimular una mayor formación de tejido callogénico (Montoya, 1991; Urrea et al., 2001).

En la presente investigación en el ensayo de inducción de callos a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., al combinar 1,0 mg/l de 2,4-D y 0,5 mg/l BAP (T4) resultó la más efectiva, obteniéndose 65,00 % de formación de callos con la combinación de 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP (T4); seguido del T6 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) con 53,33 %; con auxinas solas, se obtuvieron un 51,67 % de formación de callos con una concentración de 1 mg/l 2,4-D (T1), los resultados dependieron de la concentración de auxina/citoquinina empleada. Teniendo en cuenta que de acuerdo al análisis ANAVA para estos tres tratamientos, el porcentaje de formación de callo, no mostro diferencias significativas, pero si con los otros evaluados (Figura 3). A los 15 días comenzó el proceso de desdiferenciación de los tejidos en todos los tratamientos ensayados; así también se visualizó que el callo se inició en la herida y posteriormente se extendió al resto del explante.

Estos resultados son menores a los obtenidos por Félix & Armijos (2006) quienes al utilizar un medio B5 (Gamborg, et al., 1998) combinado con 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP, para la formación de callo a partir de segmentos nodales de *Cinchona officinalis* L., obtuvieron un 91,7 %; un 70,00 % en la combinación de 3,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l BAP; y un 56,7 % al utilizar 1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP. Es decir, que la interacción entre auxina-citoquininas es fundamental en la formación de tejido callogénico (Artiga, 2012). Por otra parte, Armijos & Pérez (2016), quien realizó estudios en formación de callo de *Cinchona officinalis* L., en medio B5, en la combinación con 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP; y, 5,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP también obtuvo altos porcentajes de formación de callos con 68,2 % y 90,8 % respectivamente; además, en el mismo estudio al combinar 0,2 mg/l KIN con 1,0 mg/l de 2,4-D obtuvo la tasa más alta de formación de callos (100%).

De manera general, se puede deducir que de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, la combinación hormonal (1,0 mg/l de 2,4-D y 0,5 mg/l BAP) resulto ser la más efectiva, permitiendo el mayor porcentaje de formación de callos; sin embargo, estudios como los de Félix & Armijos (2006); Armijos & Pérez (2016) en *Cinchona officinalis* L., mostraron un mayor porcentaje de formación de callos con la utilización del medio B5 (Gamborg, et al., 1998) y la aplicación de auxina-citoquinina en concentraciones mayores. Posiblemente, esto se deba a que muchos estudios para el cultivo *in vitro* de *Cinchona* informaron el uso de medio B5, aunque no dan ninguna explicación para el uso del mismo, pues se sabe que este tiene un contenido mineral más bajo que el medio MS (Koblitz et al., 1983, Wijnsma et al., 1985, Allan & Scragg, 1986, Khouri et al., 1986, Walton et al., 1987, Giroud et al., 1991, Geerlings Et al., 1999; Han et al., 2002).

El color y apariencia de los callos en los tratamientos ensayados, se visualizó que en los primeros días de evaluación obtuvieron una apariencia homogénea-traslucido de coloración crema; mientras que los callos visualizados a los 80 días presentaron una coloración carmelita o marrón y crema; así el T2, T3 y T6 obtuvieron el mayor porcentaje de callos con apariencia no homogénea-no translucido y de coloración carmelita (100 %); mientras que los tratamientos T5, T4 y T1 obtuvieron callos con apariencia homogénea-traslucido de coloración crema con el 8 %, 19 % y 24 % respectivamente (Figura 5 y 6). Sin embargo, en el estudio realizado por Félix & Armijos (2006) los callos obtenidos de *Cinchona officinalis* presentaron una estructura friable y color verde; mientras que Armijos & Pérez (2016) en la combinación 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP reporto callos friables y de coloración rojiza.

No obstante, Pierik (1990) señala que los callos no friables son de color marrón y los de tipo friable son de color blanquecino, apareciendo con pigmentos verdes y rojos, este tipo de consistencia del callo es adecuado para realizar suspensiones celulares; así también, Herrera (2017) y Paredes, et al. (2017) mencionan que un callo friable es de apariencia seca, coloración amarillo-blanquecino, compacta; y que se puede determinar de manera visual. En igual forma, Luciani et al. (2006); Pacheco et al. (2007) manifiestan que los callos de consistencia friable (desmenuzables) tienen tendencia a producir embriones somáticos, tallos y para regenerar plantas; y que la pérdida de viabilidad de los callos no friables (duros) y su causa del color marrón característico de este tipo de callos, puede ser debida a la pérdida de etileno producido por el propio callo durante su cultivo (Mao et al. 2006).

Finalmente, se puede decir que los callos visualizados en la investigación que presentan una coloración carmelita, aparentemente sean callos no friables y los de coloración crema sean callos friables.

Fase de inducción de embriones somáticos

Al igual que en la inducción de callo, el balance entre una auxina y citocinina son considerados un factor clave en la iniciación de embriogénesis somática (Samson et al., 2006). El mayor porcentaje se obtuvo al combinar auxina-citoquininas, obteniéndose un promedio de 28,33 % de formación de embriones con la combinación de 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg% KIN (T3). Cuando se añadieron auxinas (2,4-D) en una concentración 0,1 mg/l, la formación de embriones fue del 17,00 % (T2). Mientras tanto, el tratamiento T1 sin la adición de hormonas presento el menor porcentaje de formación de embriones somáticos con un valor promedio de 15,00 %. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la investigación, se encontró que no existen diferencias significativas entre tratamientos (8 8). Por otro parte, a los 80 días de evaluación en el T3 se obtuvo la presencia de dos hojas, tal como se muestra en la Figura 9, C2. En resumen, se puede deducir que, si influye directamente la combinación hormonal de auxina y citoquinina, para la obtención de mejores porcentajes de formación de embriones. Estos resultados obtenidos, se constituye como uno de los pioneros en esta fase de investigación, y servirán de guía para orientar nuevos trabajos de investigación.

5. Conclusiones

- En la fase de implantación, en la desinfección de semillas de *Cinchona officinalis* L., el hipoclorito de sodio (50 %) y peróxido de hidrógeno (2 %) controlaron eficientemente la contaminación, en 5 y 10 minutos de inmersión.
- En la germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona officinalis* L., el tratamiento T1 (50 % NaClO + 1mg/l AG3) y T3 (2 % H₂O₂ + 1mg/l AG) presentaron el mayor porcentaje (86,67%; 80,00 %) de germinación en un tiempo de inmersión de 5 minutos.
- En la fase de inducción de callos de *Cinchona officinalis* L., a partir de segmentos nodales, el uso de reguladores de crecimiento resultó beneficioso para el tratamiento T4 (1,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) logrando el mayor porcentaje (65%) de formación de callos.
- En la fase de inducción de embriones somáticos, a partir de callos de *Cinchona officinalis* L., la combinación hormonal 2,4-D + KIN, alcanzó un máximo de formación de embriones del 28,33% en el tratamiento T3 (1,0 mg/l 2, 4-D + 0,5 mg/l KIN).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Loja, y al Equipo Técnico del Proyecto de Investigación “Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L., en la provincia de Loja y generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro*”, por el apoyo financiero, técnico, logístico y humano brindado para la ejecución de la presente investigación.

Referencias

- Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas del Ecuador*. 1st ed. [ebook] Quito: Editorial del Ecuador. Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/76010#/summary> [Accessed 16 Oct. 2016].
- ANACAFE-Asociación Nacional del Café. (2004). *Cultivo de Quina: Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera*. Recuperado de http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_quina
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., & Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido giberálico sobre la germinación in vitro de (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 24(1).
- Armijos-González, R., & Pérez-Ruiz, C. (2016). In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). *Journal of forestry research*, 27(6), 1229-1236.
- Artiga, S., & María, E. (2012). *Efecto del BAP y 2, 4-D en la inducción in vitro de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos peciolares y vitro-explantos hipocotiledores y radiculares de Moringa oleífera* (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.).
- Barnett, J. P. (1998). *Desinfecting seeds with hydrogen peroxide*. Recuperado de <http://www.sfw.su.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 3 pp.
- Campos Ruiz, J. (2014). *Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de Cinchona pubescens Vahl.* "quina".
- Conde Solano, V. M. (2015). *Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de Hualtaco Laxopterygium huasango Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).
- Espinosa, C. I., & Ríos, G. (2017). Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1-2), 73-82.
- Armijos-González, R., & Pérez-Ruiz, C. (2016). In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). *Journal of forestry research*, 27(6), 1229-1236.
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
- Garmendia, A. (2005). El Árbol de la Quina (*Cinchona* spp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. *Loja, Editorial Universidad Técnica Particular de Loja*, 187.
- Giroud, C., Van der Leer, T., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., Heeremans, C. E. M., Niessen, W. M. A., & Vander Greef, J. (1991). Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona* in vitro cultures. *Planta médica*, 57(02), 142-148.
- Herrera Vargas, L. E. (2017). *Implementación de un protocolo para la obtención en masa de embriones somáticos de coffea canephora a partir de callos con interés comercial* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2017.).
- Hobhouse, H. (1985). *Seeds of Change: Five Plants That Transformed the World*.
- Jiménez, L., & Ramiro, N. (2016). *Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de diferentes fuentes de materia vegetal* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).

- Khouri, H. E., Ibrahim, R. K., & Rideau, M. (1986). Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant cell reports*, 5(6), 423-426.
- Koblitz, H., Koblitz, D., Schmauder, H. P., & Gröger, D. (1983). Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *Plant Cell Reports*, 2(2), 95-97.
- Luciani, G. F., Mary, A. K., Pellegrini, C., & Curvetto, N. R. (2006). Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(2), 139-143.
- MacDicken, K., Jonsson, Ö., Piña, L., Maulo, S., Contessa, V., Adikari, Y., ... & D'Annunzio, R. (2016). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015: cómo están cambiando los bosques del mundo?*
- Madsen, J. E. (2002). Historia cultural de la cascarilla de Loja. *Botánica Austroecuatoriana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*, 385-399.
- Mao, J. Q., Zaidi, M. A., Arnason, J. T., & Altosaar, I. (2006). In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(2), 121-125.
- McComb, A. L. (1946). *Cinchona Officinalis* in the Colombian Andes. *Journal of Forestry*, 44(2), 92-97.
- Missouri Botanical Garden. (2017). *Cinchona officinalis*. Quinine. Recuperado de <http://www.mobot.org/mobot/archives/image.asp?filename=GPN19820505.tif&returnto=/mobot/archives/results.asp>
- Montoya, L. (1991). *Cultivo de tejidos vegetales*. Bogotá: Ealon.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España.
- Rännbäck, L. M. (2007). *Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on Cypripedium spp.*
- Rentería, J. L. (2002). Ecología y manejo de la cascarilla (*Cinchona pubescens* Vahl), en Santa Cruz, Galápagos. *Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja*, 1-89.
- Samson, N. P., Campa, C., Le Gal, L., Noirot, M., Thomas, G., Lokeswari, T. S., & De Kochko, A. (2006). Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(1), 37-45.
- Urrea, A. I., Veitía, N., & Bermúdez, I. (2001). Selección in vitro de callos de papa (*Solanum tuberosum*) Var. Diacol capiro empleando el filtrado crudo de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Actualidades Biológicas (Colombia)* v. 23 (74) p. 5-13 ISSN 0304-3584.
- Verkhoturov, V. V., & Frantenko, V. K. (2008). Effect of hydrogen peroxide on anti-and prooxidant status of barley seeds during germination. *Russian Agricultural Sciences*, 34(1), 11-13.
- Walton, N. J., Parr, A. J., Robins, R. J., & Rhodes, M. J. (1987). Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant cell reports*, 6(2), 118-121.
- Watkinson, J. I., & Pill, W. G. (1998). Gibberellic acid and presowing chilling increase seed germination of Indiangrass [*Sorghastrum nutans* (L.) Nash.]. *HortScience*, 33(5), 849-851.
- Wijnsma, R., Go, J. T. K. A., Van Weerden, I. N., Harkes, P. V., Verpoorte, R., & Svendsen, A. B. (1985). Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona spec.* *Plant cell reports*, 4(5), 241-244.