

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
JAÉN**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL Y  
AMBIENTAL**



**REGULADORES DE CRECIMIENTO Y MEDIOS DE CULTIVO EN  
LA MICROPROPAGACIÓN DE *Cinchona pubescens* VAHL  
“CASCARILLA”**

**Presentada por:**

**OMERY ISABEL CAMPOS TORRES**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
FORESTAL Y AMBIENTAL**

**Jaén – Perú**

**2018**



*'Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional'*

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis de la Bachiller **Bach. Omery Isabel Campos Torres**, denominada: **Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la Micropropagación de la Cinchona pubescens Vahl "Cascarilla"**, para cumplir con uno de los requisitos para optar el título profesional de **Ingeniero Forestal y Ambiental**.

Teniendo en consideración los méritos del trabajo así como los conocimientos demostrados por el sustentante, declaramos la tesis como:

APROBADA

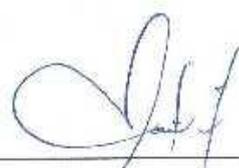
Con el calificativo (\*) de

MUY BUENA

En consecuencia, queda APTA para recibir el título profesional, de conformidad con lo estipulado en el Reglamento de Tesis de pregrado de la Universidad Nacional de Jaén.

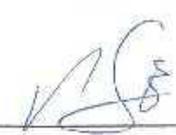
Jaén, 13 de Julio del 2018

  
Ing. Mg. **José Salomón Almaraz Montenegro**  
Presidente de Jurado de Tesis

  
Ing. M. Sc. **Segundo Sánchez Tello**  
Secretario de Jurado de Tesis

  
Ing. Mg. **Henry Omar Fernández Cubas**  
Miembro de Jurado de Tesis

  
Ph. D. **Omar Justo Zaballos Cáceres**  
Asesor de Tesis

  
Ing. M. Sc. **Vito Becerra Montalvo**  
CO Asesor de Tesis

(\*) De acuerdo con el artículo 25 del Reglamento de Tesis, los calificativos podrán ser: SOBRESALIENTE, MUY BUENA, BUENA o REGULAR.

## **DEDICATORIA**

Este logro implica una nueva etapa en vida profesional, una meta más cumplida gracias al esfuerzo, dedicación y apoyo por el entorno que me rodea, por ese motivo lo dedico a:

### **DIOS**

Por brindar la vida, sabiduría e inteligencia, para lograr cada meta propuesta, por darme aquella paciencia cuando sentía desfallecer, por mostrarme una luz en el fondo del túnel cuando sentía ya no poder, por ser el mejor consejero desde mi niñez, cuidándome y protegiéndome.

### **Mi madre María Isabel Torre García**

Por brindarme su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por ser mi más grande tesoro, porque cada logro, cada meta realizada es por ella, porque una sonrisa suya vale más que todas las riquezas de este mundo.

A mis hermanas Yarithza Margot Ordoñez Torres, Cinthia Paola Ordoñez Torres y mi pequeño hermano Edgar Milton Ordoñez Torres, por su amor, cariño y apoyo, ya que juntos somos el orgullo de mamá, porque nacimos para demostrarle que seremos lo mejor que pudo tener en este mundo.

## **AGRADECIMIENTO**

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todos quienes me apoyaron hacer posible la culminación de la presente investigación:

A mi señora madre María Isabel Torres García que con su ejemplo me ha enseñado a no rendirme, que por más grande que sea el obstáculo, la perseverancia me llevará al éxito, pero por sobre todas las cosas le agradezco por el infinito amor que tiene hacia su familia, demostrándonos día a día que siempre estará para nosotras.

A mi padre Víctor Hugo Campos Requejo, por todo el apoyo y sus consejos brindados durante todo este tiempo.

A los asesores de mi tesis, el M. Sc. Vitoly Becerra Montalvo y el Ph.D. Omar Zeballos Cáceres, por su tiempo, orientación, apoyo y asesoramiento en la realización de esta investigación, por compartir sus conocimientos y experiencias brindándome todo su apoyo de una forma desinteresada.

A Juan Carlos Rufasto Castro por acompañarme desde los inicios de este trabajo de investigación, brindándome su tiempo, paciencia y apoyo, acompañándome desde la primera fase hasta la última.

A mi amigo Hitler Fernández Zárate por la ayuda en campo para la obtención y desarrollo de la especie, por el tiempo invertido y por todos los conocimientos brindados.

A los señores miembros de jurado, Ing. Mg. José Salomón Almestar Montenegro, Ing. M. Sc. Segundo Sánchez Tello y Ing. Mg. Henry Omar Fernández Cubas, por las importantes sugerencias dadas en el presente trabajo.

Y finalmente, a mis amigas de la Universidad, que durante cinco años de carrera supieron brindarme su apoyo y paciencia y con quienes tuve la dicha de compartir momentos inolvidables de aprendizaje.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	14
2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	14
2.2. BASES TEÓRICAS CONCEPTUALES.....	16
2.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CINCHONA.....	16
2.2.2. ASPECTOS GENERALES DE <i>Cinchona pubescens</i> Vahl: .....	17
2.2.3. ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	18
2.2.4. IMPORTANCIA DEL GÉNERO CINCHONA.....	19
2.3. MICROPROPAGACIÓN .....	20
2.3.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	21
2.3.2. FASES O ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN:.....	21
2.3.3. MEDIOS DE CULTIVO .....	23
2.3.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	24
2.3.5. LAS VITAMINAS.....	25
2.3.6. SUSTRATOS .....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. HIPÓTESIS .....	28
3.2. MATERIALES.....	28
3.3. METODOLOGÍA .....	29
3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO .....	32
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
3.5.1. PRUEBA ESTADÍSTICA .....	34
3.5.2. EVALUACIONES REALIZADAS: .....	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
V. CONCLUSIONES .....	44
VI. RECOMENDACIONES.....	45
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
VIII. ANEXOS .....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Tratamientos aplicados en la fase de desinfección de los Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	32
Cuadro 2: Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento de los Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	32
Cuadro 3: Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	32
Cuadro 4: Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	33
Cuadro 5: Tratamientos aplicados en la fase e aclimatación de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	33
Cuadro 6: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable altura del explante en la fase de crecimiento. ....	38
Cuadro 7: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de brotes .....	39
Cuadro 8: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Longitud promedio (mm) de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	40
Cuadro 9: Explantes enraizados por tratamiento .....	42
Cuadro 10: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Porcentaje de plántulas de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl sobrevivientes por sustrato .....	43
Cuadro 11: Resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	50
Cuadro 12: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de crecimiento de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl a los 60 días – mm. ....	50
Cuadro 13: Análisis de varianza (ANVA) para la variable altura promedio de Explante de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl en la fase de crecimiento.....	50

Cuadro 14: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Multiplicación de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl, en la cuarta semana – número de brotes: .....	51
Cuadro 15: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Número de brote promedio por Explante de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl en la fase de multiplicación.....	51
Cuadro 16: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Multiplicación de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl, en la cuarta semana – longitud de brotes: .....	51
Cuadro 17: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Longitud promedio por Explante de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl en la fase de multiplicación.....	51
Cuadro 18: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Enraizamiento de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl - número de raíces .....	52
Cuadro 19: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de aclimatación de plántulas de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl sobrevivientes por sustrato .....	52
Cuadro 20: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Porcentaje de plántulas de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl sobrevivientes por sustrato en la fase de aclimatación .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de Explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl no contaminados por tratamiento .....	36
Figura 2: Preparación de medios de cultivo .....	57
Figura 3: Desinfección del material de laboratorio .....	57
Figura 4: Preparación del desinfectante .....	57
Figura 5: Preparación del explante de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	58
Figura 6: Siembra de explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	58
Figura 7: Brotes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl – fase de crecimiento.....	58
Figura 8: Brotes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl – fase de multiplicación .....	59
Figura 9: Enraizamiento de explantes de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	59
Figura 10: Plántulas de <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	59

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Pruebas estadísticas.....	50
Anexo 2: Composición de los medios de cultivo .....	53
Anexo 3: Protocolo base para la Micropropagación de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl .....	55
Anexo 4: Panel Fotográfico.....	57
Anexo 5: Identificación de la <i>Cinchona pubescens</i> Vahl.....	60

## RESUMEN

La *Cinchona pubescens* Vahl, árbol originario de los Andes (Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala), representante del reino vegetal en el escudo nacional del Perú (Puyusacha, 2010), hoy en día debido a su sobreexplotación se encuentra en peligro, pues la intervención en su habitat natural ha afectado la regeneración natural de dicho género, por lo cual es necesario buscar nuevos métodos de conservación para esta especie, por tal motivo el presente trabajo de investigación tiene como objetivo Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl, “Cascarilla, así como determinar el mejor medio de cultivo, determinar el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento vegetal más apropiados y finalmente proponer un protocolo de micropropagación para la *Cinchona pubescens* Vahl , “Cascarilla”. Para la realización de esta investigación se llevó a cabo en dos fases, campo y laboratorio, las acciones realizadas en campo, estuvieron enmarcadas a la recolección de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl (C.P La Cascarilla), así como la germinación de estas, la segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Jaén, en donde se realizó la micropropagación propiamente dicha. Entre los resultados obtenidos se observa que en la fase de desinfección al aplicar hipoclorito de calcio al 3% por 20 minutos, obtenemos como respuesta que el 95.8% de los explantes se encuentran limpios, además el medio Campbell y Durzan es el adecuado para la micropropagación de esta especie, combinándolo con las fitohormonas 0.5 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de KIN (citoquininas) y 1mg/l de ANA más 1mg/l de AIB (auxinas) y para la fase de aclimatación el sustrato con mejores resultados, fue el de Turba (60%) más arena(40%). En conclusión, la micropropagación de *Cinchona pubescens* Vahl fue exitosa y servirá como base para otras investigaciones relacionadas a este tema.

**Palabras claves:** *Cinchona pubescens* Vahl, Micropropagación, Cascarilla, Fitohormonas

## SUMMARY

The *Cinchona pubescens* Vahl, original tree of the Andes (Peru, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala), representative of the vegetable kingdom in the national coat of Peru (Puyusacha, 2010), nowadays due to its overexploitation it is in danger, since the intervention in their natural habitat has affected the natural regeneration of this genus, which is why it is necessary to look for new conservation methods for this species, for this reason the present research work has as objective to evaluate the effect of growth regulators and means of cultivation in the micropropagation of *Cinchona pubescens* Vahl, "Cascarilla, as well as determine the best culture medium, determine the type and concentration of plant growth regulators more appropriate and finally propose a micropropagation protocol for the *Cinchona pubescens* Vahl," Cascarilla. "To carry out this research carried out in two phases, field and laboratory, the actions carried out in the field were framed by the collection of seeds of *Cinchona pubescens* Vahl (CP La Cascarilla), as well as the germination of these, the second phase It was carried out in the Biotechnology laboratory of the National University of Jaén, where the actual micropropagation was carried out. Among the results obtained it is observed that in the disinfection phase when applying 3% calcium hypochlorite for 20 minutes, we obtain as a response that 95.8% of the explants are clean, in addition the Campbell and Durzan medium is suitable for micropropagation of this species, combining it with phytohormones 0.5 mg / l of BAP plus 0.5 mg / l of KIN (cytokinins) and 1mg / l of ANA plus 1mg / l of AIB (auxins) and for the acclimation phase the substrate with the best results , was that of Peat (60%) plus sand (40%). In conclusion, the micropropagation of *Cinchona pubescens* Vahl was successful and will serve as a basis for other research related to this topic.

Keywords: *Cinchona pubescens* Vahl, Micropropagation, Cascarilla, Phytohormones

## I. INTRODUCCIÓN

La micropropagación constituye una opción eficaz para cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, esta es una multiplicación masiva in vitro. Consiste en la propagación de plantas en un ambiente controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. Es una técnica basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras, cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuados. (Marín, 1997)

La *Cinchona pubescens* Vahl o también conocida como cascarilla o quina, descubierta por el Botánico Martin Henrichsen Vahl en 1790, pertenece a la familia de las rubiáceas, desarrollándose entre los 1000 a 3000 msnm, a una temperatura entre 6.5 °C y 24.9°C y bajo precipitación anual que van desde los 790 mm a los 1972 mm.

El árbol de la quina, cuya imagen representa la riqueza vegetal en el Escudo del Perú, en las décadas de los 50 y 60 se sobreexplotó en gran manera por poseer un alcaloide que ayuda a combatir la malaria, encontrándose hoy en peligro (Nación, 2008), producto de esto, la regeneración y germinación natural de la *Cinchona pubescens* Vahl, ha disminuido considerablemente, debido a que es una especie muy susceptible a cambios, y al intervenir en su ecosistema, afecta al desarrollo y crecimiento; lo antes mencionado es corroborada con la Resolución Ministerial N°505-2016-MINAGRI, emitida el 29 de Setiembre 2016, en donde se indica en el anexo II que la *Cinchona pubescens* Vahl se encuentra clasificada como especie casi amenazada; por tal motivo se buscó una nueva forma de propagarla y mantener la especie, razón principal por la que se realiza esta investigación.

Con la micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl, se buscó una nueva forma de conservar la especie, logrando obtener plántulas libres de hongos y bacterias en el medio como en el explante, determinando el medio adecuado para la realización de cultivos invitro, obteniendo tres brotes por explante al aplicar las hormonas respectivas en la fase

de multiplicación (citoquininas), lo cual implica tres plántulas nuevas de una sola, del mismo modo se obtuvo el enraizamiento de estas, al aplicar hormonas en la fase de multiplicación (auxinas), en la fase de aclimatación durante su evaluación se observaron el crecimiento de dos a cuatro hojas nuevas, obteniendo al mismo tiempo el mayor porcentaje de plántulas aclimatadas o sobrevivientes, después de dos meses en invernadero, donde más del 50% de las plántulas lograron sobrevivir en los tres sustratos aplicados.

Entre los objetivos de esta investigación tenemos:

**Objetivo General:**

- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl “Cascarilla”.

**Objetivos específicos:**

- Determinar el mejor medio de cultivo para la micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl “Cascarilla”.
- Determinar el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento vegetal más apropiados para la micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl, “Cascarilla”
- Proponer un protocolo de micropropagación para la *Cinchona pubescens* Vahl “Cascarilla”

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Se ha realizado una variedad de estudios de micropropagación con especies forestales, como por ejemplo, *Celtis tala* Gill. ex Planch. (tala) y *Acacia caven* (Mol.), *Parkinsonia aculeata* L. (cina-cina) y *Erythrina crista-galli* L. (ceibo), vía organogénesis adventicia, a partir de material juvenil; el explante utilizado fueron secciones de plántulas obtenidas de semillas germinadas in vitro, las que se acondicionaron y desinfectaron. El medio basal más apropiado fue Broadleaved Tree Medium (BTM), adicionado con diferentes reguladores de crecimiento, en el cual se obtuvieron callos, raíces y yemas. (Abedini, Boeri, Marinucci, Ruscitti, y Scelzo, 1999).
- En la Universidad Centro-Occidental "Lisandro Alvarado", Estado Lara, se realizó la micropropagación de especies del género *Mussaenda* (familia Rubiaceae), cuyo estudio se basó en tres etapas: I) Fase de iniciación usando ápices caulinares, en un medio de cultivo con sales de Murashige y Skoog más benziladenina/ácido indol acético 0,5 mg/l, sulfato de adenina 40 mg/l, tiamina, ácido nicotínico y piridoxina de 30.5 y 0.5 mg/l, respectivamente, inositol 100 mg/l, sacarosa 30 g/l, cisteína 30 mg/l y agar 10 g/l, en donde a partir de la cuarta semana se observó formación y crecimiento de brotes. II) Para multiplicar los brotes se usó el mismo medio incrementando la benziladenina a 2.5 mg/l y eliminando el ácido indol acético y el sulfato de adenina, donde la obtención de los brotes se lograron entre la tercera y cuarta semana. III) La formación de raíces en los brotes ocurrió en la segunda semana usando 8 mg/l de ácido indol butírico, 15 g/l de sacarosa y eliminando las citocininas. Los cultivos crecieron a 27°C aproximadamente y a intensidades lumínicas de 1 000 lux en la etapa I, 3 000 en la segunda y 10 000 en la tercera etapa. Las plantas se transfirieron a "Jiffy" (turba compactada envuelta en una malla) y luego a recipientes plásticos. Considerando una estaca con 10

Yemas y 60% de éxito en la fase de iniciación y 75% en la de enraizamiento, además se puede estimar la producción de 30 000 plantitas por año. (Mogollón de Lucena y Gil de Serpa, 1989)

- En la Universidad Nacional de Trujillo, en la investigación del efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl, se obtuvieron como resultados que el nitrato de potasio actúa como promotor en la aceleración de las semillas, dando este los mejores resultados, seguido del agua de coco, sin embargo el ácido giberélico actúa como inhibidor. (Campos, 2014)
- En la provincia de Loja, se realizó un estudio de Identificación y descripción del estado actual de *Cinchona officinalis* L. y generación de protocolos para la propagación in vivo e in vitro; donde en la fase de laboratorio se utilizó como medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con diversos reguladores de crecimiento. Para el ensayo de desinfección de semillas se aplicó hipoclorito de sodio en tres concentraciones (15, 25 y 50 %) en tres tiempos (5, 10 y 15 min.) respectivamente, donde los mejores resultados para controlar la contaminación fue 50 % de hipoclorito de sodio, durante 5, 10 y 15 min. Para la germinación in vitro de semillas se adicionó al medio de cultivo ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en tres concentraciones (0.0; 0.5 y 1.0mg/l); encontrándose el mayor porcentaje de germinación (74.44 %) en el T3. Para el ensayo de multiplicación, se utilizó tres reguladores de crecimiento, la auxina: ácido naftalenacético (ANA) y dos citoquininas: benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN), en dos concentraciones 0.2 y 2.0 mg/l respectivamente, logrando los mejores resultados en la combinación hormonal de 0.2 ácido naftalenacético (ANA) + 2,0 benzilaminopurina (BAP); obteniendo 4.73 brotes, con 0.83 cm de altura, 27 hojas y 12.10 nudos promedio por cada explante. (Lima , 2016)
- Un estudio realizado en 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, donde utilizó como medio de cultivo basal al Murashige y Skoog (1962), adicionando diferentes reguladores de crecimiento. Para la fase de brotamiento se utilizó los tratamientos de ácido naftalenacético

(ANA) en concentraciones de 0.5 y 1.5 mg/l y benzilaminopurina (BAP) en concentraciones de 2.5; 3.0 y 3.5 mg/l), en donde la combinación hormonal 0,5 mg/l ácido naftalenacético (ANA) + 2.5 mg/l benzilaminopurina (BAP) resultó ser la más efectiva obteniéndose 6.06 brotes por explante, con 2.92 nudos, 6.20 hojas por brote, en cuanto al tamaño de los brotes el mejor resultado se obtuvo en la combinación hormonal 1.5 mg/l ácido naftalenacético (ANA) + 3.0 mg/l benzilaminopurina (BAP), con 17.68 mm por brote, Para la fase de enraizamiento in vitro de *Cinchona officinalis* L. se utilizó ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0.1; 0.5 y 1.0 mg/l, en el cual la concentración hormonal 1,0 mg/l ácido naftalenacético (ANA) resultó ser la más efectiva con 5.31 raíces por explante y 24.5 mm de longitud (Organogénesis indirecta). En la concentración hormonal ácido indolbutírico (AIB) 1.0 mg/l se observó la formación de raíces por organogénesis directa, con un promedio de enraizamiento de 0.75 raíces por explante con un tamaño de 0.74 mm. Por otro lado, para las variables de brotamiento y longitud de brotes evaluadas en la fase enraizamiento, la concentración hormonal 0.5 mg/l ácido naftalenacético (ANA) resultó ser la más efectiva, donde se obtuvo un promedio de 3.74 brotes por explante con una longitud de 31.29 mm. Sin embargo, para las variables de formación de nudos y hojas la concentración hormonal 0.1 mg/l ácido naftalenacético (ANA) resultó la más favorables, dando resultados promedio de 2.92 nudos con 6.20 hojas por brote. (Chamba, 2017).

## **2.2. BASES TEÓRICAS CONCEPTUALES**

### **2.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CINCHONA**

La cascarilla o “quina”, descubierta en el siglo XVII utilizada desde el tiempo de los Incas para curar el paludismo o malaria, es considerada el “árbol de la vida” o “planta salvadora de la humanidad” por ser el remedio contra las fiebres palúdicas. (Moya , 1994).

Fue descubierta por un indígena de Malacatos, bautizado como Pedro de Leyva, Casique de Rumishita, este lo presento a los Jesuitas, quienes se encargaron de difundirla a la humanidad, el género de *Cinchona* es en honor a la esposa del virrey Luis Jerónimo de Cabrera y Bodilla, la condesa de la Condamine (Francisca

Enríquez de Rivera), quien fue salvada del paludismo gracias a la ingestión de un macerado de esta planta (Cifuentes, 2013)

### 2.2.2. ASPECTOS GENERALES DE *Cinchona pubescens* Vahl:

#### a. Taxonomía

- Reino: Plantae
- División: : Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Rubiales
- Familia: Rubiaceae
- Género: Cinchona
- Nombre científico: *Cinchona pubescens*
- Nombre común: Cinchona, cascarilla, quina, colorada. (ISSG, 2000)

#### b. Descripción dendrológica de la *Cinchona pubescens* Vahl

*Cinchona pubescens* Vahl, pertenece a la familia de las Rubiaceae, el cual se lo conoce como cascarilla, colorada, Cinchona roja, etc. con una altura de 11 a 15 metros de alto, con un fuste cilíndrico, irregular de 30 a 40 cm de diámetro, copa globosa a globosa irregular.

- **La corteza externa:** Su corteza externa es de color plomizo – gris o marrón plomizo, ligeramente fisurada
- **La corteza interna:** Su corte de color interna tiene un color rojizo, rojo amarillento, sabor amargo ligeramente dulce, sin olor característico.
- **Hojas:** Simples, opuestas y decusadas, de 8 a 29 cm de largo y de 5 a 20 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, base obtusa, abundantemente pubescente, pelos de hasta 2 mm de largo, el haz de la hoja generalmente no presenta pelos, mientras que el envés es pubescente. Todas tienen una vena media bien desarrollada con venas laterales más o menos prominentes.

- **Flores:** Las flores se encuentra en panículas terminales de hasta 15 cm de longitud; son hermafroditas, de corola blanca - roja o rosada, con abundantes pelos.
- **Frutos:** Los frutos son cápsulas de color marrón oscuro, de forma elipsoide, de 1.5 a 2.5 cm de longitud. (Zevallos, 1989)
- **Semillas:** Las semillas son fusiformes, redondeada por un ala membranosa, son de 7-10 mm de largo, 2-3 mm de ancho y ligeras. (Cifuentes, 2013)

### c. Distribución geográfica

Esta especie se encuentra en Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala, en el Perú se encuentra en ambas vertientes de la cordillera de los Andes, en los departamentos de Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, Huánuco, Pasco, Junín y Puno.(Zevallos, 1989), encontrándose entre los 1000 a 3000 msnm (Cifuentes, 2013)

## 2.2.3. ASPECTOS ECOLÓGICOS

### a. Clima

El clima donde se distribuye corresponde predominantemente al de Ceja de selva o Ceja de montaña, generalmente cálido y húmedo, con precipitaciones abundantes y persistentes y nubosidad casi todo el año.

La temperatura alcanza valores anuales promedio que van entre 6.5 °C y 24.9°C y las precipitaciones totales por año entre 790 mm y 1972 mm. (Zevallos, 1989)

### b. Suelos

Suelos de profundidad media a muy profundos, de textura franco arenoso, franco arcilloso, arcillo – arenoso de un Ph ácido (Padilla, 2017)

### c. Asociación vegetal

Lo podemos encontrar asociada con las siguientes especies; Romerillo (*Podocarpus rospigliosii*), Tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*), Cedro de altura

(*Cedrela sp*), Barejón (*Cordia alliodora*), Guayacán (*Tabebuia sp*), Bolaina (*Guazuma crinita*), etc. (Zevallos, 1989)

#### **2.2.4. IMPORTANCIA DEL GÉNERO CINCHONA**

##### **a. Cívico**

El árbol de la quina representa la riqueza del recurso vegetal del Perú y se le encuentra simbolizado en el Escudo Nacional, en el lado derecho superior del mismo. (Zevallos, 1989)

##### **b. Medicinal**

Es el árbol más cultivado por su alcaloide (quinina), cuyas propiedades, son utilizadas para la prevención y tratamiento de la malaria, también se usa para curar neumonías, acelerador del parto, tónico capilar para evitar la caída del cabello, desordenes del ritmo cardiaco, calambres e indigestión. Es depurativa pues favorece la eliminación de toxinas por piel y orina.(Gómez, Muñoz , y Ochoa ,2005)

##### **c. Forestal**

Solamente después de la Segunda Guerra Mundial que a la cascarilla se le considera como maderable. Siendo *Cinchona* de buena calidad para tablas y mueblería, no se raja ni se descompone fácilmente en el campo. La madera de color rosado o carne, de grano fino a mediano, textura media, es flexible o elástica, razón por la cual se pesa para la ebanistería, fácil de trabajar, y con el cepillado y lijado adquiere un buen acabado lustroso, se utiliza para postes, puntales, vigas, leña, carbón y tiene peso específico de 0.58 (36 libras/pie). (Zevallos, 1989)

##### **d. Ambiental**

- Captura de Carbono
- Regulación de la temperatura
- Provisión de agua en calidad y cantidad
- Generación de oxígeno
- Amortiguamiento del impacto de los fenómenos naturales
- Protección y recuperación de suelos (estabilización de taludes)

- Barrera contra ruidos (diversos estudios señalan que se logra una disminución del ruido hasta por 10 a 12 decibeles con la plantación estratégica de árboles)
- Biodiversidad
- Paisaje y recreación (Reyes y Gutiérrez, 2010)

### **2.3. 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. Consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. Es una técnica basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras, cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuadas y son estimuladas con determinados reguladores de crecimiento, (Marín, 1997)

Las características esenciales del método son: Es una propagación vegetativa, es decir, sin participación de los órganos reproductores de la planta, por medio de la estimulación de la inducción de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán las nuevas plantas. Es una propagación masiva, ya que la formación de yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo. Además, es una propagación clonal, ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original. Es una propagación in vitro porque tiene lugar en frascos de cultivo (originalmente de vidrio, aunque actualmente se emplea el plástico cada vez más), y con medios de cultivo definidos en los que se controla la composición y concentración de sus componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural, en cámaras de cultivo donde son controladas las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) que se mantienen a unos niveles óptimos para el crecimiento). Se mantienen las condiciones asépticas en todas las manipulaciones, evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que proliferarían con rapidez en el medio de cultivo afectando negativamente el cultivo de tejidos (Marín, 1997), (Castillo, 2004)

### **2.3.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN**

#### **a. Ventajas de la micropropagación**

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala.
- Reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido para tal fin.
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Conservación de germoplasma.
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal. Chamba (como se citó en Seemann, 1993)

#### **b. Desventajas de la micropropagación**

- Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo, entrenamiento del personal y especialización técnica.
- Alto costo inicial de las labores.
- La contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.
- Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados
- Se requiere un volumen alto, más o menos continuo en el sistema de distribución de materiales e insumos. Chamba (como se citó en Kester y Davies, 2002)

### **2.3.2. FASES O ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN:**

Según Castillo (2004), indica que las fases o etapas de la micropropagación son:

- Fase 0: preparación de la planta madre

Las plantas donadoras de yemas se mantienen en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

- Fase 1: desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos y se hará una desinfección, a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. A efectos

de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal.

- Fase 2: introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro.

- Fase 3: multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a la fase 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo.

- Fase 4: elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

- Fase 5: aclimatación de los explantes enraizados

Etapa en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, y se los lleva a un ambiente en el cual vas adaptando al explante a condiciones normales de campo, hasta lograr que la planta deje de ser heterótrofa a autótrofa y pueda desarrollarse normal en el medio natural.

### 2.3.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los explantes vegetales, agrupándose en: a) macro y micro elementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; y d) reguladores del crecimiento. (Villalobos y Thorpe,1991)

Se han creado numerosos medios de cultivo cuyas diferencias estriban en las cantidades y tipos de sales empleadas. Entre los más conocidos se encuentran: Murashige y Skoog (MS) (1962); Linsmaier y Skoog (LS) (1965); Borgin y Nitsch (BN) (1967); Gamborg (B5) (1970); White (1963). (Miller y Oyima, 1968).

#### a) **Funciones de los nutrientes:**

El Nitrógeno (N), forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos, se suministra el nitrógeno en forma de nitrato y amonio, el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico. Las fuentes de nitrógeno reducido son los aminoácidos, que están rápidamente disponibles, por ejemplo la glutamina; el Magnesio (Mg), es parte de la molécula de clorofila y de los ribosomas; el Calcio (Ca), es constituyente de la pared celular e interviene en la respuesta del crecimiento; el Fósforo (F), forma parte de las moléculas que almacenan y transfieren la energía química de los ácidos nucleicos, de él depende la energía celular; el Potasio (K), desempeña un papel importante en la regulación osmótica y en la actividad enzimática; el Azufre (S), es necesario para la síntesis de algunos aminoácidos ;el Hierro (Fe), fundamental para la formación de la clorofila; el Molibdeno (Mo), es fundamental para la actividad de la nitroreductasa; el Manganeso (Mn), induce la síntesis de clorofila que se requiere para la formación del O<sub>2</sub> en la fotosíntesis; el Boro (B), es necesario para el sostenimiento de la actividad meristemática y hace parte de la síntesis de bases nitrogenadas como el uracilo; el Cobre (Cu), ligado al proceso de lignificación; el Zinc (Zn), es requerido para la oxidación y la hidroxilación de compuestos; el Cobalto (Co), es un componente de la vitamina B12. El azúcar en las plantas in vitro es adicionado al medio de cultivo,

ya que la plántula no podrá producirla por ella misma. Ramos (como se citó en Garcia, 2000).

#### **2.3.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO**

Los reguladores de crecimiento vegetal, son compuestos o moléculas orgánicas que se sintetizan en una parte de la planta, y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica (procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas). De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, etc. (Melgarejo, 2010)

- Auxinas:

Las auxinas contribuyen a la elongación celular, dominancia apical, enraizamiento, su función biológica es la expansión de las células del tallo y coleóptilos. Las auxinas más utilizadas son: AIB (ácido indol butírico), ANA (Ácido  $\alpha$ -Naftalenacético), IAA (Ácido Indol-3- Acético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El AIB y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio. (Jordán y Casereto, 2006)

- Citocininas:

La función biológica de las citocininas es estimular principalmente la división celular o citocinesis. Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo in vitro se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además, se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), KIN (Kinetina) y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. (Jordán y Casereto,2006)

- **Giberelinas:**  
Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios. Lima (como se citó en Rosales, 2014)
- **Ácido abscísico**  
Fitohormona asociada con la inhibición del crecimiento, esta hormona importante para la aclimatación en condiciones de sequía, frío y salinidad, y en el desarrollo de la latencia e inhibición de la germinación de semillas, es esta regula el balance de agua en plantas en condiciones de estrés: con el cierre estomático y con la manutención de absorción de agua por la raíz. (Flores y Pereira, 2009)
- **Etileno**  
Única hormona vegetal gaseosa, simple y pequeña, presente en angiospermas y gimnospermas aunque también en bacterias y hongos además de musgos, hepáticas, helechos y otros organismos. Promueve la maduración de frutos, Pone fin a la dormancia de los brotes, Inicia la germinación de semillas, Inhibe el crecimiento de la raíz, etc. (Lluna, 2006)

### **2.3.5. LAS VITAMINAS**

Para lograr un buen crecimiento de las plantas *in vitro*, es necesario suplir el medio con una o más vitaminas. La más utilizada es la B1 (Tiamina) y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B2 (Riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (Ácido pantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina H (Biotina), vitamina E ( $\alpha$  - tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg/l. (Roca y Mroginski, 1995)

### 2.3.6. SUSTRATOS

Según Vifinex (2002), indica:

Un sustrato es un medio material en el que se desarrollan las raíces de las plantas, capaz de proporcionar el agua y los elementos nutritivos que demande, y a las raíces el oxígeno necesario para su respiración. Pueden clasificarse según su composición en Orgánicos e inorgánicos, los sustratos orgánicos o químicamente activos son: turbas, acícula de pino, cascarilla de arroz, aserrín, etc., dentro de los sustratos inorgánicos tenemos: gravas, las arenas de distintas granulometrías y las tierras de origen volcánico. Las diferencias entre ambos vienen determinadas por la capacidad de intercambio catiónico o la capacidad de almacenamiento de nutrientes por parte del sustrato. Los sustratos químicamente inertes actúan como soporte de la planta, no interviniendo en el proceso de adsorción y fijación de los nutrientes, por lo que han de ser suministrados mediante fertilización. Los sustratos químicamente activos sirven de soporte a la planta, pero a su vez actúan como depósito de reserva de los nutrientes aportados mediante la fertilización, almacenándolos o cediéndolos según las exigencias del vegetal.

#### a) **Propiedades físico- químicas**

- Propiedades físicas

Tenemos: su composición granulométrica (partículas de distintos tamaños), densidad real (es la densidad media de las partículas del sustrato sin incluir el espacio poroso), densidad aparente (es la relación entre el peso seco de dicho sustrato y el volumen que ocupa en condiciones de cultivo), espacio poroso total (porcentaje del volumen del sustrato no ocupado por el material sólido, este volumen está lleno de aire en los macroporos y de agua en los microporos), capacidad de absorción de agua (capacidad de agua expresada en gramos, que 100 gramos de sustrato seco pueden retener).

- Propiedades químicas

Es toda aquella variable que está sujeta a cambios químicos o de composición química, en otras palabras, es la transferencia de materia entre el sustrato y la solución nutritiva que alimenta las plantas a través de las raíces, así encontramos la, Capacidad de intercambio catiónico, pH, capacidad tampón, contenido de

sales (presión osmótica, conductividad eléctrica), contenido de elementos nutritivos, etc.

- Turbas.

Son materiales de origen vegetal más o menos húmificados y descompuestos y la más utilizada como sustrato, con una capacidad de intercambio iónico mayor, aireación y drenaje muy mejorado, alto contenido de nutrientes, mayor capacidad de retención de humedad que cualquier otro tipo de materia orgánica, etc.

- Humus

Resultado de la digestión de materia orgánica (compost, estiércol descompuesto, vegetales, etc.) por las lombrices, obteniéndose uno de los abonos orgánicos de mejor calidad.

- Arenas

Son materiales procedentes de canteras naturales y su composición depende fundamentalmente del origen de las rocas de las que proceden, silíceas y calcáreas, su tamaño comprendido entre los 0.02 y los 2 mm de diámetro. Suele hacerse la distinción, a efectos de clasificación, entre arenas gruesas (entre 2 y 0.2 mm) y arenas finas (entre 0.2 y 0.2 mm).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. HIPÓTESIS

La micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl, depende del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento vegetal empleados.

#### 3.2. MATERIALES

##### a. Material Biológico

Constituido por plántulas jóvenes provenientes de la germinación *Cinchona pubescens* Vahl en vivero, de las cuales se obtienen los explantes constituidos por yemas; la identificación de la especie fue realizada por el Consultor Botánico José Ricardo Campos De la Cruz con C.B.P N°3796.

##### b. Reactivos

- Constituyentes de los Medios Basales de: Murashige y Skoog (1962), Campbell y Durzan y Gamborg (1968).
- Reguladores de Crecimiento: N6 – Bencil aminopurina (BAP), Kinetina (Kin), Ácido Naftalen Acético (ANA) y Ácido Indol Butírico (AIB).
- Agar
- Sacarosa
- Ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de potasio (KOH)
- Hipoclorito de calcio (Ca(CLO)<sub>2</sub>)
- Agua destilada estéril
- Alcohol al 70%
- Tween 80

##### c. Material de Vidrio

- Tubos de ensayo de 25mm x 150 mm
- Cajas petri
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Frascos para reactivo
- Embudo

- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml
- Probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 ml
- Mechero de alcohol
- Matraz de 100, 250 y 500 ml

**d. Equipos**

- 
- Temporizador de iluminación.
- Refrigeradora
- pH-metro
- Autoclave
- Agitador magnético
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Equipos fluorescentes de 40 W
- Destilador de agua

**e. Otros**

- Papel aluminio
- Hojas de bisturí
- Papel de filtro
- Lapiceros marcadores
- Libreta de apuntes
- Material de escritorio
- Gradillas

### **3.3. METODOLOGÍA**

**a. Preparación de Medios de Cultivo**

Se realizó mezclando soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, sacarosa y agar, según cantidades indicadas por los autores, y en relación a los diferentes tratamientos en estudio, posteriormente se midió el pH, el cual fue ajustado a  $5.8 \pm 0.2$  con ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de potasio (KOH) al 0.1 N, en agitación.

Los medios de cultivo preparados se distribuyeron en volúmenes de 10 ml en los tubos de ensayo, cubriendo la boca del tubo con papel aluminio, para finalmente esterilizarlo en la autoclave a 121 ° C, durante 25 minutos, manteniéndolo en un lugar estéril hasta su uso.

**b. Obtención del explante**

Se recolectó semillas de *Cinchona pubescens* Vahl del Centro Poblado La Cascarilla y se realizó su germinación en un sustrato que contenía suelo de montaña previamente desinfectada con agua caliente y lejía aquí se estimuló su crecimiento y la mayor formación de yemas mediante la aplicación de abonos foliares.

Ubicación de las muestras de semilla:

Departamento: Cajamarca

Provincia: Jaén

Distrito: Jaén

Centro Poblado: La Cascarilla

Coordenadas: 733335.04 E – 9368487.78

**c. Fase de Desinfección**

Consistió en la eliminación de los microorganismos contaminantes presentes en la superficie del explante, con la finalidad de lograr la esterilidad que es indispensable en los cultivos in vitro. De la planta madre se extrajeron los explantes, quienes se lavaron con agua destilada, posteriormente se sometieron a un baño con alcohol etílico al 70% por 30 segundos, seguidamente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se colocaron en la solución de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) al 3% mas 3 gotas de Tween<sup>®</sup> 80 (detergente) durante 5, 10, 15 y 20 minutos, una vez transcurrido estos tiempos, las yemas fueron enjuagadas repetidas veces en agua destilada (10 veces) estéril en la cámara de flujo laminar, para finalmente colocarlas en placas petri esterilizadas, donde se obtuvieron los explantes del tamaño adecuado (2 cm aproximadamente).

**d. Fase de Crecimiento**

Los explantes esterilizados en la fase anterior fueron sembrados en los tubos de ensayo contenidos con los diferentes medios de cultivo en la cámara de flujo laminar (se colocó un explante por tubo de ensayo). Los tubos colocados en

gradillas se mantuvieron en la cámara de cultivo, el cuál presentó una temperatura promedio de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , a una exposición de luz de 16 horas y 8 horas oscuridad, por un periodo de 60 días.

**e. Fase de Multiplicación**

Para esta fase se utilizaron los explantes del medio de cultivo de mayor crecimiento, es decir el medio de Campbell y Durzan; descartándose los medios de cultivo que no lograron crecer significativamente, los explantes de la fase de crecimiento fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde una vez extraídas y puestas en una placa petri esterilizada, el tallo fue cortado en segmentos, luego se procedió a sembrar colocando un segmento por tubo de ensayo que contenía el medio de multiplicación, Campbell y Durzan y los reguladores de crecimiento BAP y KIN en concentraciones según los tratamientos a ensayar. Finalmente, los tubos fueron llevados al cuarto de cultivo por un periodo de 30 días.

**f. Fase de Enraizamiento**

Los brotes inducidos en la fase de multiplicación fueron repicados en tubos de ensayo conteniendo el medio de Campbell y Durzan, y los reguladores de crecimiento AIB y ANA en concentraciones según los tratamientos a ensayar, finalmente al cuarto de cultivo por espacio de 30 días, transcurrido este tiempo se notó la formación de primordios radiculares.

**g. Fase de aclimatación**

Formados las raíces en la fase anterior, las plántulas obtenidas fueron repicadas y llevadas a un invernadero con los sustratos respectivos, previamente desinfectados con agua y lejía.

### 3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

#### a. Desinfección

**Cuadro 1: Tratamientos aplicados en la fase de desinfección de los Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción	Tiempo de exposición	Repeticiones
I	Ca(CLO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	5 minutos	10
II	Ca(CLO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	10 minutos	10
III	Ca(CLO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	15 minutos	10
IV	Ca(CLO) <sub>2</sub> al 3% + 3 gotas de tween 80	20 minutos	10

#### b. Crecimiento

**Cuadro 2: Tratamientos aplicados en la fase de crecimiento de los Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción (medios de cultivo)	Repeticiones
I	Murashigue & skoog (1962)	10
II	Campbell y Durzan (1975)	10
III	Gamborg (1968).	10

#### c. Multiplicación

**Cuadro 3: Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación de *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción	Repeticiones
I	Campbell y Durzan +BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	10
II	Campbell y Durzan + BAP 1 mg/l	10
III	Campbell y Durzan + KIN 1 mg/l	10

d. Enraizamiento

**Cuadro 4: Tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento de la *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción	Repeticiones
I	Campbell y Durzan + AIB 0.5 mg/l	10
II	Campbell y Durzan + ANA 0.5 mg/l	10
III	Campbell y Durzan + AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	10
IV	Campbell y Durzan + ANA 1 mg/l	10
V	Campbell y Durzan + AIB 1 mg/l	10
VI	Campbell y Durzan + AIB 1 mg/l+ ANA 1 mg/l	10

e. Aclimatación

**Cuadro 5: Tratamientos aplicados en la fase e aclimatación de la *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción	Repeticiones
I	Humus 50% + arena 50%	10
II	Turba 60% + arena 40%	10
III	Humus 100%	10

### 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), para cada una de las fases de micropropagación.

a. Método Aditivo Lineal del Diseño completamente al azar

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_{ij}$$

- Fase de desinfección

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	3
Error experimental	36
Total	34

- Fase de crecimiento

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	2
Error experimental	27
Total	29

- Fase de multiplicación

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	2
Error experimental	27
Total	29

- Fase de enraizamiento

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	5
Error experimental	54
Total	59

- Fase de aclimatación

Fuentes de Variabilidad (F.V)	Grados de Libertad (G.L)
Tratamiento	2
Error experimental	27
Total	29

### 3.5.1. PRUEBA ESTADÍSTICA

Se realizó la prueba de “F” mediante el método de, mínimos cuadrados (ANVA), y la prueba de comparación de medias de Duncan, para determinar la diferencia entre los tratamientos en estudio.

### 3.5.2. EVALUACIONES REALIZADAS:

- a. Fase de Desinfección

Se observó si el explante está o no contaminado por algún agente patógeno (hongos o bacterias), tomándose en cuenta para esto la turbidez del medio y/o la presencia de estructuras macroscópicas que evidencien la presencia del microorganismo contaminante. Esta evaluación se realizó después de 10 días de sembrado el explante.

**b.** Fase de Crecimiento

La evaluación consistió en la medición de la longitud del explante semanalmente.

**c.** Fase de Multiplicación

Consistió en evaluar:

- Longitud promedio por explante, semanalmente
- El número de brotes por explante, semanalmente

**d.** Fase de Enraizamiento

Se determinó:

- El porcentaje de plántulas enraizadas.
- Número de raíces por explante.
- El número promedio de raíces por explantes
- La longitud promedio de las raíces de cada explante.

**e.** Fase de Aclimatación:

Se evaluó:

- Porcentaje de plántulas sobrevivientes por sustrato, después de dos meses.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. FASE DE DESINFECCIÓN

En la cuadro 11 (Anexo 1) y la figura 1 se muestra los resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de explantes de *Cinchona pubescens* Vahl, determinándose que el tratamiento IV, presenta el 95.83 % de explantes no contaminados y el 4.17% de explantes contaminados, por lo cual llegamos a la conclusión que el tratamientos antes mencionado presenta el menor porcentaje de muestras contaminadas y por ende el tratamiento más óptimo en desinfección de explantes; seguido del tratamiento III que presenta el 66.6% de explantes no contaminados y el 33.4% de explantes contaminados; el tratamiento II presenta un 75% de explantes contaminados y el tratamiento I presenta el 100% de explantes contaminados considerándose como los tratamientos con mayor porcentaje de explantes contaminados y menos adecuados para su aplicación en la fase de desinfección.

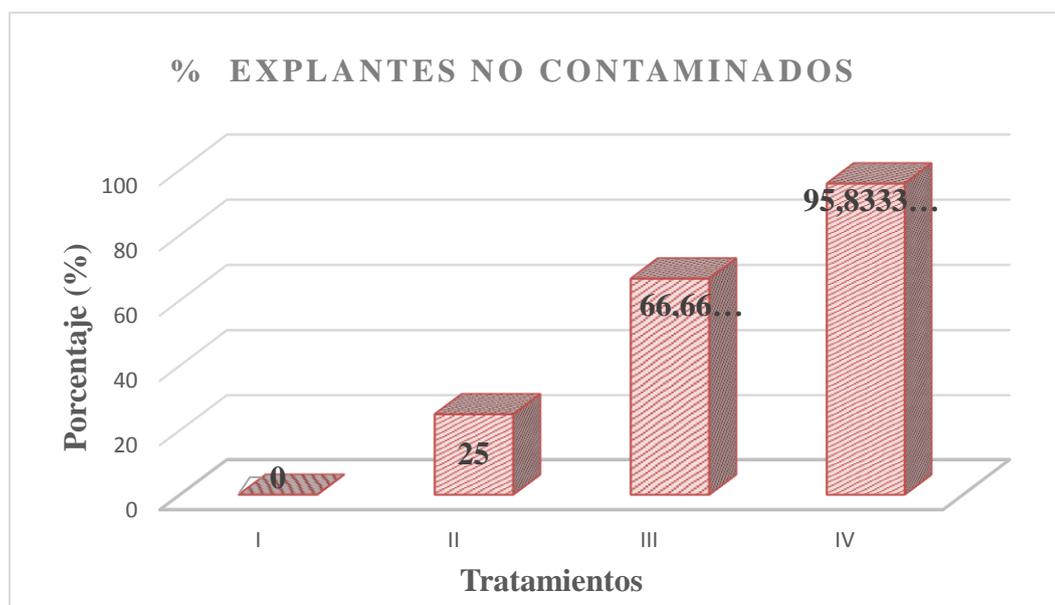


Figura 1: Porcentaje de Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl no contaminados por tratamiento

Estos resultados coinciden con lo señalado por Rodríguez, et al. (2004), en su investigación de Micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany* (Caoba Híbrida) Y *Cedrela odorata* (CEDRO) en donde demuestran que al desinfectar con hipoclorito de calcio al 3% por 20 minutos tiene el 100% de explantes descontaminados, indicando que esto se debe a que el desinfectante al entrar en contacto con el agua se forma el ácido hipocloroso y el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte y los microorganismos son destruidos por su acción sobre los componentes celulares,

Además, según, Sharry (2015), indica que los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), empleándose en concentraciones de 1 a 3 % en tiempos de 10 a 20 minutos, teniendo resultados óptimos dentro de esos estándares establecidos; indicando que el hipoclorito de sodio (NaClO) puede ser reemplazado por el hipoclorito de calcio (CaClO)

#### **4.2. FASE DE CRECIMIENTO**

Según el análisis de varianza cuadro 13 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación que existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad de 3.56%.

En el cuadro 6 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento II (medio de cultivo de Campbell y Durzan) es estadísticamente superior a los otros dos tratamientos, en relación a la altura promedio del explante sin la aplicación de hormonas, con 31.6 mm, seguido del tratamiento III (medio Gamborg - 1968), con una altura promedio de 28.8 mm y finalmente el tratamiento I (medio Murashigue & skoog - 1962), en el cuál se obtuvo la altura promedio de 27.8 mm, siendo estos diferentes estadísticamente.

**Cuadro 6: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable altura del explante en la fase de crecimiento.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Media</b>
II	Campbel y Durzan (1975)	31.6 a
III	Gamborg (1968)	28.8 b
II	Murashigue & skoog (1962)	27.8 c

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

Estos resultados estarían indicando que el medio de cultivo de Campbell y Durzan (1975) tiene una proporción adecuada tanto de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos; el medio Murashigue & skoog (1962), es muy recomendado por diferentes autores para la micropropagación de especies leñosas, más no el adecuado para micropropagación de *Cinchona pubescens* Vahl, ya que Según, Santos (2011) el medio Murashige and Skoog provoca hiperhidricidad en brotes de Cinchona, además según Ramos (citado por López, 2009) indica que este medio no es el adecuado por contener altos contenidos de sales, lo cual causa deficiencia en el enraizamiento del explante (citado por Pérez Mesén y Aguilar, 2000), el medio Gambort sin embrago es muy adecuado para la micropropagación de esta especie, según investigaciones realizadas, pero en la presente investigación se muestran mejores resultados con el medio Campbell y Durzan.

Además, Ramos (citado por Krikorian, 1991), afirma que para lograr un buen crecimiento de las plantas in vitro, es necesario suplir el medio con una o más vitaminas. La más utilizada es la Tiamina y se la considera un ingrediente esencial, el cual el medio Campbell y Durzan (1975) contiene esta vitamina dentro de sus componentes. (George, 1987)

Padilla (2017), indica que los nutrientes esenciales para la cinchona son el nitrógeno (N), el hierro (Fe), óxido de potasio (K<sub>2</sub>O), óxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), el manganeso (Mn) y el zinc (Zn), componentes que se encuentran dentro del medio Campbell y Durzan y en el cual se mostró mejores resultados.

### 4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

#### 4.3.1. Número de brotes de *Cinchona pubescens* Vahl

Según el análisis de varianza cuadro 15 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación que existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad de 20.82 %.

En el cuadro 7 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento I (BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l) es superior en número de brotes con 3.1; siendo este diferente estadísticamente a los tratamientos II (BAP 1 mg/l) y III (KIN 1 mg/l) los cuales tuvieron 1.5 y 1.8 brotes, respectivamente.

**Cuadro 7: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de brotes**

Tratamiento	Descripción	Media
I	BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	3.1 a
II	BAP 1 mg/l	1.5 b
III	KIN 1 mg/l	1.8 b

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Ramírez (2003) en “Propagación in vitro de explantes de *Tectona grandis*”, en el cual indica que el mejor tratamiento para la obtención de brotes de Teca resultó al combinar las hormonas BAP y KIN, además según Morales (citado por Cárdenas, et al. 1992), indica que de todos los tratamientos utilizados, lograron la proliferación de brotes de *Astrophytum capricorne* utilizando hormonas de BAP y KIN en un mismo tratamiento, esto mismo fue corroborado por Morales (2000), quien indica que el mejor resultados obtenido en número de brotes es al aplicar hormonas de BAP y KIN.

Lima (2016), en “Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de *cinchona officinalis* L”, en sus resultados obtenidos en la fase de multiplicación para la variable número de brotes formados, presento como tratamientos las concentraciones de 0.2 mg/l de ANA + 2.0 mg/l de KIN y de 0.2 mg/l de ANA +

2.0 mg/l de BAP, obteniendo como respuesta para la variable número de brotes de  $1.67 \pm 0.40$  y  $4.73 \pm 0.40$ , respectivamente, notándose que las concentraciones aplicadas de hormonas son mayores, además la relación entre número de brotes y concentración de hormonas no es tan eficiente, puesto que hay una combinación de auxinas con citoquininas; lo cual implica que al realizar tratamientos solamente con citoquininas los resultados son más eficientes, lo antes mencionado se puede corroborar con Morales (2000), quien afirma que para la proliferación de brotes en cultivos in vitro, el mejor tratamiento es la aplicación de citoquininas puras, además según Chamba (citado por Hartmann y Kester, 2002), afirma que si se desean brotes axilares debe emplearse concentraciones moderadas de Citocinina (BAP o Kin), de 0.5 a 1.0 mg/l y la concentración auxínica debe mantenerse muy baja u omitirse por completo.

#### 4.3.2. Longitud de brotes de *Cinchona pubescens* Vahl

Según el análisis de varianza cuadro 17 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación que existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad al 8.41%

En el cuadro 8 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento I (BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l) es estadísticamente superior a los otros tratamientos en longitud de brote con 34 mm, seguido de los tratamientos II (BAP 1 mg/l) y III (KIN 1 mg/l) los cuales tuvieron 22.4 mm y 24.5 mm, respectivamente.

**Cuadro 8: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Longitud promedio (mm) de la *Cinchona pubescens* Vahl**

Tratamiento	Descripción	Media
I	Campbell y Durzan + BAP 0.5 mg/l + KIN 0.5 mg/l	34 a
II	Campbell y Durzan + BAP 1 mg/l	22.4 c
III	Campbell y Durzan + KIN 1 mg/l	24.5 b

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramírez (2003), el cual evaluó la “Propagación in vitro de explantes de *Tectona grandis*”, encontrando que el mejor tratamiento aplicado correspondía a la combinación de BAP (2mg/l) y KIN (0.5mg/l).

Según la investigación realizada por Lima (2016), en “Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L”, indicó que el mejor tratamiento fue con la concentración de 1.5 mg/l ANA + 3.0 mg/l BAP obteniendo como respuesta 1.7 cm de longitud, podemos notar que los tratamientos aplicados utilizan fitoreguladores de citoquininas y auxinas a diferentes concentraciones y comparando con nuestros resultados notamos que al realizar tratamientos con puro citoquininas encontramos brotes con longitudes mayores llegando hasta los 34 mm en promedio, indicando nuevamente que al trabajar solamente con el mismo grupo de hormonas vegetales (citoquininas) obtendremos resultados más óptimos.

Lo antes mencionado en relación a la aplicación de la eficiencia del tipo de hormonas en los tratamientos se puede corroborar con la investigación de Chamba (2017), quien indica que, al aplicar el tratamiento de 0.5 mg/l ANA + 2.5 mg/l BAP, en explantes de *Cinchona* este presentó como respuesta una longitud de brote promedio de 1.5 cm de longitud, inferior a lo reportado en esta investigación.

#### **4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO**

En el cuadro 9 se puede notar que los cinco primeros tratamientos no tuvieron respuesta alguna, encontrando solamente una respuesta positiva en el tratamiento VI, con 8.75 raíces en promedio y una longitud de 19.1 mm (1.91 cm) en promedio.

**Cuadro 9: Explantes enraizados por tratamiento**

Tratamientos	Descripción	Número de raíces	Longitud (mm)
I	Campbell y Durzan + AIB 0.5 mg/l	0	0
II	Campbell y Durzan + ANA0.5 mg/l	0	0
III	Campbell y Durzan + AIB 0.5 mg/l+ ANA 0.5 mg/l	0	0
IV	Campbell y Durzan + ANA 1 mg/l	0	0
V	Campbell y Durzan + AIB 1 mg/l	0	0
VI	Campbell y Durzan + AIB 1 mg/l+ ANA 1 mg/l	8.75	19.1

Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Pérez (2001) en micropropagación de *Cedrela odorata*, en el cual indica que el mejor tratamiento para la obtención de raíces resultó al combinar las hormonas ANA(0.5mg/l) y AIB (1 mg/l), además según Sotolongo (2000), señala que los mejores resultados se obtienen al combinar ANA y AIB lo cual está relacionado con el efecto sinérgico sobre la morfogénesis de raíces al actuar simultáneamente ambas auxinas, el mismo indica que se logra obtener hasta el 90% de plántulas enraizadas, además según Sotolongo (citado por Lakshmi y Col, 1986), con la utilización de las hormonas ANA y AIB en un rango de 0.5 mg/l se logró enraizar explantes de *Eucalyptus grandis*.

#### **4.5. FASE DE ACLIMATACIÓN**

##### **4.5.1. Porcentaje (%) de supervivencia**

Según el análisis de varianza cuadro 20 (Anexo 1) podemos observar en su fuente de variación que existe diferencia estadística significativa, así mismo presenta un coeficiente de variabilidad al 7.38 %.

En el cuadro 10 se puede observar la prueba de comparación de medias de Duncan, donde se puede ver que el tratamiento II (Turba 60% + arena 40%) es estadísticamente superior a los otros dos tratamientos con 80.56%, seguido de los tratamientos I (humus 50% + arena 50%) y III (humus 100%) con 50.93% y 50%, respectivamente.

**Cuadro 10: Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable Porcentaje de plántulas de *Cinchona pubescens* Vahl sobrevivientes por sustrato**

Tratamiento	Descripción	Media
II	Turba 60% + arena 40%	80.56 a
I	humus 50% + arena 50%	50.93 b
III	humus 100%	50 b

\* Medias seguidas con letras iguales no son diferentes estadísticamente según la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad

Los resultados obtenidos concuerdan con lo señalado por Conde (2016), en su investigación de “Propagación in vivo de *cinchona officinalis* L”, quien señala que los mejores sustratos están constituidos por turba y arena, en donde, el sustrato turba en proporciones mayores traerá como consecuencia mayor supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatación, esto se puede corroborar por Apolo (2012) quien indica que el sustrato adecuado a nivel de invernadero para plántulas de *Cinchona pubescens* Vahl debe estar constituido por proporciones de arena y Turba (tierra negra de páramo)

Además Padilla (2017) indica que para la aclimatación de la *Cinchona* se debe de usar sustratos como tierra, arena y turba , para garantizar una buena aireación, alto contenido de humedad y contenido de macronutrientes, todo lo antes mencionado concuerda con el tratamiento II el cual es Turba (propia de la zona donde crece la *Cinchona*) más arena, al mismo tiempo los tratamiento I y III también muestran resultados adecuados puesto que cumplen con las características propias de las exigencias de la especie.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se efectuó el presente trabajo de investigación, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. El mejor medio de cultivo identificado en este trabajo de investigación para la micropropagación de *Cinchona pubescens* Vahl, corresponde al medio Campbell y Durzan
2. Las concentración de hormonas más apropiadas para la fase de multiplicación, en las variables de número de brotes y longitud corresponden a 0.5 mg/l BAP (Bencilamino Purina) más 0.5 mg/l KIN (Kinetina), así como para la fase de enraizamiento las hormonas más adecuadas corresponden a las concentración de 1 mg/l AIB (ácido Indol butírico) más 1 mg/l ANA (Ácido  $\alpha$ -Naftalenacético).
3. Para la Micropropagación optima de la *Cinchona pubescens* Vahl, se debe seguir el siguiente protocolo; en la fase de desinfección utilizar el hipoclorito de calcio (3%) por 20 minutos; utilizar como medio de cultivo a Campbell y Durzan (1975); en la fase de multiplicación utiliza hormonas puras (solo citoquininas) en concentraciones desde a 0,5 mg/l BAP (Bencilamino Purina) más 0.5 mg/l KIN (Kinetina), en la fase de enraizamiento utilizar hormonas puras (solo auxinas), desde 1 mg/l AIB (ácido Indol butírico) más 1 mg/l ANA (Ácido  $\alpha$ -Naftalenacético), en la fase de aclimatación se recomienda utilizar como sustrato al medio de Turba (60%) más arena (40%).

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda continuar con investigaciones en la fase de multiplicación, para lograr un mayor número de explantes con producción de brotes, así como un mayor número de brotes por explante
2. En la fase de enraizamiento de la especie, probar nuevas concentraciones de auxinas, superiores a las utilizadas en este trabajo de investigación, pues el enraizamiento obtenido es mínimo y con el máximo tratamiento aplicado.
3. Realizar trabajos de investigación hasta la fase de aclimatación, con la finalidad de generar mayores conocimientos y con diferentes proporciones para ver la reacción de la especie.
4. Utilizar giberelinas en la fase de multiplicación, con la finalidad de obtener mayor elongación entre nudos.
5. Realizar el enraizamiento en un invernadero, es decir sin la aplicación de hormonas, para determinar el comportamiento de la especie y observar si la especie se adapta con mayor facilidad.
6. Realizar estudios de la composición de los sustratos utilizados en la fase de aclimatación.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedini, W., Boeri, P., Marinucci, L., Ruscitti, M., y Scelzo, L. (1999). Biotecnología aplicadas a especies forestales nativas. Buenos Aires, Argentina.
- Apolo, M. (2012). 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 de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Armijos, R. (2016). Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Campos, J. (2014). Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl "quina" (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.
- Chamba, L. (2017). Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., partir de vitro plantas, en la Argelia – Loja (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Cifuentes, C. (2013). “Estudio de la Composición Química del Tónico Amargo de la Corteza de Quina Roja (*Cinchona pubescens*)” (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Conde, E. (2016). Propagación in vivo de *Cinchona officinalis* L., a partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

- Conde, V. (2017). Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. proveniente del bosque seco de la provincia de Loja (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Jaén, Ecuador.
- Flores , D., Jiménez Bonilla, V., y Chacón Cerdas, R. (2009). Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas. Sistema de Información Científica Redalyc. 319-325. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43713059012>
- Flores, V., y Pereira, M. (2009). El ácido abscísico acelera el desarrollo floral de solidago en días cortos. Bogotá, Colombia.
- George, E. (1987). Plant culture media. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4803?lang=en&region=PE>
- ISSG. (2000). *Cinchona pubescens* Vahl. Global Invasive Species Database. Recuperado de <http://www.iucngisd.org/gisd/index.php>
- Jordán, M., y Casereto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento, Recuperado de <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocinas.pdf>
- Lima , N. (2016). Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L., a partir de diferentes fuentes de material vegetal. Loja, Ecuador (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de ,Ecuador.
- Lluna, R. (2006). Fitoreguladores. Recuperado de [http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema\\_14.htm](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.htm)
- Lopera, P., Gómez, I., Muñoz , L., y Ochoa, F. (2005). El milagro de las Plantas: Aplicaciones medicinales y orofaríngeas. Colombia: M. Ramirez. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=ss3tcgKqh\\_UC&printsec=frontcover&hl=es&source=](https://books.google.com.ec/books?id=ss3tcgKqh_UC&printsec=frontcover&hl=es&source=)
- Marín, J. (1997). La micropropagación y la mejora de especies frutales. Recuperado de [http://digital.csic.es/bitstream/10261/19028/1/Mar%C3%ADnJ\\_DiscursoAcadCEFQN\\_1997.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/19028/1/Mar%C3%ADnJ_DiscursoAcadCEFQN_1997.pdf)

- Melgarejo, L. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Colombia: Charlie's impresores Ltda.
- Mogollón de Lucena, N., y Gil de Serpa, M. (1989). Propagación de *Mussaenda erythrophylla* Shum y Thom, 'Rosea' mediante cultivo in vitro. Lara – Venezuela.
- Morales, M. (2000). Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo in vitro de pitahaya *Hylocerem undatus* (Tesis de Posgrado). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Moya, A. (1994). Auge y crisis de la Cascarilla en la audienciade Quito, Siclo XVIII (Vol. 1). Ecuador: FLACSO.
- Mroginski, L., y Roca, M. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Recuperado de [https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&pg=PA19&printsec=frontcover&dq=Cultivo+de+tejidos+en+la+agricultura&cd=1&redir\\_esc=y&hl=es#v=onepage&q=Cultivo%20de%20tejidos%20en%20la%20agricultura&f=false](https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&pg=PA19&printsec=frontcover&dq=Cultivo+de+tejidos+en+la+agricultura&cd=1&redir_esc=y&hl=es#v=onepage&q=Cultivo%20de%20tejidos%20en%20la%20agricultura&f=false)
- Nación, L. (2008). Cruzada para salvar el árbol de la quina, símbolo en el Escudo de Perú. Recuperado de [http://www.nacion.com/tecnologia/Cruzada-salvar-simbolo-Escudo-Peru\\_0\\_1002299774.html](http://www.nacion.com/tecnologia/Cruzada-salvar-simbolo-Escudo-Peru_0_1002299774.html)
- Padilla, T. (2017). Estudio fenológico y análisis de las características del suelo donde se desarrolla *Cinchona officinalis* L. En cuatro relictos boscosos de la provincia de Loja (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Pérez, J. (2001). Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. Costa Rica. Revista Forestal Centroamericana. Recuperado de <http://www.orton.catie.ac.cr/repdoc/A3295E/A3295E.PDF>.
- Puyusacha. (2010). Plantas notables del bosque. Recuperado <http://www.puyusacha.org/attractivos-arbol-quina.php>
- Ramírez, D. (Julio de 2003). Propagación in vitro de explantes de Teca obtenidos a partir de semillas. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/250/223>

- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Abierta y a distancia (UNAD), Bogotá.
- Reyes, I., y Gutiérrez, J. J. (2010). Los servicios ambientales de la arborización urbana; retos y aportes para la sustentabilidad de la ciudad de Toluca. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40113202009>
- Roca, W., y Mroginski, L. (1995). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books/about/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.html?id=EXijYNw55DUC](https://books.google.com.pe/books/about/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.html?id=EXijYNw55DUC).
- Rodríguez, R., Daquinta, M., Capote, I., Pina, D., Lezcano, Y., & González, L. (2004). Nuevos aportes a la Micropropagación de *Swietenia macrophylla* X *Swietenia mahogani* (Caoba Híbrida) Y *Cedrela odorata* (Cedro), Cuba.
- Santos Díaz , A. (2011). Modificación de nutrientes y agentes osmóticos sobre la limitación del crecimiento In vitro de *Cinchona officinalis*, L: como herramienta de conservación (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Recuperado el 25 de Octubre de 2017, de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_\\_pdf-PDFA.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__pdf-PDFA.pdf?sequence=1)
- Sotolongo, R. (2000). Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae) (Tesis Post Grado). Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- Vifinex. (2002). Producción de sustratos para viveros. Recuperado el 30 de 01 de 2018, de <http://www.cropprotection.es/documentos/Compostaje/Sustratos-para-Viveros.pdf>
- Villalobos, M., & Thorpe, A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones, Colombia.
- Zevallos, P. (Enero de 1989). Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Cinchona* en el Perú, Perú.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1: Pruebas estadísticas

**Cuadro 11: Resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl**

Desinfección				
N° Tratamiento	Duración de exposición (min)	N° Explantes tratados	% Explantes contaminados	% Explantes no contaminados
I	5	10	0	0
II	10	10	75	25
III	15	10	33.4	66.6
IV	20	10	4.17	95.83

**Cuadro 12: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de crecimiento de Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl a los 60 días – mm.**

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27
II	33	35	30	31	30	31	33	32	30	31
III	28	29	29	29	30	29	28	29	28	29

**Cuadro 13: Análisis de varianza (ANVA) para la variable altura promedio de Explante de *Cinchona pubescens* Vahl en la fase de crecimiento**

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	2	77.6	38.8	35.39	3.35	*
Error experimental	27	29.6	1.0962963			
Total	29	107.2				

C.V	3.56
-----	------

**Cuadro 14: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Multiplicación de Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl, en la cuarta semana – número de brotes:**

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	5	4	4	2	4	2	3	2	3	2
II	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2
III	3	3	3	1	1	2	1	1	1	2

**Cuadro 15: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Número de brote promedio por Explante de la *Cinchona pubescens* Vahl en la fase de multiplicación.**

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	2	1.58	0.79	9.17	3.35	*
Error experimental	27	2.33	0.086			
Total	29	3.92				

C.V	20.82
-----	-------

**Cuadro 16: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Multiplicación de Explantes de *Cinchona pubescens* Vahl, en la cuarta semana – longitud de brotes:**

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	33	40	33	30	35	27	35	37	37	33
II	24	24	22	21	23	23	22	22	22	21
III	24	26	24	24	24	25	25	25	24	24

**Cuadro 17: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Longitud promedio por Explante de la *Cinchona pubescens* Vahl en la fase de multiplicación**

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	2	764.06	382.03	74.26	3.35	*
Error experimental	27	138.9	5.14			
Total	29	902.96				

C.V	8.41
-----	------

**Cuadro 18: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de Enraizamiento de Explantos de *Cinchona pubescens* Vahl - número de raíces**

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	9	8	9	9	9	9	8	9	9	8

**a. Evaluación realizada en la cuarta semana – longitud de raíces:**

Tratamientos	Repeticiones									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	18	20	19	18	20	19	20	18	20	19

**Cuadro 19: Registro obtenidos en la evaluación de la fase de aclimatación de plántulas de *Cinchona pubescens* Vahl sobrevivientes por sustrato**

Tratamientos	Repeticiones		
	1	2	3
I	50	41.66666667	61.11111111
II	83.33333333	75	83.33333333
III	50	50	50

**Cuadro 20: Análisis de varianza (ANVA) para la variable Porcentaje de plántulas de *Cinchona pubescens* Vahl sobrevivientes por sustrato en la fase de aclimatación**

F.V	G.L	S.C	C.M	F.C	F.T	Sig.
Tratamientos	2	697.30	348.65	24.15	5.14	*
Error experimental	6	86.59	14.43			
Total	8	783.89				

Datos convertidos  
arc sen

C.V	7.38
-----	------

### Anexo 1: Composición de los medios de cultivo

<b>COMPONENTES (mg/L)</b>	<b>MURASHIGE Y SKOOG (1962)</b>	<b>CAMPBELL Y DURZAN</b>	<b>GAMBORG (1968)</b>
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub> (Nitrato de potasio)	1900	340	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Nitrato de amonio)	1650	800	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (Nitrato de calcio tetrahidratado)		980	
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (Cloruro de calcio dihidratado)	440		150
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Sulfato de magnesio heptahidratado)	370	370	250
KCl (Cloruro de potasio)		65	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de potasio monobásico)	170	170	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de amonio monobásico)			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (Fosfato de sodio hidratado)			150
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sulfato de sodio)			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sulfato de amonio)			134
<b>Micronutrientes</b>			
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O (sulfato de manganeso (II) tetrahidratado)	22.3	22.3	13.2
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (sulfato de zinc tetrahidratado)	8.6	8.6	2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido Bórico)	6.2	6.2	3
K I (Yoduro de potasio)	0.83	0.83	0.750
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (Sulfato de cobre II pentahidratado)	0.025	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Molibdato de sodio dihidratado)	0.25		0.250

CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (Cobalto de cloruro hexahidratado)	0.025	0.025	0.024
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Sulfato de hierro II heptahidratado)	27.85	27.85	13.902
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	37.25	37.25	18.613
<b>Vitaminas</b>			
Inositol	100	100	99.1
Tiamina - HCl	0.1	0.4	10.118
Ácido nicotínico	0.5		0.985
Piridoxina – HCl	0.5		1.028
Ác. Pantoténico Biotina Choline chloride Riboflavina Ácido ascórbico Ácido fólico			
<b>Otros</b>			
Agar (g/l)	7	7	7
Sacarosa (g/l)	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7

## **Anexo 2: Protocolo base para la Micropropagación de la *Cinchona pubescens* Vahl**

### **Especies:**

**Nombre científico:** *Cinchona pubescens* Vahl

**Nombre común:** Cascarilla, Quina.

### **Establecimiento de los cultivos:**

#### **a. Explante utilizado**

Se utilizan como explantos segmentos de tallos de aproximadamente 2 cm de largo.

#### **b. Desinfección del explante:**

Los explantes son lavados con agua destilada, posteriormente se sometieron a un baño con alcohol etílico al 70% por 30 segundos, seguidamente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se colocaron en la solución de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) al 3% más 3 gotas de tween 80 durante 5, 10, 15 y 20 minutos, donde el tratamiento más adecuado corresponde al tiempo de 20 minutos y finalmente las yemas fueron enjuagadas repetidas veces en agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar.

#### **c. Medio de cultivo para el establecimiento:**

Los explantos una vez desinfectados se colocan en diferentes medios de cultivo para la obtención de plantas completas. Estos medios contienen los macro y micronutrientes de Campbell y Durzan (1975), adicionando como fuente de carbono el azúcar (30g/l), como agente gelificante agar-agar. Se emplean en los tratamientos diferentes fitohormonas BAP (bencilamino purina), KIN (Kinetina) - 0.5 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de KIN (citoquininas).

Los medios fueron colocados en matraces de erlenmeyer, ajustado el pH entre  $5.8 \pm 2$  y se esterilizan en autoclave a  $121^\circ \text{C}$ , durante 25 minutos, durante un mes.

**Condiciones de incubación:** temperatura  $23^\circ \text{C} \pm 2$ , a una exposición de luz de 16 horas y 8 horas oscuridad.

#### **d. Enraizamiento**

**Explante:** Una vez obtenidos los brotes son subcultivados a un medio de enraizamiento, el cual contiene como hormonas AIB (ácido indol butírico), ANA (Ácido  $\alpha$ -Naftalenacético) - 1mg/l de ANA más 1mg/l de AIB, durante un mes.

Condiciones de incubación: Temperatura temperatura  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , a una exposición de luz de 16 horas y 8 horas oscuridad.

#### **e. Aclimatación**

Las plantas completas obtenidas en el medio de enraizamiento se lavan cuidadosamente con la finalidad de eliminar los restos de agar, luego se transfieren al sustrato de turba (60%) y arena (40%) estéril, bajo condiciones ambientales controladas y riego por un mes hasta que la nueva planta se adapte.

### Anexo 3: Panel Fotográfico



Figura 2: Preparación de medios de cultivo



Figura 3: Desinfección del material de laboratorio



Figura 4: Preparación del desinfectante

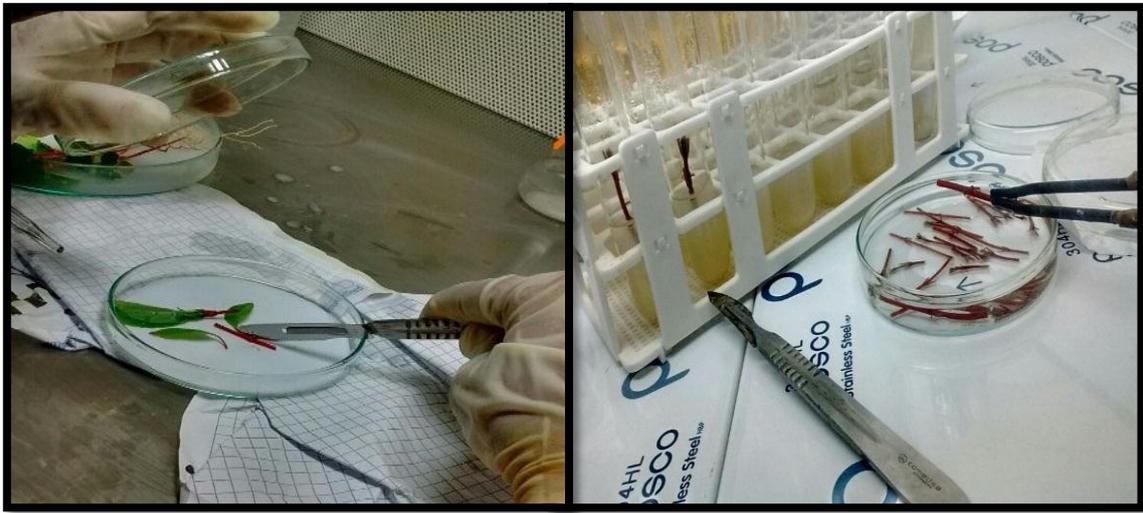


Figura 5: Preparación del explante de *Cinchona pubescens* Vahl



Figura 6: Siembra de explantes de *Cinchona pubescens* Vahl



Figura 7: Brotes de *Cinchona pubescens* Vahl – fase de crecimiento



Figura 8: Brotes de *Cinchona pubescens* Vahl – fase de multiplicación



Figura 9: Enraizamiento de explantes de *Cinchona pubescens* Vahl



Figura 10: Plántulas de *Cinchona pubescens* Vahl

## Anexo 4: Identificación de la *Cinchona pubescens* Vahl

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. N° 3796  
Tel: 017512863 RPM #963689079  
E-mail: jocamde@gmail.com



### CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### Certifica:

Que, **OMERY ISABEL CAMPOS TORRES**, estudiante de la Carrera profesional de Ingeniería Forestal y Ambiental de la Universidad Nacional de Jaén; con fines de investigación científica, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta recolectada en un bosque del Centro Poblado la Cascarilla de la Provincia de Jaén del departamento de Cajamarca, donde es conocida con el nombre vulgar de “cascarilla”, la muestra fértil con flores y frutos ha sido estudiada e identificada como *Cinchona pubescens* Vahl. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae  
DIVISION : Magnoliophyta  
CLASE : Magnoliopsida  
SUBCLASE : Asteridae  
ORDEN : Rubiales  
FAMILIA : Rubiaceae  
GENERO : *Cinchona*  
ESPECIE : *Cinchona pubescens* Vahl.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 05 de marzo del 2018



Jr. SÁNCHEZ SILVA N° 156 – PISO 02 – URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA- LIMA 07