



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**AREA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DE BIÓLOGO**

***Crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis****

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Autor:** Ríos Carreño, Gabriel Humberto

**Director:** Espinosa Iñiguez, Carlos Iván, PhD

**LOJA – ECUADOR**

**2015**

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Carlos Iván Espinosa Iñiguez.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis* realizado por Ríos Carreño Gabriel Humberto, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2015

f) .....

Cédula: 1103417174

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Gabriel Humberto Ríos Carreño, declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: Crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis*, de la Titulación Biólogo, siendo Carlos Iván Espinosa Iñiguez, director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.  
Gabriel Humberto Ríos Carreño  
**1103826713**

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que confiaron en mí y sobre todo por la paciencia que supieron tener en la realización de la misma, lo que hizo posible que este proyecto se haya finalizado de la manera más satisfactoria.

Me llena de alegría y sobre todo de orgullo de formación a ver sido parte de una carrera que me ha dado muchas alegrías y experiencias que me servirán para el desarrollo de mi vida profesional.

A todos les dedico mi esfuerzo.

Gabriel.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi Dios por la fuerza espiritual que estuvo en los momentos más importantes que me permitieron seguir adelante con todo lo propuesto en mi vida.

Gracias a la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirme las puerta en tan grandiosa institución para mi formación profesional.

A nuestros queridos docentes que durante 10 ciclos de formación impartieron todos sus conocimientos y experiencias que me servirán a futuro.

Agradezco a mi Tutor, Dr. Carlos Iván Espinosa, por su paciencia, conocimientos y la oportunidad que me brindo en la realización del Proyecto de fin de titulación.

Al Área Biológica por sus instalaciones para el desarrollo de PFT.

Quiero agradecer a la Ing. Rosa Armijos, Ing. Elizabeth Gusmán, Mat. Pablo Ramón, Blga. Lorena Riofrio, Ing. Jorge Luis Armijos Barros, por la información y tiempo prestado.

Muy importante en mi vida son mis padres Fabián, María, hermanos, les agradezco por sus valores que me inculcaron, amor de familia y apoyo que ha sido fundamental en mi formación.

Quiero agradecer inmensamente a mi tío José Francisco Mogrovejo Orellana, ya que ha sido un pilar fundamental en mi formación académica.

A todos mis amigos que estuvieron junto a mí, durante toda la carrera y parte de ella.

Finalmente gracias a todos los que creyeron en mí.

Gabriel.

## INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1. OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
2.1.    Especie de estudio.....	7
2.2.    Obtención del material y establecimiento del cultivo.....	7
2.3.    Monitoreo de crecimiento.....	8
2.4.    Análisis de datos.....	9
2.4.1.    Análisis de normalidad.....	9
2.4.2.    Análisis T-Student.....	9
2.4.3.    Modelo lineal.....	9
2.4.4.    Curvas de sobrevivencia.....	10
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	11
3.1.    Monitoreo de crecimiento.....	12
3.2.    Tasa de crecimiento y crecimiento <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> .....	13
3.3.    Factores que determinan la sobrevivencia.....	14
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto de la proveniencia y la cantidad de brotes sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento <i>in vitro</i> .....	12
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la proveniencia y el tamaño inicial sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento <i>ex vitro</i> .....	14

## RESUMEN EJECUTIVO

El uso de herramientas biotecnológicas como la micropropagación *in vitro*, se constituye una alternativa de reproducción de especies amenazadas y con tamaños poblacionales reducidos. Sin embargo, uno de los problemas en el uso de la micropropagación como herramienta de reproducción es la calidad de las plántulas resultantes en cuanto a su crecimiento y vigor. En el presente trabajo se evalúa efectos de la micropropagación sobre patrones de crecimiento y sobrevivencia de plántulas *in vitro* de *Cinchona officinalis* L., una especie que ha sido fuertemente impactada por procesos de tala dentro de bosques naturales durante la época de la colonia. Se realizó un monitoreo total de 120 plántulas *in vitro* y 1988 plántulas *ex vitro* por 8 meses a partir del último repique. Adicionalmente, en cada plántula se contabilizó la cantidad de nuevos brotes axilares. Los resultados obtenidos mostraron un efecto remanente de procesos de micropropagación, los cuales inicialmente inciden en cantidad de brotes de las plántulas y en el crecimiento; sin embargo, este efecto no influye de forma negativa en la sobrevivencia de las plántulas durante la fase *ex vitro*.

**PALABRAS CLAVES:** efectos micropropagación, especies forestales, sobrevivencia de plántulas



## ABSTRACT

The use of biotechnological tools such as micropropagation constitutes an alternative to reproduction of endangered species and with small population sizes. However, one of the critical issues in the use of micropropagation as a reproduction tool is the quality of seedlings with regard to growth and vigor. In this paper we evaluated the effects of micropropagation on patterns of growth and survival of *in vitro* seedlings of *Cinchona officinalis* L. This species has been heavily impacted by logging processes in natural forests during colonial times because of their medical use. We monitored during 8 months after the last peel a total of 120 *in vitro* and 1988 *ex vitro* seedlings. Additionally, we measured in each seedling the number of axillary buds. The results showed that there is a residual effect of micropropagation process, which initially affects the number of shoots of seedlings and growth. However, this effect had a negative influence on seedling survival during *ex vitro* phase.

**KEYWORDS:** conservation, forest species, *in vitro* cultivation, micropropagation effects, seedling survival

## INTRODUCCIÓN

El presente estudio es acerca de patrones de crecimiento y mortandad, en dos fases: *in vitro* y aclimatación de poblaciones de plántulas de proveniencia migropropagadas y semillas de *Cinchona officinalis*, permitiéndonos diferenciar el comportamiento de dicha especie.

El trabajo está dividido en tres capítulos. El primero es el Marco teórico, en el cual se explican los fundamentos en los cuales se basó la investigación. En el segundo se explica la metodología aplicada, que constó de 2 fases como son: *in vitro* y *ex vitro*. Finalmente en el último damos a conocer los resultados de ambas fases de nuestra especie estudia *Cinchona Officinalis*.

Los bosques de montaña montanos representan uno de los ecosistemas más diversos del mundo (Myers *et al.*, 2000). A pesar de esta elevada diversidad, los bosques de montaña enfrentan una acelerada pérdida de hábitat provocada por la actividad humana (Dinerstein *et al.*, 1995; Myers, 1986). Existen pocos estudios que evalúan los efectos de la pérdida del hábitat sobre especies amenazadas, no obstante muchas especies de distribución restringida como *Cinchona officinalis* (Linnaeus, Carl von) podrían haber perdido alrededor del 60% de su distribución potencial (Espinosa, et al.).

En el presente trabajo se evalúa los efectos de la micropropagación sobre los patrones de crecimiento y sobrevivencia de plántulas *in vitro* de *Cinchona officinalis*, una especie que se encuentra fuertemente amenazada y para la cual los procesos de micropropagación pueden convertirse en una herramienta importante de restauración de poblaciones.

Específicamente interesa responder las siguientes preguntas; i. Las plántulas que han pasado por procesos de micropropagación poseen mayor potencial de brotación que el material no micropropagado? ii. La tasa de crecimiento y el crecimiento total de los individuos están influidos por el potencial de brotación? iii. La probabilidad de supervivencia de las plántulas es dependiente de la micropropagación y está afectada por las características de tamaño de la plántula?, esta investigación se lo realizó en los laboratorios del Departamento de Ciencias Naturales de la UTPL. Para el cumplimiento se dividió en dos fases: cultivo *in vitro* y aclimatación siguiendo protocolos establecidos para la optimización del material vegetal.

## **CAPITULO 1. OBJETIVOS**

**Específicamente nos interesa responder las siguientes preguntas:**

- i. Las plántulas que han sufrido procesos de micropropagación poseen un mayor potencial de brotación que el material no micropropagado?
  
- ii. La tasa de crecimiento y el crecimiento total de los individuos están influidos por el potencial de brotación?
  
- iii. La probabilidad de supervivencia de las plántulas es dependiente de la micropropagación y está afectada por las características de tamaño de la plántula?

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Especie de estudio.

*Cinchona officinalis* habita las estribaciones de Los Andes desde los 2300 hasta los 3100 m.s.n.m (Garmendia, 2005), y es endémica del valle de Loja, sur del Ecuador (Anderson, 1998; Garmendia, 2005). *C. officinalis* enfrentó una reducción significativa en el tamaño de la población durante la época de la colonia y posteriormente durante la segunda guerra mundial, lo cual ha puesto la especie al límite de su desaparición (Madsen, 2002; Espinosa *et al.*). Las poblaciones cercanas a la ciudad de Loja fueron particularmente afectadas, los mercados europeos de cascarilla durante 1640-1776 (el comienzo de su explotación) se suministraron casi exclusivamente con las poblaciones de los alrededores de esta ciudad (Madsen, 2002). Hoy en día la pérdida de hábitat y la fragmentación de las pocas poblaciones remanentes colocan a la especie en un estado crítico de conservación (Espinosa *et al.*).

Algunos estudios han mostrado que la capacidad de germinación y regeneración bajo condiciones naturales es reducida o deficiente, encontrándose únicamente en lugares donde existe la asociación o crecimiento con otro tipo de especies (Aguirre *et al.*, 2002; Pérez, 1998) y generalmente se da a partir de rebrotes de plantas que están creciendo en sitios bastante inclinados donde la vegetación está menos alterada (Aguirre *et al.*, 2002).

## 2.2. Obtención del material y establecimiento del cultivo.

La introducción *in vitro* se la realizó a partir de semillas recolectadas en la parroquia San Pedro de Vilcabamba (Cerro Aguarango), Loja, Ecuador. En este sector específicamente en el cerro Aguarango, en la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Podocarpus se encuentra una población remanente de *C. officinalis*. Las semillas colectadas pasaron por un protocolo de desinfección, el cual consiste en lavar las semillas con agua destilada, desinfectar con alcohol al 70% por un minuto y finalmente enjuagar con agua destilada (Willan, 1991).

Las semillas desinfectadas fueron sembradas *in vitro*, en medio nutricional Gamborg (B5) (1968) al 50%, el cual se ha utilizado en el cultivo *C. officinalis* y *C. pubescens Vahl, Martin (Henrichsen)* (Schripsema *et al.*, 1999; Ramos- Valdivia *et al.*, 1997). Adicional al medio Gamborg se agregaron 7gr/l agar y 10 gr/l sacarosa. Una vez homogenizado el medio de cultivo se ajustó a un pH de  $5.8 \pm 0.02$ , pHs más básicos o ácidos puede frenar el crecimiento y desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990). Cuando las semillas germinadas alcanzaron una edad 2 meses se dividieron dos lotes de

plántulas. El primer lote se mantuvo bajo condiciones de cultivo *in vitro* para su desarrollo y el segundo lote se utilizó en un proceso de micropropagación. El protocolo de micropropagación consistió en una combinación de 0.5 mg/l de BAP (bencilaminopurina) y 0.1 mg/l de ANA (ácido naftaleno acético) según lo propuesto por Armijos (Armijos, no publ.).

A los 12 meses de edad de las plántulas y una vez que uno de los lotes fue sometido a dos ciclos de micropropagación, las plántulas de los dos lotes fueron repicadas a frascos esterilizados con un medio de cultivo B5 al 50% sin reguladores de crecimiento. En cada frasco se sembraron 4 segmentos de tamaños que oscilaban entre 1 cm y 3 cm de tamaño. El material fue mantenido en una cámara de crecimiento, las condiciones de cultivo se mantuvieron en 23° C con fotoperíodo de 12 h/ luz – 12h/ oscuridad (Pierik, 1990).

### **2.3. Monitoreo de crecimiento.**

Una vez culminada la fase de micropropagación y repicadas las plántulas de las dos proveniencias se inició la fase de desarrollo de plántulas. A partir del mes de crecimiento de los segmentos nodales se marcaron 15 frascos provenientes de material micropropagado y 15 frascos de material proveniente de semillas, en total se monitorearon 120 plántulas en laboratorio. Durante 4 meses entre junio y octubre del 2011 durante la fase de crecimiento se monitorizó mensualmente los frascos marcados, en cada individuo se evaluaron: los brotes iniciales (al iniciar el monitoreo), incremento de brotes (brotes incrementales) y crecimiento en altura de las plántulas (mm).

Cuando las plántulas repicadas alcanzaron los 4 meses de edad se inició la fase de aclimatación. Las plántulas de *C. officinalis* fueron sembradas en macetas con un sustrato compuesto por: cascarilla de arroz (25%), turba (25%) y humus (50%). El sustrato fue esterilizado utilizando fungicida comercial vitavax en una concentración de 1gr/l para evitar contaminación fúngica (Sanchez y Arguedas, 1997). Las plántulas se trasplantaron en macetas plásticas de 17 onzas con agujeros laterales para la respiración y para drenar el agua. Se colocó 6 cm de sustrato húmedo y se trasplanto 4 plántulas por maceta, los tamaños iniciales de las plántulas en condiciones *ex vitro* oscilaban de 3 cm a 10 cm. Las plántulas en aclimatación fueron colocadas en un cuarto con ambiente controlado a una temperatura de 23°C, con fotoperíodo de 12h/ luz – 12h/ oscuridad (Pierik, 1990).

Durante las 2 primeras semanas las plántulas en su recipiente se mantuvieron cubiertas con tapas para evitar estrés hídrico. El riego se mantuvo constante cada 3 días. Durante los meses de marzo y abril, cada 15 días las plántulas fueron fertilizadas utilizando 1gr/l de VITAFOL con concentraciones 30.10.10 (nitrógeno, fósforo, potasio, respectivamente). Se monitoreó mensualmente el crecimiento en altura (mm) y mortandad durante 4 meses entre diciembre y abril del 2011. En total se monitoreo en invernadero 1988 plántulas de las dos proveniencias micropropagadas y de semillas.

## **2.4. Análisis de datos.**

### **2.4.1. Análisis de normalidad.**

Se hizo un análisis de normalidad para evaluar el tipo de distribución de las variables de respuesta. Utilizamos la prueba de ajuste de Kolmogorov-Smirnov (KS), con el fin de determinar el ajuste de nuestros datos a la distribución normal, lognormal o de poisson. Si el ajuste era significativo para más de una distribución usamos el criterio de Akaike (AIC) para determinar el mejor ajuste.

### **2.4.2. Análisis T-Student.**

Para determinar si existen diferencias significativas en la cantidad de brotes iniciales, brotes incrementales y brotes totales entre proveniencias (semillas-micropropagadas) se utilizó el análisis de T-Student. Este análisis compara las medias y las desviaciones estándar para definir si las diferencias son estadísticamente significativas (Clifford y Taylor, 2008).

### **2.4.3. Modelo lineal.**

Se utilizó un modelo lineal (LM) para evaluar si el crecimiento y tasa de crecimiento in vitro están influidos por proveniencia de plántulas y los brotes. Para evaluar si el crecimiento y tasa de crecimiento *ex vitro* están influenciados por tamaño inicial y la proveniencia de semillas utilizamos un modelo lineal (LM). Los análisis fueron implementados en el entorno R (R Development Core Team, 2014). El crecimiento fue medido como el valor total en mm de la diferencia entre el tamaño inicial y final de las



plántulas. La tasa de crecimiento de las plántulas fue calculada como la pendiente de la regresión lineal de los cuatro periodos de crecimiento de las plántulas.

#### **2.4.4. Curvas de sobrevivencia.**

Se desarrollaron curvas de sobrevivencia para cada proveniencia mediante el método de Kaplan Meier y evaluamos si las curvas de las plántulas provenientes de semillas o micropropagadas eran significativamente diferentes, los análisis fueron realizados mediante el uso de la función `survdiff` implementada en el paquete `Survival` del entorno R (Harrington y Fleming, 1982). La función `survdiff` permite efectuar contrastes de hipótesis para verificar la igualdad o diferencia de dos o más curvas de sobrevivencias, basado en las familias de pruebas G-rho propuesto por Harrington y Fleming (1982). Adicionalmente, utilizamos el análisis de Coxh para determinar si las covariables de tamaño de plántula influyen en la mortandad de las plántulas.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS**

### 3.1. Monitoreo de crecimiento.

El monitorización se desarrolló durante 8 meses entre julio del 2011 a abril del 2012, esta actividad incluyó 4 meses de seguimiento *in vitro* (de julio a octubre) y 4 meses *ex vitro* (de noviembre a febrero). Durante la fase *ex vitro* se contabilizaron 732 plántulas provenientes de la micropropagación y 1256 provenientes de semillas.

Durante la etapa *in vitro* las plántulas provenientes de semillas crecieron a una tasa promedio (rango) de 5.06 mm (1.09 - 16.06 mm) menor a lo registrado para las plántulas que se obtuvieron de material micropropagado con 6.2 mm (1.46 - 15.06 mm). Mientras que el crecimiento promedio para las plántulas obtenidas de semillas fue de 22.3 (5.1 - 62 mm) menor comparado con las plántulas de material micropropagado que mostró una tasa promedio de 24 mm (6.3 - 52.6).

El incremento de brotes axilares también fue dependiente de la procedencia, las plántulas provenientes de semillas tuvieron un valor promedio de 5 brotes (rango entre 0 y 16), menor al encontrado en las plántulas micropropagadas con un valor promedio de 7 brotes (rango entre 0 y 16 brotes).

En la etapa *ex vitro* las plántulas provenientes de semillas crecieron a una tasa promedio (rango) de 7.6 mm (1.65 - 19.6 mm) menor a lo registrado en plántulas micropropagadas con un promedio de 5.6 mm (1.3-12.4 mm). El crecimiento promedio para las plántulas provenientes de semillas fue de 26.3 mm (7.5 - 60.5 mm) mayor en plántulas micropropagadas con un valor de 20.5 mm (6.8 - 40.5 mm).

**Tabla 1. Efecto de la procedencia y la cantidad de brotes sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento *in vitro*.**

	Crecimiento		Tasa de Crecimiento	
	Estimador	P valor	Estimador	P valor
<b>Intercepto</b>	39.329	***	10.614	***
<b>Brotes Iniciales</b>	-1.679	***	-0.5005	***
<b>Semillas</b>	-23.542	***	-5.716	**
<b>B. Iniciales x Semillas</b>	2.404	***	0.5793	**

La significancia de las variables dentro del modelo lineal se muestra como: \*\*\* para P valores <0.001, \*\*>0.01, \*0.05.

Los resultados muestran que existe una diferencia significativa en el potencial de brotación entre el material proveniente de semilla y el material micropropagado. La cantidad de brotes incrementa de las plántulas provenientes de semillas según el análisis t-student son significativamente menores (*P*-valor 0.022) que lo encontrado en las plántulas micropropagadas.

### **3.2 Tasa de crecimiento y crecimiento *in vitro* y *ex vitro*.**

Los resultados de los modelos lineales muestran un efecto significativamente negativo de los brotes iniciales sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento de las plántulas. Las plántulas con menor cantidad de brotes iniciales tienen un crecimiento y una tasa de crecimiento mayor a las plántulas con mayor número de brotes. La procedencia de las plántulas afectó significativamente al crecimiento, en donde registró una menor tasa de crecimiento de las plántulas provenientes de semillas.

La interacción entre brotes y procedencia afecta significativamente la brotación y el crecimiento según los modelos lineales. En las plántulas provenientes de semillas, las plántulas con mayor brotación tienen también un mayor crecimiento (Tabla 1).

La procedencia demostró afectar significativamente tanto el crecimiento como la tasa de crecimiento bajo condiciones *ex vitro*, de acuerdo con los modelos lineales utilizados. Las plántulas procedentes de semillas tienen un mayor crecimiento y una mayor tasa de crecimiento. La interacción entre tamaño inicial y la procedencia tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento, en el caso de las plántulas provenientes de semillas existe una relación negativa entre tamaño inicial y crecimiento, lo cual implica que las plántulas provenientes de semillas con menor tamaño inicial tienen un crecimiento mayor y más acelerado (Tabla 2).

**Tabla 2. Efecto de la proveniencia y el tamaño inicial sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento *ex vitro*.**

	Crecimiento		Tasa de Crecimiento	
	Estimador	P valor	Estimador	P valor
<b>Intercepto</b>	17.45	***	4.86	***
<b>Tamaño Inicial</b>	0.09		0.02	
<b>Semillas</b>	13.54	***	4.28	***
<b>T. Inicial x Semillas</b>	-0.19	**	-0.05	*

La significancia de las variables dentro del modelo lineal se muestra como: \*\*\* para P valores <0.001, \*\*>0.01, \*0.05.

### 3.3 Factores que determinan la sobrevivencia.

Los análisis de supervivencia no mostraron diferencias significativas en la supervivencia de plántulas entre las dos proveniencias (*P-valor*=0.948) por lo cual rechazamos la hipótesis nula que la probabilidad de supervivencia de las plántulas es dependiente de la proveniencia.

Según el análisis de Coxh (*Coeficiente* -0.04; *P-valor*= 0.058) las plántulas con mayor tamaño, al inicio del proceso de aclimatación, tienen una tasa de sobrevivencia mayor en comparación con las plántulas más pequeñas que igualmente iniciaron la fase de aclimatación siendo más pequeñas.

## DISCUSIÓN

Varios estudios muestran que las plántulas obtenidas a partir de procesos de micropropagación pueden mostrar efectos residuales de los reguladores de crecimiento (Ej. Soares *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2010; Jacyna y Barnard, 2008) en estos estudios se han evidenciado efectos en la etiolación, formación de brotes y la pérdida de dominancia apical. Los resultados del presente estudio corroboran lo indicado por Soares *et al.* (2011); Souza *et al.* (2010); Jacyna y Barnard (2008) y se demuestra que las plántulas micropropagadas tienen una mayor producción de brotes y reducen la dominancia apical durante la fase *in vitro*.

Souza *et al.* (2010) reporta que la BAP es la citoquinina que mayor efecto residual tiene en el proceso de micropropagación de *Hancornia speciosa*, con una producción de brotes 5 veces mayor; en el caso de *C. officinalis* se encontró una menor diferencia entre las plántulas inducidas y el control (plantas generadas a partir de semillas); sin embargo, las diferencias encontradas podrían ser atribuibles a efectos residuales de la BAP, en concordancia con lo encontrado por Souza *et al.* (2010).

Los efectos residuales mostrados podrían estar afectando el potencial de crecimiento de las plántulas. En donde, las plántulas que tuvieron un mayor número de brotes iniciales demostraron un menor crecimiento, algunos autores plantean que la formación de brotes afectaría al crecimiento de las mismas (Kubota *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados muestran efectos diferentes entre las plántulas provenientes de semillas y micropropagadas. En el caso de las primeras tuvieron una relación directa entre número de brotes y crecimiento; es posible que en el caso de estas plántulas el número de brotes esté directamente relacionado con el vigor, de esta manera plántulas más vigorosas tienen un mayor número de brotes y un mayor crecimiento esta respuesta ha sido observada normalmente en otras especies de árboles (Zaidman *et al.*, 2010) donde el vigor de las plántulas está directamente relacionado con el crecimiento y el incremento del área foliar .

Durante la fase *ex vitro* se pudo evidenciar un cambio en el patrón de crecimiento; así las plántulas provenientes de semillas tuvieron un mayor crecimiento que las plántulas micropropagadas. Varios estudios han mostrado que el cultivo *in vitro* genera cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas (Buddenford-Joosten y Woltering, 1994; Kozai *et al.*, 1992; Zárate *et al.*, 1988). Estas modificaciones podrían alterar las respuestas de las plántulas, de esta forma es posible que los efectos

residuales de los reguladores de crecimiento en el caso de las plántulas micropropagadas ya no actúen durante la fase de aclimatación.

Los resultados muestran que en el caso de las plántulas provenientes de semillas, el tamaño inicial en la etapa de aclimatación tuvo un efecto sobre el crecimiento; esto coincide con lo encontrado por Atarés (2010), quien plantea que el estrés en plántulas de menor tamaño en condiciones *in vitro* a *ex vitro* implica un coste energético que supone un menor crecimiento en etapa inicial de la aclimatación.

Las plántulas al pasar de fase *in vitro* a fase de aclimatación *ex vitro* necesitan adaptarse a nuevas condiciones. Las plántulas que han crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada, generalmente tienen estomas no completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, son poco eficientes para evitar la desecación provocar una disminución de la sobrevivencia (Castillo, 2004). Bajo estos parámetros la aclimatación de las plantas de condiciones *in vitro* a condiciones de invernadero es lo que realmente determina la sobrevivencia; en este sentido la procedencia de las plántulas no afecta significativamente la sobrevivencia.

El tamaño de las plántulas durante el proceso de aclimatación es fundamental para su desarrollo y sobrevivencia (Amancio *et al.*, 1999). Las plántulas de mayor tamaño tienen la ventaja de captar de mejor manera la energía mediante el proceso fotosintético y obtener los nutrientes del medio a través de las raíces, lo cual estimula el crecimiento y desarrollo (Cáceres, 2004). En el caso de *C. officinalis* el tamaño inicial de aclimatación tuvo un efecto negativo sobre la sobrevivencia de las plántulas procedentes de semillas, a pesar de contar con plántulas de tamaños homogéneos en la etapa de aclimatación, con una diferencia de 1.5 cm entre el primero y tercer cuarto, y mostrar una reducida heterogeneidad del tamaño inicial de plántulas.

## CONCLUSIONES

En conclusión, el trabajo muestra que existen diferencias en las respuestas de las plántulas micropropagadas, posiblemente debido a efectos residuales de los reguladores de crecimiento utilizados en la micropropagación de *C. officinalis*; sin embargo, este efecto es evidente sobre todo durante la fase *in vitro*, ya que se incrementa la tasa de producción de brotes y el crecimiento de las plántulas micropropagadas. En esta fase el potencial de brotación se relacionó indirectamente con el crecimiento de las plántulas. Durante la fase *ex vitro* este patrón se invierte y las plántulas provenientes de semillas muestran tener un mayor crecimiento que las plántulas micropropagadas. Finalmente, aunque la proveniencia afecta algunos procesos morfo-fisiológicos de la planta, crecimiento y brotación, no se observó que estos efectos modifiquen la sobrevivencia de las plántulas en la fase *ex vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que aunque existen efectos residuales de los procesos de micropropagación, estos no afectan significativamente el desempeño de las plántulas por lo cual se considera que se podría utilizar esta técnica para la reproducción de esta especie.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E., & Balslev, H. (2002). Botánica Austroecuatoriana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. (Q. Ediciones Abya-Yala, Ed.)
- Amanacio, S., Rebordao, J., & Aves, M. (1999). Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Anderson, L. (1998). A revision of the genus *Cinchona* (*Rubiaceae-Cinchonae*). (M. o. Garden, Ed.) New York.
- Ascon Bieto, J., & Talon, M. (1993). Fisiología y bioquímica vegetal (Primera ed.). (Interamericana-McGraw-Hill, Ed.) Madrid, España.
- Atares, A. (2010). El cultivo *in vitro* de las plantas: ventajas y aplicaciones. Jornadas de Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Brainerd, K., & Fuchigami, L. (1982). Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO<sub>2</sub>. (*J. o. Botany*, Ed.)
- Buddenford-Joosten, J., & Woltering, E. (1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. (P. G. Reg, Ed.)
- Cáceres, K. (2004). Propagación *in vitro* de los porta injertos de cerezo (*Prunus avium* L.) y *Prunus cerasus*. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. (F. d. Agronomía, Ed.)
- Castillo, A. (s.f.). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. (INIA, Ed.) Uruguay.
- Clifford, B., & Taylor, A. (2008). Bioestadística (317 ed.). Mexico: Editorial Pearson Educación.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graman, D., Webster, A., Bookbinder, M., & Ledec, A. (1995). Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean. (W. Bank, Ed.)
- Engels, J. (2003). Plant genetic resources management and conservation strategies: problems and progress. (A. Hortícola, Ed.)
- Garmendia, A. (2005). El árbol de la Quina (*Cinchona sp*) Distribución Caracterización de su hábitat y Arquitectura (Primera ed.). Loja, Ecuador: UTPL.
- Harrington, DP; Fleming, TR;. (1982). A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika* 69.
- Hartmann, H., & Kester, D. (1995). Propagación de plantas, principios y prácticas (Vol. I). (Continental, Ed.) Mexico.

- Holdgate, D., & Zandvoort, E. (1992). Automated micropropagation and the application of a laser beam for cutting. (K. A. Dordrecht, Ed.)
- Jacyna, T., & Barnard, J. (2008). Modification of Branching Behavior in Apical-Dominant Apple Trees with Plant Growth Regulators and Their Residual Effects on Tree Growth After Transplanting. (J. o. Society, Ed.) (62), 160–172.
- Kozai, T., Fujiwara, M., Hayashi, M., & Aitken Chritie, J. (1992). The *in vitro* environment and its control in micropropagation. Kluwer Academic Publisher Dordrecht.
- Kubota, C., Ezawa, M., Kozai, T., & Wilson, S. (s.f.). *In situ* estimation of carbon balance of *in vitro* sweet potato and tomato plantlets cultured with varying initial sucrose concentrations in the medium. (J. o. Science, Ed.) (127), 963–970.
- Lara, A., Valverde, R., Gomez, L., & Hidalgo, N. (2003). Micropropagación de la Planta Medicinal *Psychotria acuminata*. (R. d. Caribe, Ed.) San Jose, Costa Rica.
- Lomax, T., Muday, G., & Rubery, P. (1995). Auxin transport (Davies PJ, ed. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer ed.).
- Madsen, J. (2002). Historia cultural de la cascarilla de loja. En: Aguirre Z, Madsen JE, Cotton E, Balslev H (eds.) Botánica Austroecuatoriana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. (Q. Ediciones ABya-Yala, Ed.)
- McCauley, D. (1995). Effects of population dynamics on genetics in mosaic landscapes 178–198 in Hansson L, Famgh L, and Merriam G, editors. Mosaic landscape and ecological processes. Chapman & Hall. London.
- Morocho, D., & Romero, J. (2003). Bosques del sur. El estado de 12 remanentes de bosques andinos de la provincia de Loja. Loja, Ecuador: Fundación Arcoiris/PROBONA.
- Muñoz de Malajovich MA. (2006). Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes.
- Myers, N., Mittermaeier, R., Mittermaeier, C., Fonseca, G., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspot for conservation priorities.
- Myers, N. (1986). Tropical deforestation and megamega-extinction (En: Soulé ME. (ed) ed.). Sinauer Associates, Sunderland and diversity.
- Nason, J., & Hamrick, J. (1997). Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees (Vol. 88). (J. o. Heredity, Ed.)
- Perez, L. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. GEO. Santa Clara, Cuba. Aguirre Z., Madsen JE, Cotton E, y Balslev H (Eds.) 2002. Botánica Austroecuatoriana: Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chi. (A. Yala, Ed.) Quito.

- Pierik. (1990). Cultivo *in vitro* de Plantas Superiores. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Austria.
- Rai , M., Shekhawat , N., Harish , A., Gupta, k., Phulwaria, M., Ram, K., y otros. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress (176 ed.).
- Schripsema , J., Ramos-Valdivia , A., & Verpoorte , R. (1999). Robusta quinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona* robusta suspensión. (Phytochemistry, Ed.)
- Sierra, R. (1999). Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. (P. I. EcocCiencia., Ed.) Quito, Ecuador.
- Soares, F., Paiva, R., Alvarenga, A., Nery , F., Vargas , D., & Silva, D. (2011). Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. Ciência e Agrotecnologia,.
- Souza, F., Canto, A., & Costa, M. (2010). Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. (R. B. Fruticultura, Ed.) (32), 612-617.
- Templeton , A., Shaw, K., Routman, E., & Davis, S. (1990). The genetic consequences of habitat fragmentation. (A. o. Garden, Ed.)
- William , R. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Depósito de documentos de la FAO. Producido por Departamentos de Montes. (P. p. Departamentos, Ed.) Roma.
- Young, A., & Merriam , H. (1993). The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh (sugar maple) populations (Vol. 71). (Heredity, Ed.)
- Zaidman , B., Ghanim, M., & Vaknin , Y. (2010). Effect of seed weight on seed vigour and early seedling growth of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. Seed Science and Technology (tres ed.).
- Zárate , D., Arce, M., Solano, P., Gutiérrez, M., Domínguez, L., & Chávez, M. (1988). Inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes foliares del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) híbrido Blazer (Onceava ed.). (F. Mexicana, Ed.) Mexico.