



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

Escuela de Ciencias Biológicas y Ambientales

**MODIFICACIÓN DE NUTRIENTES Y AGENTES
OSMÓTICOS SOBRE LA LIMITACIÓN DEL
CRECIMIENTO *In vitro* DE *Cinchona officinalis*, L.:
COMO HERRAMIENTA DE CONSERVACIÓN**

*Tesis previa a la obtención del título de
Ingeniera en Gestión Ambiental*

Autor

Adriana Patricia Santos Díaz

Director

Ing. Rosa Armijos González

Loja – Ecuador

2011

CERTIFICACIÓN

Ingeniera

Rosa Armijos González

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Adriana Patricia Santos Díaz, previo a la obtención del título de INGENIERA EN GESTIÓN AMBIENTAL, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 05 de Septiembre de 2011

.....
Ing. Rosa Armijos González
DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

La investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones de la presente tesis son de exclusiva responsabilidad del autor.

Adriana Patricia Santos Díaz

DEDICATORIA

A Dios, por ser el que me enseñó el camino del bien y por permitirme hallar en mí las fuerzas para seguir adelante en este estrecho camino.

Con profundo amor y agradecimiento a mis padres Fredy Santos y Lida Díaz, que me dieron el regalo más lindo, que fue mi educación, por su amor, consejos y apoyo incondicional, siendo las personas principales en la transmisión de valores morales y el sentido espiritual y a su vez el motor que pone en marcha mi vida.

A mis hermanas/(os) Stefany, Soledad, Fredy, Leonardo y a mi sobrina Milagros quienes me ayudaron en todo momento aunque son menores pero cada día y en pequeños detalles me han enseñado a ver la vida de otra manera. A Roberth quien con su gran cariño me acompañó en cada paso en silencio con una comprensión a prueba de todo.

A mis Abuelitos Mariana y Arturo, quienes con sus bendiciones y sabios consejos me ayudaron a encontrar la verdad en la oscuridad.

Y a toda mi familia, por contagiar de alegría mi vida y por acompañarme en cada uno de mis locuras que he emprendido hasta hoy, sin su apoyo y cariño nunca hubiera llegado a culminar esta fase de mi vida.

A todos ustedes *Dios les pague* los llevaré siempre en mi corazón...

¡Los Amo!

Adriana Santos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja, a mis profesores y más personal perteneciente a la Institución por sus valiosas enseñanzas y su continuo apoyo.

A la Escuela de Ciencias Ambientales y Biológicas por todos sus enseñanzas brindadas.

A la Ingeniera Rosa Armijos González, Directora de tesis, quien con su paciencia y orientación ha entregado su aporte para la realización de mi tesis.

Al Blgo. Máximo Moreira y a las Ingenieras Augusta Cueva, Elizabeth Gusmán, por su apoyo incondicional en la realización de mi tesis.

A la Unidad de Fisiología Vegetal por los conocimientos adquiridos y por el apoyo para que mi trabajo se lleve a cabo. En especial a mis amigos Iván y Silvia, por su apoyo, consejos que me ofrecieron para seguir adelante con la realización de mi trabajo.

Y a todas las personas que me acompañaron y colaboraron en la culminación de mis estudios, nos los menciono porque son muchas, pero todos sus nombres los guardaré en mi corazón a todos Ustedes.

¡Gracias!

Adriana Santos

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Adriana Patricia Santos Díaz declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 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 las investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico, o institucional (operativo) de la Universidad”.

Adriana P. Santos Díaz
AUTORA

Ing. Rosa Armijos González
DIRECTOR DE TESIS

ÍNDICE

Índice de contenidos

Pág.

CERTIFICACIÓN	I
AUTORÍA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS	V
INDICE	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
METODOLOGÍA	8
RESULTADOS Y DISCUSIONES	11
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos y concentraciones de medios de cultivo en MS y B5	8
Tabla 2. Diferentes tipos y concentraciones de agentes osmóticos en medio B5	8
Tabla 3. Síntomas visibles de las alteraciones nutricionales	9
Tabla 4. Evaluación de los efectos en los explantes por la modificación de nutrientes en medios B5 – MS a los 3 y 12 meses de cultivo	11
Tabla 5. Efecto en el crecimiento y organogénesis con agentes osmóticos en medio B5 en 3 y 12 meses de cultivo	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>C. officinalis</i>	3
Figura 2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> en de MS 100% presencia de mayor brotación y explante muertos (12 meses)	13
Figura 3. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> con 80g/l de sacarosa a los 12 meses de cultivo	16
Figura 4. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> con 80g/l de sorbitol a los 12 meses de conservación	17
Figura 5. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> con 80g/l manitol a los 3 meses de conservación	18
Figura 6. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> a 80g/L de manitol provocó la muerte de las plantas a los 12 meses de cultivo ..	19
Figura 7. <i>C. officinalis</i> a 12 meses de cultivo a) Mayor presencia de raíces en 80 g/l de sacarosa b) Menor presencia de raíces en 80 g/l de sorbitol c) No se evidencio presencia de raíces en tratamientos con manitol	20

RESUMEN

La principal amenaza que ha sufrido la *Cinchona officinalis* (Rubiaceae), ha sido la explotación exagerada de los árboles para la obtención de la corteza en el siglo XVII, sacrificando la mayoría de arboles adultos, además la modificación del hábitat han influyendo sobre la recuperación natural de esta especie y otras del género, catalogándolas en algún grado de amenaza. Por tal razón es necesario aplicar herramientas de conservación ya sea a nivel *in situ* o *ex situ*, que permitan su permanencia a largo plazo, como la conservación *in vitro* que mantiene germoplasma viable por un largo periodo con una tasa metabólica reducida, al modificar las condiciones del cultivo. Por tal motivo el objetivo del presente fue analizar la influencia de la modificación de nutrientes y la presencia de agentes osmóticos sobre la limitación del crecimiento *in vitro* de explantes de *C. officinalis*.

Se partió de plántulas germinadas *in vitro*, que fueron cultivadas para evaluar dos diseños diferentes con el propósito de limitar el crecimiento de los explantes, el primero se modificó las concentraciones en los medios MS (1962) y B5 (1968), y el segundo únicamente en medio B5 se combinó con diferentes fuentes de carbono que actúan como agentes osmóticos, en ambos casos para evaluar la viabilidad de los tejidos por un largo plazo se tomó en cuenta la evaluación conjunta en la formación de órganos y otros parámetros morfológicos.

Se determinó que los tratamientos B5 al 100% y MS al 25 y 50%, y por los agentes osmóticos sorbitol 20-40 g/l y manitol 20 g/l mantuvieron limitado el crecimiento (altura, brotes, raíces) y baja mortalidad, y con un mayor porcentaje de plantas sanas y viables. En ambos casos al disminuir los nutrientes o adicionar agentes osmóticos es necesario transplantar las plántulas a un medio fresco entre lapsos de tiempo que van desde los 9 -12 meses para poderlas recuperar.

Palabras clave: *Cinchona officinalis*, crecimiento mínimo, nutrientes y agentes osmóticos.

ABSTRACT

The main threat has suffered the *Cinchona officinalis* (Rubiaceae), has been overexploitation of trees for the bark in the seventeenth century, sacrificing most of adult trees, habitat modification also have influenced the natural recovery of this species and others of the genre, cataloging some degree of threat. For this reason it is necessary to implement conservation tools at either *in situ* or *ex situ*, allowing their long-term survival, such as conservation *in vitro* germplasm maintains viable for a long period with a reduced metabolic rate, by modifying the conditions the culture. Therefore the objective of this study was to analyze the influence of nutrients and osmotic agents on the limitation of growth of *C. officinalis* explants.

We beginning with seedlings germinated *in vitro* these were cultured to evaluate two different designs in order to limit the growth of the explants, the first modified concentrations in MS medium (1962) and B5 (1968), and in B5 medium was combined with different carbon sources that act as osmotic agents, both to assess the viability of the tissues for a long-term evaluation took into account the joint formation of organs and other morphological parameters.

Treatments was determined that 100% B5 and MS at 25 and 50%, and osmotic agents sorbitol 20-40 g/l mannitol 20 g/l remained limited growth (height, shoots, roots) and low mortality, and with a higher percentage of healthy, viable plants. In both cases the lower nutrient or add osmotic agents are necessary to transplant the seedlings to fresh medium between time periods ranging from 9 - 12 months that they can be recovered.

Keywords: *Cinchona officinalis*, minimal growth, nutrients and osmotic agents.

INTRODUCCIÓN



Figura 1. Árbol de *C. officinalis* (Fuente: Romero, 2010)

Cinchona officinalis originaria de los bosques andinos, comúnmente llamada quina o cascarilla ha sido de gran importancia para la economía e historia de los países en los que se encuentra. La utilización primero de la corteza de la quina y posteriormente de la quinina, supuso un singular aporte del nuevo Mundo para la salud y la cultura universal (Garmendia, 2005). Siendo a inicios de siglo XVII, la corteza de algunas de las especies del género *Cinchona* el único remedio eficaz contra el paludismo que llegaron hasta Europa (Garmendia, 2005; Córdor *et-al*, 2009).

Por la importancia que tuvo ésta, Acosta Solís sugirió declarar en 1936 "Planta Nacional del Ecuador" (Anda, 2002). Actualmente quedan poblaciones pequeñas que han sobrevivido a la sobreexplotación en los cerros del Nudo de Cajanuma (Loaiza & Sánchez, 2006). La demanda por la corteza de la quina ha disminuido, por la aparición de compuestos sintéticos, sin embargo, la presión sobre los bosques en los hábitat, está influida por la agricultura migratoria y maderera, haciéndose cada vez más escasa su presencia en las zonas de distribución (Epiquién, 2009).

Es importante la aplicación de herramientas de conservación *in vitro* de tejidos vegetales de *C. officinalis* que fue considerada un aporte significativo a la farmacopea mundial y actualmente sus poblaciones son pequeñas y su regeneración natural es deficiente.

Para la conservación de germoplasma se debe considerar la naturaleza del material vegetal, que está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos. De acuerdo con estas características hay diversas alternativas de conservación, que van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reserva, que pueden dividirse en métodos *in situ* y métodos *ex situ* (Scocchi & Rey, 2007).

La conservación *in situ* se refiere a mantenerlas en los sitios donde se han desarrollado junto a su entorno (Baena *et-al*, 2003). Y la conservación *ex situ* es el mantenimiento fuera de su hábitat natural. A través de este último se puede lograr varios objetivos, siendo el más importante el de conservar muestras representativas de diversidad genética de poblaciones amenazadas como un resguardo frente a una posible extinción *in situ*. Por ello el método *ex situ*, contribuye la sobrevivencia a mediano y/o largo plazo de las especies (León *et-al*, 2008).

Mediante el método de cultivo *in vitro*, se puede realizar conservación *ex situ*, esto se logra generando cambios en el ambiente de cultivo que permite desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos (Engelmann & Takagi, 2000; Scocchi & Rey, 2007). Dependiendo de la duración del almacenamiento, este puede ser a corto, mediano o largo plazo con el objetivo de reducir la velocidad del crecimiento del material vegetal, que garantice la conservación *in vitro* (García-Águila *et-al*, 2007). El método de reducir el crecimiento o crecimiento mínimo ha sido ampliamente utilizado en la práctica para la conservación de germoplasma, con la alteración de las condiciones de cultivo (García *et-at*, 2007).

Para ello se modifican las condiciones del cultivo, entre ellas la composición del medio de cultivo, con la disminución del contenido mineral (Rayas *et-al*, 2002), la adición de agentes osmóticos y/o la incorporación de retardantes de crecimiento (Espinosa *et-al*, 2002). También la modificación del ambiente de cultivo como la iluminación,

temperatura entre otras (García-Águila *et-al*, 2007). Garantizando la conservación *in vitro* durante algunos años (Karthan en García *et-al*, 2004) o más con la crioconservación (García-Águila *et-al*, 2007). La modificación de las condiciones de cultivo influyen sobre la velocidad de la división celular, el crecimiento normal y el metabolismo, reduciendo la frecuencia de transferencia de las plantas a un medio de cultivo fresco (García-Águila *et-al*, 2007), con la finalidad de reducir en lo posible el elevado número de variables que implica estas transferencias de cultivo *in vitro* como: Riesgos de alteración genética, costos en tiempo, pérdida por accidente o contaminación de los explantes, mano de obra entre otras (Pérez, 2010).

Limitación del Crecimiento

A continuación se hace referencia a dos de los factores que influyen en la limitación del crecimiento:

Nutrientes

Los explantes cultivados *in vitro* no se comportan completamente autotróficos, el medio de cultivo proporciona agua, nutrientes, azúcares y reguladores de crecimiento (Fuentevilla, 2004). Según los requerimientos de las plantas los nutrientes han sido clasificados en macro y micro nutrientes aunque puede variar dependiendo de las diferentes especies, estos resultan indispensables al igual que el agua para el buen desarrollo de las plantas (Barceló *et-al*, 2007). Para ser considerado esencial un elemento debe tener una influencia directa sobre el metabolismo de la planta, de manera que su presencia resulte determinante para su desarrollo y no pueda ser reemplazado por otro en su acción. Los nutrientes están involucrados en diferentes procesos, como activación de enzimas, regulación del metabolismo y en los componentes estructurales, se ha demostrado que las plantas con desbalance nutricional se convierten más susceptibles a las enfermedades (Pérez *et-al*, 2003; Barceló *et-al*, 2007; Kirkby & Römheld, 2007). Una deficiencia puede desarrollarse cuando la concentración del elemento en la solución nutritiva es baja, el elemento está presente en una forma química que no puede ser utilizada por la planta. O también debido a los efectos antagónicos entre distintos elementos, produciendo una serie de

alteraciones metabólicas que pueden retrasar o incluso interrumpir los procesos de crecimiento y desarrollo (Barceló *et-al*, 2007).

Los tejidos vegetales solo crecerán *in vitro* si se suministra un medio específico que cubra sus necesidades. Tanto el tipo de medio del cultivo como los suplementos necesarios, reguladores de crecimiento o vitaminas pueden requerir un ajuste de acuerdo a la especie (Bacchetta *et-al*, 2008). El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

Para el cultivo de *C. officinalis* los medios más utilizados en cultivo *in vitro* son:

El medio Murashige and Skoog, 1962 (MS) caracterizado por un contenido elevado de nitrógeno (Badillo *et-al*, 2009) y su mezcla de sales, complementado con sacarosa, vitaminas y reguladores de crecimiento para el cultivo de distintos tipos de tejidos y células (Del Campo *et-al*, 2007), ha sido el más utilizado por Koblitz *et-al*, 1983; Parr *et-al*, 1984; Hay *et-al*, 1987; entre otros, en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*, pero en otros casos no es el mejor para el crecimiento y desarrollo, por el contenido elevado de sales (Fuentevilla, 2004). Según González, (2007) en medio MS al 100% provoca hiperhidricidad en brotes de *C. officinalis*.

Y el medio Gamborg o B5 1968 con menos concentración de sales minerales que el medio Murashige y Skoog (1962) principalmente de nitrógeno, ha sido de gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas, pero con menor frecuencia, especialmente indicado para especies leñosas (Izquierdo & Quiones, 2003). Varios autores han utilizado este medio en el cultivo de varias especies de *Cinchona* (Schripsema *et-al*, 1999; Ramos-Valdivia *et-al*, 1997; Stevens *et-al*, 1993 entre otros), y ha sido reportado en cultivo de *C. ledgeriana* ya que contiene el nivel normal de nitrato (Wijnsma *et-al*, 1986), reduciendo la vitrificación (Morales, 2003).

Estrés Osmótico

Por otro lado la limitación del crecimiento también puede ocurrir por la adición de compuestos de carbono que actúan como agentes osmóticos, como la sacarosa que es altamente metabolizable y actúa como agente osmótico en concentraciones elevadas, otros agentes no metabolizables como el manitol y sorbitol son más efectivos en la limitación del crecimiento que la sacarosa (García *et-al*, 2004), estos afectan a la planta, causando restricciones en el crecimiento (Pérez *et-al*, 2010).

La modificación o cambios en el entorno del cultivo pueden generar estrés a nivel celular, (Quiroz *et-al*, 2006). Las respuestas en condiciones de estrés dependen de respuestas bioquímicas o fisiológicas que define la capacidad de un organismo para resistir, evitar y escapar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa (Benavides, 2002). Afectando a la planta en su desarrollo normal, causando limitaciones en el crecimiento de las plantas *in vitro* (Pérez *et-al*, 2010) a causa de la concentración osmótica que está presente en el medio.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la modificación de nutrientes y agentes osmóticos sobre la limitación del crecimiento *in vitro* de tejidos de *C. officinalis* con el fin de disminuir el crecimiento de los tejidos y mantenerlos viables por un largo periodo.

METODOLOGÍA

Se partió de segmentos nodales 0.5 - 1.0 cm de plántulas geminadas *in vitro* de 4 meses de edad que fueron cultivados para evaluar dos diseños diferentes con el propósito de limitar el crecimiento de los explantes, en el primero se modificó las concentraciones en los medios MS (1962) y B5 (1968), (*Tabla 1*); y en el segundo únicamente en medio B5 se combinó con diferentes fuentes de carbono que actúan como agentes osmóticos (*Tabla 2*), todos los medios fueron ajustados el pH (5.8 ± 0.02) y esterilizados (123° C por 20 minutos). Sembrados los explantes fueron incubados a una temperatura $20-22^{\circ}$ C, con un fotoperiodo 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y una HR del 60%.

Tabla 1: Tipos y concentraciones de medios de cultivo en MS y B5.

Medio de cultivo	Concentración
	medio de cultivo (%)
B5	25
	50
	100
	25
MS	50
	100 (control)

Tabla 2: Diferentes tipos y concentraciones de agentes osmóticos en medio B5.

Agentes osmóticos	Concentración (g/l)
Manitol	20
	40
	80
Sorbitol	20
	40
	80
Sacarosa	20 (control)
	40
	80

Para todos los tratamientos se utilizaron cuatro individuos por frasco y cinco frascos por tratamiento con tres repeticiones cada uno, en total se evaluó 60 explantes/tratamientos.

Se registraron datos cada 15 días, en los distintos tratamientos hasta completar 3 meses y luego se registraron datos a los 12 meses de cultivo.

Parámetros evaluados:

1. Limitación del crecimiento:

- **Altura del explante:** Distancia desde la base hasta el extremo distal.
- **Número de brotes:** Número de brotes/explante.
- **Presencia de raíces:** enraizamiento/explante.

2. Viabilidad del explante:

- **Mortalidad:** En base a la coloración predominante del explante se asignó un color de la tabla Munsell color, (1998) y su equivalente en número, correspondiendo 1 al color característico de la planta y 6 a plantas con cambios fuertes de coloración en base a la coloración de los tejidos por la deficiencia nutricional, a continuación se detalla.

Tabla 3. Síntomas visibles de las alteraciones nutricionales

Estado		Escala de color	Color	Signo
Plantas sanas o que al cultivarlas en un medio nuevo, se recuperan.	1	5 GY 5/10	Verde característico	Presencia adecuada de nutrientes
	2	5 GY 6/8	Verde claro	Deficiencia de nitrógeno (Hernández, 2002).
	3	2,5 Y 6/8	Amarillo	Clorosis por deficiencia de varios nutrientes como: nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, hierro, zinc (Salisbury & Ross, 2000).
	4	5 R 5/6	Rojo	Acumulación de antocianinas por carencia de nitrógeno y fósforo (Hernández, 2002).
Plantas que no se recuperan al cambiarlas a un medio nuevo o plantas que están muertas.	5	7,5 YR 4/4	Café	Deficiencia de potasio, zinc, boro, calcio la cual aumenta progresivamente, alcanzando toda la lamina foliar (Martínez, 2009).
	6	10 R 3/2	Marrón	Ultimo estado de clorosis por déficit de nitrógeno, zinc, potasio, calcio, boro, cobre (Martínez, 2009).

Determinación de tonalidades en base a estudios previos en cultivo *in vitro* de *C. officinalis* (González, Jara, Armijos, datos sin publicar)

Para determinar el/los tratamientos que limitan el crecimiento y con plantas viables por un periodo de hasta 12 meses de cultivo, se evaluó conjuntamente todos los parámetros (mortalidad, formación de brotes, raíces y crecimiento longitudinal).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en Lenguaje R (GNU): 2.12.2, análisis de varianzas y mediante la prueba de Tuckey para establecer diferencias significativas, a un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organogénesis influida por la modificación de nutrientes en dos medios del cultivo

Según los resultados expuestos en la (Tabla 4), el crecimiento a los 3 meses es similar en todos los tratamientos de ambos medios, sin embargo a los 12 meses existen diferencias, siendo menor el crecimiento de los explantes en medio B5 al 25 y 100% y MS al 25%.

Tabla 4. Evaluación de los efectos en los explantes por la modificación de nutrientes en medios B5–MS a los 3 y 12 meses de cultivo.

Medio	%	Crecimiento en altura (cm)		Brotos/explante (#)		Raíces (%)		Mortalidad (%)	
		3m	12m	3m	12m	3m	12m	3m	12 m
B5	25	0.78±0.3a	1.39±0,7b	2±2.4c	5,05±1,8a	11.36±3.2ab	25±4.3c	4.54±2.1a	56.8±4.7a
	50	0.82±0.4a	1.94±0,9a	3.52± 2.2ab	6±1.9a	28.57±4.5b	66.07±4.7a	0±0b	50±4.2a
	100	0.86± 0.6a	1.68±0.7ab	4.35±1.6a	6.29±1.7a	29.41±4.6b	56.86±5.0a	0±0b	46.1±3.6a
MS	25	0.79± 0.6a	1.59±0.8ab	3.08±2.2bc	5.8±2.3a	0±0.0a	7.69±2.6c	0±0b	42.3±4.6a
	50	1.02± 0.6a	1.88±1.1ab	3.78±2.1ab	6.56±2.3a	10±3.0ab	30±4.6bc	0±0b	43.3±4.2a
	100	1.01± 0.5a	1.87± 0.5ab	4.1±2.5ab	8.3±2.9b	21.66±4.1b	51.6±5.0ab	0±0b	38.5±3.9a

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

En la formación de órganos como brotes y raíces existen diferencias significativas, en el caso de la brotación a los 12 meses es baja en casi todos los tratamientos excepto en la concentración de medio MS al 100% (Figura 2), en cuanto a la formación de raíces a los 3 meses no se presenta diferencias importantes, e incrementa notablemente a los 12 meses existiendo menor presencia de raíces en MS y B5 al 25% de su concentración. Finalmente la mortalidad de los tejidos se evidencia a los 12 meses, aunque no hay diferencias estadísticas entre tratamientos, los porcentajes de mortalidad son menores en todas las concentraciones de medio MS.

Ahora bien al considerar la mortalidad como el factor primordial para la selección del mejor tratamiento como limitante del crecimiento, el medio MS en sus diferentes concentraciones presentaron a los 3 meses 0% de mortalidad, sin embargo a los 12 meses estos presentaron porcentajes relativamente bajos, al igual que el medio B5 al 100%. Como segundo factor de selección en la formación de menor cantidad de órganos (brotes y raíces), el medio MS al 25 y 50% reduce la brotación y el enraizamiento, determinando que los medios B5 al 100% y MS al 25 y 50%, presentan una reducción en el crecimiento (altura, brotes, raíces) y baja mortalidad, sin embargo al mantenerlas por un lapso de tiempo de 12 meses puede causar daños en los tejidos como la muerte de los explantes, recomendándose cambiarlas a un medio fresco a los 9 meses; esto también fue observado por Berjak *et-al* (1996), los mismos que lograron mantener *Eucalyptus in vitro* únicamente hasta seis meses en medio MS al 25%.

Otros resultados similares demuestran la baja brotación en medios B5 de 2.4 brotes/explante a diferencia de 3.8 brotes/explante en medio MS (Armijos, datos no publicados). También el bajo crecimiento de *Cinchona spp.* con 0.4 cm en tres meses y presencia de raíces en medio B5 (Koblitz, 1983). El bajo número de brotes generados en B5 y a bajas concentraciones de MS se debe a la disminución de sales minerales principalmente de nitrógeno (Ramaje & Williams, 2002) fósforo y potasio (Pérez *et-al*, 2003).), el nitrógeno también actúa con un regulador del pH durante el cultivo de los tejidos (Fracaro & Echeverrigaray, 2001)

En conclusión los tratamientos que cumplen con los cuatro parámetros (reducción del crecimiento y viabilidad de las plantas) o al menos con tres incluido el menor porcentaje de mortalidad son B5 al 100% y MS al 25 y 50%, esto puede deberse a la modificación de las concentraciones de sales minerales, las mismas que pueden retrasar el crecimiento *in vitro*, a causa de las alteraciones que ocurren en el metabolismo celular (Espinosa *et-al*, 2002; 2003; Pérez *et-al*, 2010) la reducción de la absorción de agua y nutrientes del medio (García-Águila *et-al*, 2007), varios autores han empleado con éxito la disminución de nutrientes en los medios, que contribuyen al mantenimiento de tejidos con una baja tasa metabólica para la conservación de especies vegetales; Así como García *et-al* (2004), que obtuvieron un retardo significativo en el crecimiento al utilizar MS al 25% para conservar *Saccharum spp.*



Figura 2. Cultivo *in vitro* de *C. officinalis* en medio MS 100% presencia de mayor brotación y explantes muertos (12 meses)

La formación de raíces fue evidenciada en todos los tratamientos, obteniendo menor crecimiento en bajas concentraciones de ambos medios y mayor enraizamiento en los tratamientos con mayor concentración de nutrientes. La presencia de raíces en casi todos los tratamientos posiblemente se debe a que las plantas al verse limitadas en nutrientes ya sea por la baja concentración o por el largo período de cultivo, hacen crecer sus raíces muy rápidamente para absorber todos los nutrientes que tengan disponibles, aunque eventualmente el desarrollo de la planta será mínimo (Torija *et-al*, 2004).

Con respecto a las tonalidades encontradas en los diferentes tratamientos, las plantas presentaron varias diferencias relacionadas a la concentración de nutrientes, que fueron desde el verde (característico de la especie) hasta el marrón correspondiente a una planta con necrosamiento. Morfológicamente las plantas presentaron deficiencias nutricionales llegando inclusive hasta la muerte lo cual fue inversamente proporcional a las bajas concentraciones de medio de cultivo, en el caso del medio B5 fue generalizada, aparentemente debido a la pérdida de clorofila ocasionada por la deficiencia de nitrógeno, característico de este medio (Botía & Medina, 2002), esto se debe a una deficiencia de nutrientes que retarda el funcionamiento adecuado de las plántulas, tomando en cuenta que los tejidos de una planta producida *in vitro*, presentan hojas frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas (Pierik, 1990).

Además del amarillamiento gradual en las plantas presentaron síntomas más severos como oscurecimiento en las tonalidades de los tejidos (*Ver anexo 1*), seguidos por la defoliación y/o necrosis debido a la reducción en la absorción ocasionado por la presión osmótica en el medio. El aumento o la disminución de algunos nutrientes en el medio de cultivo pueden causar cambios en las tonalidades de las coloraciones en las hojas de las plantas (Espinosa *et-al*, 2003; Barceló *et-al*, 2007).

Evaluación de la organogénesis influida por agentes osmóticos

Las diferentes concentraciones de sacarosa, sorbitol y manitol, mostraron diferencias significativas como: el crecimiento en longitud, formación de brotes, raíces sin embargo en mortalidad a los 12 meses no hay diferencias estadísticas esto de acuerdo a la prueba de *Tuckey*.

Tabla 5. Efecto en el crecimiento y organogénesis con agentes osmóticos en medio B5 en 3 y 12 meses de cultivo

Agente osmótico	g/l	Crecimiento en longitud (cm)		Brotos/explante (#)		Raíces (%)		Mortalidad (%)	
		3 meses	12 meses	3 meses	12 meses	3 meses	12 meses	3 meses	12 meses
Sacarosa	20	0.8 ± 0.4a	2.49 ± 0.8a	3.91 ± 1.8ac	6.01 ± 2.0bc	50 ± 5.0b	71.42 ± 45.0b	2.27 ± 1.5a	37.5 ± 3.3a
	40	0.72 ± 0.4a	2.26 ± 0.8a	4.86 ± 1.7a	7.25 ± 2.2b	88.33 ± 32.0a	88.33 ± 32.3a	0 ± 0a	21.1 ± 4.2a
	80	0.74 ± 0.3a	2.48 ± 0.8a	4.71 ± 1.6a	10.56 ± 2.8a	57.6 ± 49.0b	96.15 ± 19.4a	0 ± 0a	56.6 ± 4.2a
Sorbitol	20	0.36 ± 0.2b	1.27 ± 0.6bc	2.62 ± 1.7cd	4.46 ± 1.8cd	0 ± 0c	0 ± 0d	2.7 ± 1.6a	35 ± 3.9a
	40	0.34 ± 0.2b	1.58 ± 0.6bc	2.89 ± 1.8cd	3.39 ± 1.9d	0 ± 0c	0 ± 0d	0 ± 0a	21.3 ± 4.0a
	80	0.22 ± 0.3b	1.13 ± 0.5cd	2.59 ± 2.0bd	4.45 ± 1.9cd	6.6 ± 2.5c	41.6 ± 4.9c	14.58 ± 4ab	59.6 ± 3.1a
Manitol	20	0.31 ± 0.1b	0.72 ± 0.3de	3.05 ± 1.7bc	4.15 ± 1.3cd	0 ± 0c	0 ± 0d	7.5 ± 2.6a	43.1 ± 3.7a
	40	0.34 ± 0.2b	1.13 ± 0.6cd	2.91 ± 1.8cd	5.31 ± 2.3bc	0 ± 0c	0 ± 0d	15 ± 3.9ab	46.8 ± 3.9a
	80	0.15 ± 0.1b	0.53 ± 0.2e	1.82 ± 1.7d	3.3 ± 1.5d	0 ± 0c	2.94 ± 1.9d	25 ± 4.3b	46.1 ± 3.3a

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

Según los resultados expuestos en la (Tabla 5), el crecimiento a los 3 y 12 meses son mayores en las concentraciones de sacarosa a diferencia de las de sorbitol y manitol, la misma tendencia ocurre en la formación de nuevos brotes y raíces (Figura 7a-b-c). Y en la mortalidad a pesar de que estadísticamente no existen diferencias los porcentajes son relativamente bajos en las concentraciones de sacarosa y sorbitol a 20 y 40 g/l observándose también en 20 g/l de manitol.

Considerando que la mortalidad es el factor primordial para la selección del mejor tratamiento como limitante del crecimiento, tenemos que el sorbitol y sacarosa a 20 y 40 g/l tienen porcentajes relativamente bajos, con respecto a las demás tratamientos. Como segundo factor en la limitación de formación de cantidad de órganos, el sorbitol en las mismas concentraciones influye notablemente en limitar su formación, seguido por el manitol. Finalmente en concentraciones de sorbitol a 20 y 40 g/l y manitol a 20 g/l se puede mantener plántulas con un bajo porcentaje de crecimiento y cantidad de órganos manteniéndolas viables por un largo tiempo.

En el caso de la sacarosa a 20 y 40 g/l no controla eficazmente el crecimiento en longitud y formación de órganos más bien lo favorece, sin embargo tiene bajos porcentajes de mortalidad lo que puede ser considerado, para el cultivo *in vitro* de esta especie. Según Chávez *et-al*, (2010) el incremento de sacarosa presenta efectos inhibitorios en el crecimiento, sin embargo promueve la brotación ya que incrementa la cantidad de carbohidratos almacenados en los brotes, la sacarosa por encima de 30 g/l aumenta la proliferación de brotes aun más si esta en medio rico en sales (Seingre *et-al* 1991, en George, 1993).

Por tanto las concentraciones de sacarosa usadas en el presente trabajo favorecieron al crecimiento de la planta en volumen (Figura 3) y no ayudaron a limitarlo debido a que es altamente metabolizable por la planta, lo que implica que sea fácilmente absorbida para formar biomoléculas, participar en el metabolismo de la planta; y para que actúe como agente osmótico debe estar en un rango de concentración elevada entre 4 - 5% (Schenk & Hildebrandt en George, 1993), solo así afectará el crecimiento, el consumo de nutrientes y la producción de metabolitos secundarios (Akalezi en Arias *et-al*, 2009).

Por otro lado se debe mencionar que al utilizar 80 g/l de sacarosa se produjo formación de callos en este trabajo. En estudios similares, las concentraciones elevadas de esta sustancia reduce la tasa de crecimiento, la formación de clorofila para inducir la formación de callos (Litz & Jarret, 2004; Javed & Ikram, 2008).



Figura 3. Cultivo *in vitro* de *C. officinalis* con 80 g/l de sacarosa a los 12 meses de cultivo

La formación de raíces se presentó principalmente en concentraciones con sacarosa, esto se debe (*Figura 7a*), a que la sacarosa además de ser la fuente principal de carbono y energía, actúa en la formación de órganos como las raíces, tal como ha ocurrido en otras especies (Quero, 2004; Chávez *et-al*, 2010).

A diferencia de la sacarosa, el sorbitol a 20 - 40 g/l y manitol a 20 g/l son eficientes en limitar el crecimiento de los explantes por la presión osmótica que inducen en el medio de cultivo, observándose en el presente trabajo que estos agentes osmóticos presentaron porcentajes relativamente bajos siendo los mejores para mantener viables los tejidos de *C. officinalis*, por lo menos hasta 12 meses, sin embargo algunos reportes demuestran que el empleo de manitol y sorbitol solos no influyen sobre la conservación a largo plazo más bien son eficientes en combinación con el empleo de sacarosa (Gopal *et-al*, 2002).

El sorbitol al igual que el manitol son alcoholes de azúcar no metabolizables utilizados en el proceso de conservación por su alto potencial osmótico en el medio, en el caso del sorbitol es metabolizado lentamente por las células vegetales (Reyes & Marcela,

2000). Este agente osmótico es capaz de reducir la tasa de crecimiento sin causar daños irreversibles, ha sido empleado en varias especies con el fin de conservar (Akula *et-al*, 2000). En *Malus sp.* el sorbitol promovió el enraizamiento y la formación de brotes (Raya *et-al*, 2009), sin embargo a 80 g/l (Figura 4) la mortalidad fue elevada, similar respuesta obtuvo Will (2011), en plantas de *Glycine max* (L) Meer, que el daño fue más grave después de la aplicación de sorbitol que contenía 91 g/l de esta sustancia.

Según Roca (2003), el sorbitol a diferencia del manitol permite un descenso en la tasa de crecimiento, sin disminuir la viabilidad de los explantes, logrando un tiempo de conservación de 18 meses en distintas variedades de yuca.



Figura 4. Cultivo *in vitro* de *C. officinalis* con 80 g/l sorbitol a los 12 meses de conservación.

El manitol fue el azúcar que mayor incidencia tuvo sobre la limitación del crecimiento longitudinal, mostrando especialmente en 80 g/l, aunque presentaron mayor porcentaje de mortalidad (Figura 5), el empleo de manitol induce a retardar el crecimiento de los explantes pero en ocasiones no resulta adecuado en altas concentraciones para la conservación *in vitro*, ya que provoca la muerte de los explantes (Espinosa *et-al*, 2002, Borges *et-al*, 2003; Rosales *et-al*, 2006; Estrada *et-al*, 2009).

Sin embargo en concentraciones bajas como a 20 g/l ocasionó un mejor control, similar respuesta registraron Hunter *et-al*, 1986 (en George, 1993) cuando el manitol fue capaz de preservar la integridad de los tejidos utilizando porcentajes de 1 hasta 4% (10 – 40 g/l) de manitol en el medio de cultivo en brotes de *Cinchona ledgeriana*.

El manitol es otro alcohol de azúcar usado generalmente como osmótico externo puesto que puede penetrar fácilmente las paredes celulares, pero en la plasmalema es relativamente impermeable, ocasionado una reducción en la disponibilidad de agua en los cultivos en crecimiento mediante el estrés hídrico y consecuentemente disminuyendo la disponibilidad de las sustancias asimilables a la planta (Pence *et-al*, 2002).

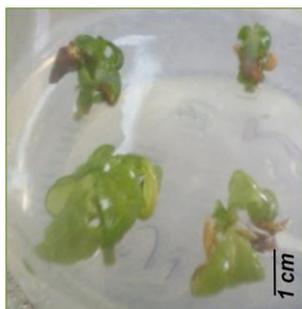


Figura 5. Cultivo *in vitro* de *C. officinalis* a 80g/l de manitol en 3 meses de conservación



Figura 6. Cultivo *in vitro* de *C. officinalis* a 80g/l de manitol provocó la muerte de las plántulas a los 12 meses de cultivo.

A medida que aumenta la concentración de estos dos alcoholes de azúcar afecta de manera significativa la supervivencia del material vegetal, provocando deterioro en el crecimiento y necrosis del tejido foliar, lo cual se manifiesta de forma más diferencial al cabo de los 12 meses de conservación (*Figura 6*). Esto también ocurrió en conservación *in vitro* de germoplasma de *D. alata* durante 9 meses al emplear manitol en rangos de 1,5 - 5,5% (Borges *et-al*, 2003).

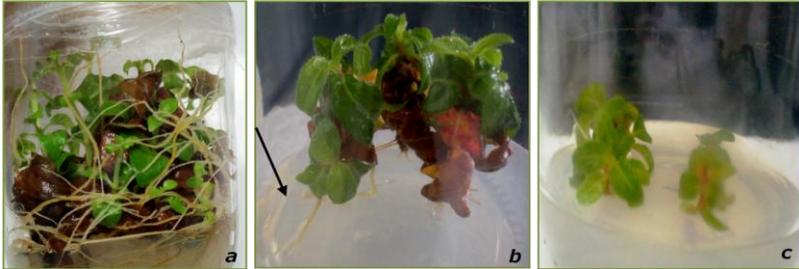


Figura 7. *C. officinalis* a 12 meses de cultivo **a)** Mayor presencia de raíces en 80 g/l de sacarosa **b)** Menor presencia de raíces en 80 g/l de sorbitol **c)** No se evidencio presencia de raíces en tratamientos con manitol.

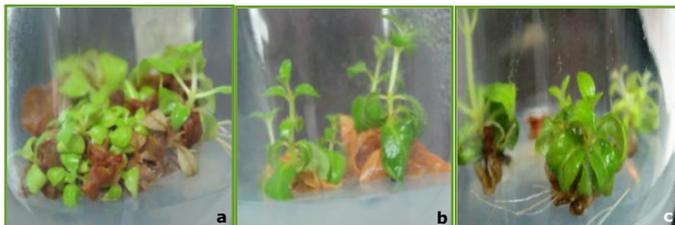
Se puede mencionar que en concentraciones de 40 y 80 g/l de manitol al igual que en sacarosa y sorbitol a 80 g/l obteniendo los porcentajes más altos de plantas que no pueden recuperarse o muertas, presentando cambios en su morfología con diferentes tonalidades de color debido a deficiente absorción de agua y nutrientes. Sin embargo el resto de plantas vivas presentaron amarillamiento o clorosis debido a la baja tasa fotosintética provocado por la adición exógena de fuentes de carbono. En relación a esto se sabe que los azúcares reducen la capacidad fotosintética de las plantas (Arigita *et-al*, 2002), al reprimir la expresión de genes y reducir el contenido de clorofila, así como reducir la actividad y concentración de rubisco, lo que conlleva a bajas tasas fotosintéticas (Premkumar *et-al*, 2002; Sinha *et-al*, 2002) en consecuencia la deficiencia en la pigmentación. En las concentraciones con sacarosa se observó plantas con coloraciones rojas, esto puede deberse a la producción de metabolitos secundarios (Akalezi en Arias *et-al*, 2009) característico de las especies de *Cinchona*, los cuales producen la acumulación de pigmentos antocianos (Azcón & Talón, 2008) esto tiene lugar, en general, aproximadamente una semana después del aumento masivo de los niveles de azúcar.

RECOMENDACIONES

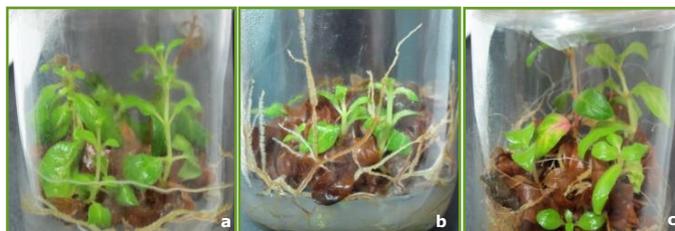
- El MS puede ser usado en un rango de 25 - 50% y el medio B5 100% para mantener un elevado porcentaje de plantas viables con un recambio de medio a los nueve meses.
- Incrementar las concentraciones de 4% a 5% sacarosa, para que actúe como agente osmótico y evitando la toxicidad en las plantas.
- Aplicar el sorbitol en cantidades bajas de hasta 15 g/l para que tenga un efecto positivo sobre la limitación del crecimiento.
- Evaluar con otros agentes osmóticos como ácido abscísico (ABA), glicerol, entre otros o combinando los agentes osmóticos utilizados en este trabajo pero en cantidades más bajas.
- Utilizar el manitol en bajas concentraciones de 6 hasta 20 g/l para evitar problemas de toxicidad, ya que en más altas provoca la muerte de los explantes.
- Evaluar la modificación de las condiciones ambientales en los cultivos como la iluminación o la temperatura en el proceso de conservación.
- Realizar análisis de variación somaclonal en los cultivos que han sido sometidos a un reducción osmótica en medios con azúcares y otros factores que causen estrés en el proceso de conservación.
- El tiempo de permanencia que los explantes tienen que permanecer en el medio de cultivo para mantenerlos viables debe ser máximo por un lapso de 8 hasta 9 meses de cultivo.

ANEXOS

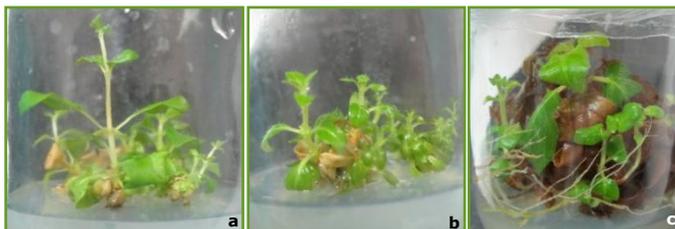
Anexo 1.



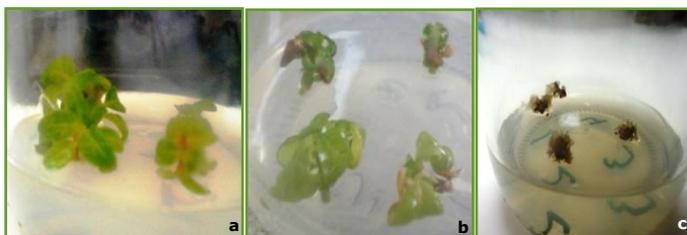
C. officinalis en diferentes concentraciones de sales MS a) 100% b) 50% c) 25%



C. officinalis en diferentes concentraciones de sacarosa a) 20 g b) 40 g c) 80 g



C. officinalis en diferentes concentraciones de sorbitol a) 20 g b) 40 g c) 80 g



C. officinalis en diferentes concentraciones de manitol a) 20 g b) 40 g c) 80 g

BIBLIOGRAFÍA

- Arias M.; Angarita J.; Aguirre M.; Restrepo M.; Montoya C. 2009. Estrategias Para Incrementar La Producción De Metabólitos Secundarios En Cultivos De Células Vegetales. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia.
- Azcón J. & Talón M. 2008. Fundamentos de la Fisiología Vegetal. 2da. Edición.
- Anda A. (2002). La Cascarilla. Ed. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja – Ecuador.
- Akula A.; Akula C.; & Bateson M. 2000. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Plant Growth Regulation. Pág. 30.
- Arigita L.; Gonzalez A.; Tamés S. 2002. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum. 115: 166-173.
- Bacchetta G.; Bueno S.A.; Fenu G.; Jiménez A.B.; Mattana E.; Piotto B.; & Virevaire M. Eds. 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principios de Asturias - La Caixa. Pág. 378.
- Badillo J.; Oliver M.; Moreno K.; Pacheco V.; Cortes H. 2009. Manual del laboratorio de cultivo de tejidos. Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Laboratorio de Cultivo de Tejidos. México D. F. Pág. 27
- Baena M.; Jaramillo S.; & Montoya J.E. 2003. Material de apoyo a la capacitación en conservación *in situ* de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticas, Cali - Colombia. Pág. 129.

- Barceló J.; Nicolás G.; Sabater B.; Sánchez R. 2007. Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid – España.
- Benavides A. 2002. Ecofisiología y química del estrés en plantas. Departamento de agricultura/UAAAN.
- Berjak P.; Mycock D.; Wesley-Smith J.; Dumet D.; Watt M. 1996. Strategies of *in vitro* conservation of hydrated germplasm. In: International Workshop on *in vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. Universiti Kebangsaan Malaysia and IPGRI, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Botía C.; Medina M. 2002. Determinación de síntomas por deficiencias Inducida de nutrientes en lulo (*Solanum quitoense* Lam y Uchuva *Physalis peruviana* L). Corporación Universitaria de ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A).
- Borges M.; Meneses S.; Vázquez J.; & García M. 2003. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. por crecimiento mínimo. Plant Genetic Resources Newsletter, No. 133: 8-12.
- Chávez M.; De Fera M.; Jiménez F.; Pérez M.; Quiala E.; Agramonte D. 2010. Características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *Caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. *Biotecnología Vegetal* Vol. 10, No. 1: 31 – 40. Villa Clara- Cuba.
- Cóndor C.; Bras E.; Loayza O.; Reyna K. 2009. Estudio Químico De Los Tallos De *Cinchona pubescens* Vahl. RevSocQuím Perú. 75 (1).
- Del Campo F.; Sanz S.; Hernández L. 2007. LABORATORIO AVANZADO DE FISILOGÍA VEGETAL: Módulo de cultivo *in vitro*. Comisión Docente de Fisiología Vegetal Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid - España.

- Espinosa A.; Salas L.; González P.; Silva J. 2002. Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. Biotecnología vegetal. Vol. 2: 39-42.
- Espinosa A.; González O.; Silva J. 2003. Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma – Cuba. *Biotecnología vegetal* Vol. 3, No. 1: 37-41.
- Estrada A.; García B.; González M.; Nuñez Y.; Kosky G.; Bernard M. 2009. Aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada al estudio de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. Vol. 9, No. 3. Cuba.
- Engelmann F. & Takagi H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.
- Epiquién Mirbel. 2009. Los últimos árboles de la quina. Biodiversityperú. Consultado el 20 de Septiembre de 2010. Disponible en: <http://biodiversityperu.blogspot.com/2009/02/los-ultimos-arboles-de-la-quina.html>.
- Fuentevilla C. 2004. Propagación *in vitro* de Algunas Especies De Leucocoryne. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de agronomía. Área de Hortalizas y Flores. Quillota-Chile. Pág. 76.
- Fracaro F & Echeverrigaray S. 2001. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 1-4.
- García L.; Pérez J.; Rodríguez M.; Pérez B.; Pérez M.; Sarria Z. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central. Cuba. Biotecnología Vegetal Vol. 4, No. 2: 101–105.

- García M. & Pinol M. 2007. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, Ciencias de la vida. Editorial Síntesis S. A. España.
- García-Águila L.; De Feria M.; Acosta K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 2: 67–79. Cuba.
- García L.; Acosta K.; Jiménez M. 2007. La conservación *in vitro* como estrategia para la conservación de germoplasma. Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. XVII Con. Ven. Bot. Cuba.
- Garmendia A. 2005. El árbol de la Quina (*Cinchona spp*) Distribución, Caracterización de su hábitat y Arquitectura. 1^{era} edición. Ed. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
- Geerlings A.; Hallard D.; Martínez A.; Lopes I.; Van der Heijden R.; Verpoorte R. 1999. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* "Ledgeriana" hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictoside synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 19: 191-196.
- González J. 2007. Evaluación de la influencia de factores físicos y químicos sobre la germinación, propagación de explantes, enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L. (Cascarilla) como una alternativa de conservación. Trabajo de tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Particular de Loja.
- George E. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part I & II. 2nd. Edition. Exegetics Limited.
- Gopal J.; Chamail A.; Sarkar D. 2002. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. Potato Research 45: 203-213.

- Hernández R. 2002. Nutrición Mineral de las Plantas. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes-Venezuela. LibroBotánicaOnLine. Disponible: <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg>.
- Izquierdo H. & Quiones Y. 2003. Obtención de semilla de ajo, (online). www.utm.mx/temas-docs/nfnotas15R2.pdf.
- Javed F. & Ikram S. 2008. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. Department of Botany. Pak. J. Bot. 40(4): 1487-1495. Pakistan.
- Kirkby A. & Römheld V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 543. The International Fertilizer Society, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom. Pág. 21.
- Koblitz H.; Koblitz D.; Schmauder H.; Groger D. 1983. Studies on Tissue Cultures of the Genus *Cinchona* L. Plan Cell Reports.
- León P.; Rosas M.; Guerrero C.; Sandoval A.; & Way M. 2008. Conservación *ex situ* de la Flora de la Región de Atacama; Métodos, Experiencias y Desafíos Futuros. Cap. 20. La Serena – Chile.
- Litz E. & Jarret L. 2004. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Capítulo 7. Parte 1. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Florida - Estados Unidos.
- Loaiza T. & Sánchez E. 2006. La corteza de Loja. Revista Ecuador Terra Incógnita. Quito – Ecuador.
- Martínez F.; Sarmiento J.; Fisher G.; Jiménez F. 2009. Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia-Bogotá. Agronomía Colombiana 27(2), 169-178.

- MUNSELL. 1998. Color charts for plant tissues. New York. Munsell Color. s.p.
- Pence C.; Sandoval A.; Villalobos M.; Engelmann F. 2002. *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 100 pp. IPGRI Technical Bulletin. No. 7. QK 725 P4. 63596. Rome – Italy.
- Pierik M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid – España. Pág. 326.
- Pérez F.; González M.E.; Martínez J.B. 2003. Introducción a la Biología Vegetal. Parte II. Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Madrid. Pág. 137.
- Pérez J.; Albany N.; Vilchez J.; León de S.; Molina M. 2010. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, Departamento de Química. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2010, 27: 447-459.
- Premkumar A.; Barcelo A.; Pliego F.; Quesada A.; Mercado A. 2002. Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during *in vitro* cultivation and subsequent *ex vitro* acclimatization. Trees 16: 569-575
- Quero P. 2004. Propagación *in vitro* y evaluación en la fase de vivero de la piña (*Ananas comosus* L. Merr). C.V Española Roja.
- Quiroz F.; Rojas R.; Galaz R.; Loyola V. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Pág. 86.
- Rayas A.; Mederos V.; García M.; López J.; Cabrera M.; Ventura J.; Martínez M.; Gutiérrez V.; Álvarez M.; Bauta M. 2002. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal* 2(4): 249-251).

- Ramos-Valdivia A.; Heijden R.; Verpoorte R. 1997. Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. Plant 203: 155-161.
- Raya A.; Villegas Á.; Arellano G. 2009. Cinética de Enraizamiento *in vitro* de Portainjertos de Vid en Respuesta a la Fuente Y Concentración de Azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. 32, Pág. 111-117.
- Reyes G. & Marcela J. 2000. Hacia el Establecimiento del Banco de Germoplasma en Mínimo Crecimiento del Tubérculo Andino *Ullucus tuberosus* Caldas y Evaluación del sorbitol adicionado al medio básico MS para conservación *in vitro* del tubérculo andino Caldas. Bogotá.
- Rosales F.; Pérez G.; & Santizo M. 2006. Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.).
- Roca W. M.; Arias D. I.; y Chávez R. 2003. Métodos de conservación de germoplasma *in vitro*. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Scocchi A. & Rey H. 2007. Conservación de germoplasma *in vitro*. Parte V. Capítulo 3.
- Schripsema J.; Ramos-Valdivia A.; Verpoorte R. 1999. Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension cultura. Phytochemistry 51: 55-60. Mexico.
- Salisbury B. & Ross C. 2000. Fisiología de las Plantas 1: Células, soluciones y superficies. Madrid-España. Pág. 189-190.
- Stevens L.; Giroud C.; Pennings E.; Verpoorte R. 1993. Purification and Characterization of strictosidine synthase from a suspension culture of *Cinchona robusta*. *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 1, pp. 99-106.

- Sinha A.; Hofmann M.; Römer U.; Köckenberger L.; Roitsch T. 2002 Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology*. 128:1480-1489.
- Torija B.; Sánchez A.; Jiménez D. 2004. Efectos de la deficiencia de nutrientes en el crecimiento de las raíces principales y laterales de la planta *Arabidopsis thaliana*. *Metodos de Investigación*. Colegio Marymunt. Pág. 10.
- Yaguache A. 2009. Germinación, inducción a organogénesis y métodos de conservación *in vitro* de *Solanum cajanumense*, Kunth (tomate de árbol silvestre). Trabajo de tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Will S.; Eichert T.; Fernández V.; Möhring J.; Müller T & Römheld V. 2011. Absorption and mobility of foliar-applied boron in soybean as affected by plant boron status and application as a polyol complex. *Plant Soil* 344:283–293. Germany.
- Wijnsma R.; Verpoorte R.; Peter A.; Harkes A.; Vliet T.; Hoopen H.; and Svendsen Anders. 1986. The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. Volume 7, Number 1, 21-29.