

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**Escuela Académico Profesional de Ingeniería Forestal**



**TESIS**

**EFFECTO DE TRES DOSIS Y DOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA  
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) – CAJAMARCA**

**Para obtener el título profesional de:**

**INGENIERO FORESTAL**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:**

Ramos Sanchez, Jonny Luberli

**ASESORES:**

Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela

Ing. M. Sc. Alex Wilfredo Huatay Saldaña

**CAJAMARCA-PERÚ**

**2023**



## CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

El que suscribe, Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela, asesor de la Tesis titulada "Efecto de tres dosis y dos reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae), Cajamarca", correspondiente al Bach. en Ciencias Forestales, JONNY LUBERLI RAMOS SANCHEZ, de la EAP de Ingeniería Forestal, HACE CONSTAR que, se ha sometido esta investigación al Software Antiplagio Original (Urkund) y los resultados demuestran que existe un 11 % de similitud, muy por debajo del límite permitido.

Se le expide la presente Constancia para fines de solicitud de Jurado para su Sustentación.

Cajamarca, 25 de mayo de 2023

Atentamente,

-----  
Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela  
ASESOR

C.c.  
Archivo



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"

Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Secretaría Académica



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Cajamarca, a los catorce días del mes de setiembre del año dos mil veintitrés, se reunieron en el ambiente **2C - 202** de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 307-2023-FCA-UNC, de fecha 27 de junio del 2023**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la TESIS titulada: **"EFECTO DE TRES DOSIS Y DOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) - CAJAMARCA"**, realizada por el Bachiller **JONNY LUBERLI RAMOS SANCHEZ** para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

A las diez horas y quince minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciséis (16); por tanto, el Bachiller queda expedito para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

A las once horas y cuarenta y cinco minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.

Ing. M. Sc. Walter Ricardo Roncal Briones  
PRESIDENTE

Ing. Nehemías Honorio Sangay Martos  
SECRETARIO

Ing. Oscar Rogelio Sáenz Narro  
VOCAL

Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela  
ASESOR

## **DEDICATORIA**

A mi querida familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Manuel Malpica Rojas, quien de manera generosa y servicial me enseñó sobre la técnica de cultivos *in vitro*.

A la Ing. Teresita Moreno Huamán por su apoyo incondicional en las actividades de laboratorio.

Al Ing. M. Sc. Alex Wilfredo Huatay Saldaña y Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela por el acompañamiento durante la formulación y la concretización de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOs.....	ii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Bases teóricas.....	5
2.2.1. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	5
2.2.2. Descripción de la <i>C. officinalis</i> .....	15
2.2.3. Propagación de la <i>C. officinalis</i> .....	19
2.3. Definición de términos básicos.....	20
CAPÍTULO III.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Ubicación geográfica del laboratorio.....	22
3.2. Materiales .....	22
3.2.1. Materiales experimentales .....	22
3.2.2. Materiales, equipos e insumos .....	23
3.3. Metodología.....	23
3.3.1. Variables de estudio.....	23
3.3.2. Diseño experimental .....	24

3.3.3.	Procedimientos.....	25
3.3.4.	Análisis estadístico.....	30
CAPÍTULO IV.....		31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31
4.1.	Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes .....	31
4.1.1.	Contaminación de explantes .....	31
4.1.2.	Fenolización de explantes.....	32
4.1.3.	Supervivencia de explantes.....	34
4.2.	Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación .....	38
4.2.1	Número de brotes.....	38
4.2.2	Longitud de brotes .....	40
4.2.3	Supervivencia de explantes en la multiplicación.....	41
4.3.	Efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento.....	44
4.3.1.	Número de raíces .....	45
4.3.2.	Longitud de raíces.....	47
4.3.3.	Porcentaje de enraizamiento .....	49
4.3.4.	Supervivencia de explantes en el enraizamiento .....	50
CAPÍTULO V.....		54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		54
CAPÍTULO VI.....		55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		55
ANEXOS .....		65

## ÍNDICES DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Plantones de <i>C. officinalis</i> .....	25
<b>Figura 2.</b>	Proceso de desinfección y establecimiento de explantes .....	27
<b>Figura 3.</b>	Porcentaje de contaminación de explantes.....	32
<b>Figura 4.</b>	Porcentaje de explantes fenolizados.....	33
<b>Figura 5.</b>	Problemas presentes durante la fase de desinfección y establecimiento.....	34
<b>Figura 6.</b>	Porcentaje de supervivencia de explantes en la desinfección .....	35
<b>Figura 7.</b>	Efecto del NaClO en la desinfección .....	36
<b>Figura 8.</b>	Explantes sanos de los tres tratamientos de desinfección .....	36
<b>Figura 9.</b>	Número de brotes por explante .....	39
<b>Figura 10.</b>	Longitud de brotes por explante.....	41
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de supervivencia de explantes en la fase de multiplicación .....	42
<b>Figura 12.</b>	Desarrollo de explantes en la fase de multiplicación.....	43
<b>Figura 13.</b>	Acondicionamiento y siembra de explantes en la fase de enraizamiento .....	45
<b>Figura 14.</b>	Número de raíces por explante.....	46
<b>Figura 15.</b>	Longitud de raíces por explante .....	48
<b>Figura 16.</b>	Formación de raíces.....	48
<b>Figura 17.</b>	Porcentaje de enraizamiento.....	50
<b>Figura 18.</b>	Porcentaje de supervivencia de explantes en la fase de enraizamiento.....	51

## ÍNDICES DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal.....	14
<b>Tabla 2.</b>	Variables de estudio.....	23
<b>Tabla 3.</b>	Tratamientos para la desinfección de explantes con hipoclorito de sodio.....	27
<b>Tabla 4.</b>	Concentración de los reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación ....	28
<b>Tabla 5.</b>	Tratamientos para determinar el balance hormonal en la fase de multiplicación.....	29
<b>Tabla 6.</b>	Concentración de los reguladores de crecimiento para la fase de enraizamiento.....	30
<b>Tabla 7.</b>	Tratamientos para determinar el balance hormonal en la fase de enraizamiento .....	30
<b>Tabla 8.</b>	Análisis de varianza de la contaminación de explantes. ....	31
<b>Tabla 9.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la contaminación de explantes....	32
<b>Tabla 10.</b>	Análisis de varianza de la fenolización de explantes.....	33
<b>Tabla 11.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la fenolización de explantes .....	33
<b>Tabla 12.</b>	Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en la desinfección .....	34
<b>Tabla 13.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en la desinfección .....	35
<b>Tabla 14.</b>	Análisis de varianza del número de brotes por explante.....	39
<b>Tabla 15.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de brotes por explante ..	39
<b>Tabla 16.</b>	Análisis de varianza de la longitud de brotes por explante.....	40
<b>Tabla 17.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de brotes por explante .....	40
<b>Tabla 18.</b>	Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en la multiplicación.....	42

<b>Tabla 19.</b> Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en la multiplicación .....	42
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza del número de raíces por explante .....	45
<b>Tabla 21.</b> Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de raíces por explante...	46
<b>Tabla 22.</b> Análisis de varianza de la longitud de raíces por explante .....	47
<b>Tabla 23.</b> Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de raíces por explante	47
<b>Tabla 24.</b> Análisis de varianza del porcentaje de enraizamiento .....	49
<b>Tabla 25.</b> Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de enraizamiento.....	49
<b>Tabla 26.</b> Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en el enraizamiento .....	50
<b>Tabla 27.</b> Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en el enraizamiento .....	51

## RESUMEN

En la presente investigación se desarrolló la micropropagación de *Cinchona officinalis*, mediante el cultivo *in vitro* de explantes obtenidos de plántulas cultivadas en vivero. Se evaluó el efecto desinfectante del NaClO (hipoclorito de sodio) y el efecto de los reguladores de crecimiento, auxinas y citoquininas: ácido 3-indol-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB), ácido 1-naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP). En el proceso se consideró tres fases de la micropropagación, mediante un diseño completamente al azar. En la fase de desinfección y establecimiento se evaluó tres tratamientos, en el cual se obtuvo el 61,11 % de supervivencia de explantes libres de patógenos con el tratamiento T2 (2 % NaClO). Para la fase de multiplicación se evaluó nueve tratamientos, logrando obtener el mejor resultado con el tratamiento T6 (0,4 mg/l AIA + 1,2 mg/l BAP) con un promedio de 2,5 brotes por explante y una longitud de 23,50 mm. Así mismo, en la fase de enraizamiento se logró alcanzar el mejor resultado en el tratamiento T8 (2,0 mg/l AIB + 1,5 mg/l ANA) donde el 76,67 % de explantes enraizaron con un número promedio de 2,47 raíces por explante y una longitud de 5.67 mm.

**Palabras clave:** *Cinchona officinalis*, micropropagación, explante, reguladores de crecimiento, auxinas, citoquininas

## ABSTRACT

In the present research, the micropropagation of *Cinchona officinalis* was developed through in vitro cultivation of explants obtained from seedlings grown in a nursery. The disinfectant effect of NaClO (sodium hypochlorite) and the effect of growth regulators, auxins and cytokinins were evaluated: 3-indole-acetic acid (AIA), indole-butyric acid (AIB), 1-naphthaleneacetic acid (ANA) and 6-benzylaminopurine (BAP). In the process, three phases of micropropagation were considered, using a completely randomized design. In the disinfection and establishment phase, three treatments were evaluated, in which 61.11% survival of pathogen-free explants was obtained with treatment T2 (2% NaClO). For the multiplication phase, nine treatments were evaluated, achieving the best result with treatment T6 (0.4 mg/l IAA + 1.2 mg/l BAP) with an average of 2.5 shoots per explant and a length of 23.50mm. Likewise, in the rooting phase, the best result was achieved in the T8 treatment (2.0 mg/l AIB + 1.5 mg/l ANA) where 76.67% of explants rooted with an average number of 2.47 roots per explant and a length of 5.67 mm.

**Keywords:** *Cinchona officinalis*, micropropagation, explant, growth regulators, auxins, cytokinins

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La *Cinchona officinalis* se encuentra distribuida en los bosques montanos y premontanos de la cordillera de los Andes, al sur del Ecuador y al norte del Perú. Esta especie fue de mucha importancia económica por dos siglos para nuestro país en la época colonial, debido al beneficio medicinal y eficaz de los brebajes preparados con la corteza para el tratamiento de la malaria, un mal que era considerado incurable en toda Europa (Alvárez, 2013). Durante esa época le permitió ser tan requerida, acarreando una sobreexplotación y un comercio indiscriminado al norte del Perú (Pacheco y Carrera, 2008).

En la actualidad aún sigue existiendo una presión antrópica en su hábitat debido a la quema de bosques, la ampliación de la frontera agrícola y ganadera (Villar et al., 2018; Aymard, 2019) provocando que diversas especies como *C. officinalis* y *C. humboldtiana* se encuentren presentes en bosques relictos con pocos individuos (Gómez et al., 2016) y otras como *C. pubescens* y *C. calisaya* estén clasificadas como especies amenazadas (MINAGRI, 2016).

Según Huamán et al. (2019), la *C. officinalis* se encuentra “En Peligro” de acuerdo a las categorías y criterios de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) debido a que no hay reportes de su existencia en otras regiones del Perú; por otro lado Armijos (2016) y Cuesta et al., (2009) reportan que su futuro es inseguro, ya que presenta dificultades en su regeneración natural por las condiciones ecológicas de los bosques montanos que vienen siendo alterados en toda su distribución.

Estudios realizados mencionan que su propagación sexual es baja y lenta, con una viabilidad promedio de 0,58 % (Caraguay et al., 2016), las semillas alcanzan valores de germinación del 30 % (Vasquez et al., 2018) al 70 % en tres meses (Jerez, 2017). Con respecto a su propagación asexual a través de estacas no ha dado resultados favorables que puedan ayudar en su conservación (Conde, 2016; Jerez, 2017; Villar et al., 2018).

Frente a lo antes mencionado, se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto de reguladores de crecimiento en la micropropagación de *C. officinalis*?

Esta investigación se realizó teniendo en cuenta la problemática de daño que sufre esta especie en su hábitat y por tener importancia ambiental, económica, cultural y medicinal para nuestro país (Villar et al., 2018; Aymard, 2019); así mismo tiene el propósito de contribuir con información que sirva de base para la micropropagación de otras especies del mismo género u otras especies forestales.

Como objetivo general de la investigación se ha considerado: Determinar efecto de tres dosis y dos reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *C. officinalis* L.; como objetivos específicos: Determinar la mejor concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de plantas *ex vitro*, evaluar el efecto de AIA + BAP (auxina-citoquinina) en la fase de multiplicación, y evaluar el efecto del AIB + ANA (auxinas) en la fase de enraizamiento *in vitro*.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Antecedentes

González (2018) realizó la desinfección de semillas *C. officinalis* con hipoclorito de sodio (NaClO) al 50 % y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 2 % por tiempos de inmersión de 5 min y 10 min, logrando el 100 % de éxito, es decir no se presentó contaminación en los cuatro tratamientos. Para la germinación preparó medio de cultivo de Murashige y Skoog de 1962 (MS) suplementado con vitaminas (tiamina 1 mg/l, mio-inositol 100 mg/l), sacarosa al 2,0 % y ácido giberélico 1mg/l; las semillas desinfectadas en el T1 (50 % NaClO + 5 min.) lograron germinar hasta un 86,67 %.

Campos (2018), en la desinfección de yemas de *C. pubescens* Vahl, empleó hipoclorito de calcio al 3 % más 3 gotas de Tween® 80 por un tiempo de 5 min a 20 min de inmersión. El tratamiento donde los explantes permanecieron por 20 min resultó ser el más efectivo, alcanzando un 95,83 % de explantes no contaminados. En el establecimiento se probaron tres tipos de medios de cultivo, donde el medio de Campbell y Durzan (1975) resultó ser estadísticamente superior porque los explantes alcanzaron un tamaño promedio de 31,6 mm seguido del medio Gamborg (1968) con 28,8 mm y finalmente el medio Murashige y Skoog (1962) con 27,8 mm.

En la fase de multiplicación, Paredes (2019) utilizó ápices caulinares y segmentos nodales de *C. officinalis* los cuales fueron sembrados en medio de cultivo MS más la adición de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones. En el tratamiento T2 (0,0 mg/l AIA + 2,5 mg/l BAP) logró el resultado más favorable para los tres sectores con 5,87 brotes de 3 cm (Zamora Huayco), 5,6 brotes de 3,3 cm (Uritusinga) y 4,73 brotes de 2,7 cm (Selva Alegre).

Campos (2018) en su investigación sobre la multiplicación de *C. pubescens* empleó el medio de Campbell y Durzan suplementado con citoquininas; de acuerdo con sus resultados, el tratamiento T1 (0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l KIN) se obtuvo mayor promedio de brotes (3,1) y mayor altura (34 mm) en comparación con el T2 (1 mg/l BAP) y T3 (1 mg/l KIN).

En la fase de enraizamiento de *C. officinalis*, Paredes (2019) realizó cuatro tratamientos para determinar el balance hormonal más adecuado; los explantes fueron sembrados en medio de cultivo MS más la adición de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones, logrando en el tratamiento T2 (2,0 mg/l AIB + 0,0 mg/l BAP) el 46,11 % (Zamora Huayco: 2,67 raíces de 2 cm) el 17,78 % (Uritusinga: 1,07 raíces de 0,2 cm) y el 26,67 % (Selva Alegre: 1,6 raíces de 0,9 cm).

Para el enraizamiento de explantes de *C. pubescens*, Campos (2018) realizó seis tratamientos con AIB y ANA, el mejor resultado lo obtuvo en T6 (1 mg/l AIB + 1 mg/l ANA) con un promedio de 8,75 raíces por explante y una longitud de 19,1 mm. Los resultados de estas investigaciones determinan que la mayor concentración de citoquininas promueve la formación de brotes, y al combinar una mayor concentración de auxinas en relación con las citoquininas estimulan la formación de raíces.

Espinosa y Ríos (2014) evaluaron la respuesta de crecimiento y supervivencia de las plántulas de *C. officinalis* procedentes de semilla y de brotes micropropagados. En la etapa *in vitro* el crecimiento y el incremento de brotes de las plántulas provenientes de semillas alcanzaron valores de 22,3 mm de longitud y 5 brotes por explante, en cambio, las plántulas de material micropropagado presentaron mejores resultados con 24 mm de longitud y 7 brotes en promedio. En la etapa *ex vitro* los resultados anteriores se invirtieron, las plántulas provenientes de semillas muestran tener un mayor crecimiento que las plántulas micropropagadas. En conclusión,

determinaron que la procedencia afecta algunos procesos morfo-fisiológicos de la planta, crecimiento y brotación, pero no afecta la supervivencia de las plántulas en la fase *ex vitro*.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, consiste en el empleo de técnicas que permite explotar el potencial genético de las células, mediante el cultivo aséptico de cualquier parte de una planta en un medio de cultivo que aporta el requerimiento nutricional necesario (Gisbert et al. 2010).

Según Ferl y Paul (2000, como se citó en Calva y Pérez, 2005) esta técnica de cultivo se basa en el principio de la totipotencia celular, es decir, que cualquier célula contiene una copia genética íntegra, sin importar su función o posición, por lo tanto, tiene el potencial para poder regenerarse en condiciones determinadas hasta llegar a ser una planta completa.

#### **a) Micropropagación**

La micropropagación consiste en la multiplicación masiva de plantas selectas que reúne características adecuadas, permitiendo obtener clones con el mismo genotipo, homogéneos y con buen estado fitosanitario; esto es posible a través de la técnica de cultivo de tejidos que incluso hace posible la propagación de plantas que por el método tradicional de propagación asexual no se han obtenido resultados tan favorables (Olmos et al., 2010).

La micropropagación a través de yemas apicales y axilares en condiciones *in vitro* da lugar a la formación y el desarrollo de nuevos brotes al incorporar citoquininas al medio de cultivo para

inducir el crecimiento de nuevos tallos y más yemas con células meristemáticas preexistentes, diferenciadas y capaces de llevar a cabo la división celular y la diferenciación de órganos en posteriores subcultivos sucesivos sin perder su estabilidad genética (Suárez, 2020).

### **b) Planta madre**

Una planta madre es la donante de explantes, de ella dependerá mucho la calidad fenotípica de los clones, es por eso, que se escoge a los individuos élites, con las mejores características fenotípicas, buen estado fisiológico y sanitario (Indacochea et al., 2019).

En el caso de varias plantas donantes se debe tener en cuenta que sean de la misma edad, que todas presenten un estado de crecimiento activo, vigoroso y sano, es decir, que en lo posible sean en todo homogéneas para que durante el establecimiento de explantes haya uniformidad, caso contrario, es necesario que sean sometidas a tratamientos como: cultivarlas en ambientes controlados (de luz, temperatura y humedad relativa), aplicarle tratamientos de nutrición, desinfección (Indacochea et al., 2019) y de rejuvenecimiento para lograr de esta manera el éxito de un cultivo *in vitro* (Mroginski et al., 2010).

### **c) Explante**

Es una parte o segmento de un órgano o tejido vegetal que es separada de una planta para ser cultivado *in vitro*; la elección del explante se realiza según los objetivos que se persiguen y la especie vegetal con la que se va a trabajar; se pueden utilizar como tejidos a hojas, tallos, raíces, pétalos, etc. y como órganos a semillas, ovario, anteras o botones florales (Mroginski y Roca, 1991).

La supervivencia y la rápida respuesta del explante en el cultivo *in vitro* depende mucho de la planta madre de la cual se obtienen, lo recomendable es obtener de plantas sanas con crecimiento vigoroso y que sean jóvenes, porque mientras más joven e indiferenciado se encuentre el explante mejor será su respuesta; por otra parte, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos (Mroginski et al., 2010).

#### **d) Fases de la micropropagación**

##### **- *Fase 0: Preparación del material vegetal***

Esta fase consiste en preparar a la planta donadora de explantes, realizando diversas actividades como cultivarlas en un invernadero o en ambientes similares al de un laboratorio bajo condiciones controladas (de luz, temperatura y humedad relativa) durante algunas semanas para uniformizar su estado fisiológico. Se pueden realizar tratamientos de desinfección para reducir la contaminación en la fase 1, tratamientos de nutrición o tratamientos de rejuvenecimiento para el caso de plantas adultas, a fin de lograr la adaptación y la supervivencia de los explantes en el establecimiento *in vitro* (Castillo, 2004).

##### **- *Fase 1: Establecimiento del cultivo***

En esta fase se realizan los procesos de selección de explantes, la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal. En la elección de explantes, se considera a los que tienen mayor capacidad regenerativa, como los tejidos meristemáticos jóvenes presentes en yemas apicales y axilares, en embriones, semillas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor como el cambium en plantas leñosas (Olmos et al., 2010).

La desinfección de los explantes se realiza de manera superficial para eliminar a los microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) que pueden crecer en el medio y competir con los explantes de manera ventajosa en el consumo de nutrientes, afectando de esta manera el desarrollo y el crecimiento del material vegetal (Villalobos y Thorpe, 1993). Estos organismos al no ser eliminados provocan daños mayores en las siguientes fases reduciendo la producción considerablemente (Sánchez et al., 2015).

Para la desinfección de un explante existen una variedad de desinfectantes, siendo los más comunes el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el alcohol y el jabón antibacterial. La elección del desinfectante y la concentración se determina de acuerdo al tipo de explante con el que se trabajará, porque hay tejidos y órganos que son más sensibles a ser dañados que otros. (Villalobos y Thorpe, 1993, p. 27)

#### - ***Fase 2: Multiplicación***

La finalidad de esta fase es incrementar la cantidad de brotes para realizar luego nuevos subcultivos. La producción se realiza dentro de la cabina de flujo laminar la cual proveen un ambiente de trabajo libre de contaminantes como resultado de la filtración del aire y la retención de partículas  $\geq 0,3 \mu\text{m}$  (Suárez Padrón, 2020). La multiplicación se puede realizar a través de dos vías: la organogénesis o la embriogénesis, que pueden desarrollarse de manera directa e indirecta (Olmos et al., 2010).

En la organogénesis directa, inmediatamente se diferencian órganos a partir de los explantes que fueron establecidos en un inicio o sub cultivados con la existencia de yemas preformadas; la organogénesis indirecta requiere pasar por una etapa de formación previa de callo

el cual es un tejido desorganizado que posteriormente se organiza para formar vástagos. La inducción y la respuesta organogénica está influenciada principalmente por el tipo de explante (su edad fisiológica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) y la concentración de los reguladores de crecimiento como las auxinas y citoquininas (Gisbert et al., 2010).

La multiplicación por embriogénesis es un proceso por el cual se regeneran plantas a partir de células somáticas en cultivo, de ellas se forman los embriones y luego dan lugar a una planta completa y funcional de una manera rápida y eficiente. Los embriones somáticos siguen las mismas etapas que los embriones cigóticos, pero no son el resultado de la fecundación de los gametos. (Gisbert, 2011) esta vía también ofrece la posibilidad de realizarse de manera directa e indirecta (Viñas y Jiménez, 2011).

### - ***Fase 3: Enraizamiento***

En esta fase se prepara a las plántulas para el establecimiento en el suelo mediante el enraizamiento de los brotes propagados *in vitro*. El resultado de enraizamiento suele ser más fácil en especies herbáceas, mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica (Olmos et al., 2010).

Gran parte del éxito de enraizamiento depende de la incorporación de auxinas al medio de cultivo (Villalobos y Thorpe, 1993). La formación, el crecimiento y la elongación de las raíces adventicias es estimulado por la presencia de una o dos tipos de auxinas dependiendo de la especie o clon; en ocasiones para algunas especies, principalmente las herbáceas enraízan en medio básico o con niveles muy reducidos de auxina. Las más usadas son el AIB, el ANA y el AIA (Villarreal y Cadima, 2016).

Como segunda opción es el enraizamiento *ex vitro*, el cual hace posible la formación de raíces y la aclimatación de manera simultánea evitando el exceso de callo en la base de las estacas y asegurando una conexión vascular continua de la raíz con el vástago. Con este método es necesario que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse (Briones, 2015).

- ***Fase 4: Aclimatación***

Las plantas cultivadas *in vitro* se trasladan a un invernadero bajo condiciones controladas (de humedad, temperatura y luz) y donde se le proporciona el requerimiento nutricional necesario. La fase de aclimatación es un proceso que busca adaptar a la planta a vivir fuera de la condición *in vitro*, mediante el cambio de condiciones ambientales y nutricionales de manera paulatina para que la planta vaya aumentando su capacidad fotosintética, ejerza la regulación estomática y se vaya fortaleciendo para luego ser sembrada en campo (Gisbert y Picó, 2015).

**e) Riesgos en el proceso de la micropropagación**

La contaminación por microorganismos durante la micropropagación es muy común, en algunas ocasiones provocan pérdidas de hasta un 90 % en las diferentes fases del cultivo *in vitro*. Según Hernández y González (2010) las principales fuentes de contaminación pueden tener dos orígenes: por microorganismos que colonizan la superficie o el interior de explante (endófito) y durante la manipulación de las operaciones en el laboratorio.

Los patógenos contaminantes más frecuentes, son por lo general hongos, bacterias y levaduras. Estos organismos son dañinos para el cultivo de tejidos vegetales, porque compiten con el explante por los nutrientes del medio (Mroginski et al., 2010), incluso pueden colonizar los

tejidos vegetales o expulsar metabolitos tóxicos al medio de cultivo provocando en algunos caso la muerte de las plántulas (Leifert et al., 1994, como se citó en Lima, 2016, p. 57).

#### **f) Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son un elemento fundamental porque permiten el desarrollo de plantas *in vitro*, contienen una porción balanceada de nutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa, agua y agar como agente gelificante para darle una consistencia sólida, incluso se suelen agregar otros compuestos de uso específico dependiendo de lo que se quiera alcanzar; estos compuestos suelen utilizarse en cantidades muy pequeñas en mg/l (Gisbert et al., 2010).

En la actualidad existe una gran variedad de medios de cultivo siendo el de Murashige y Skoog de 1962 el más ampliamente utilizado, pero la elección de un medio depende mucho del tipo de especie a cultivar, el tipo de explante, las condiciones de incubación, entre otros; en gran parte es responsable del éxito o del fracaso del proceso. La composición de los medios de cultivo garantiza los compuestos minerales necesarios para las plantas *in vitro* porque su nutrición es heterótrofa, por eso, las condiciones nutricionales debe ser muy parecido a lo que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural (Boeri, 2015).

#### **g) Sales minerales**

Las sales minerales que se suele utilizar en los medios de cultivo son compuestos inorgánicos que proporcionan los 17 elementos esenciales que la planta requiere para su crecimiento y desarrollo normal, estos se encuentran agrupados en macronutrientes (C, O, H, N, K, Ca, P, Mg y

S) y micronutrientes (Fe, Ni, Cl, Mn, Zn, B, Cu y Mo). Los macronutrientes son requeridos en mayor cantidad que los micronutrientes (Indacochea et al., 2019).

#### **h) Vitaminas**

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo celular, su ausencia en el cultivo *in vitro* constituye un factor limitante para el crecimiento, normalmente son sintetizadas por las plantas pero en este caso son adicionadas al medio porque el explante no las sintetiza; son requeridas en pequeñas cantidades y de acuerdo a la especie (Boeri, 2015).

A continuación se mencionan las vitaminas más empleadas en el cultivo de tejidos vegetales, según Boeri (2015), Ugarte et al. (2016) y Suárez (2020).

- ***Tiamina***. Es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Su presencia es necesaria para que las células vegetales puedan realizar sus funciones vitales y esencial para el crecimiento de las mismas.

- ***Ácido nicotínico***. Estimula el crecimiento de la planta a través de su participación como componente de coenzimas que actúan en las reacciones de energía. Además, tiene un efecto sinérgico con el AIA en la producción de raíces y ejerce acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares.

- ***Piridoxina***. Participa en la síntesis de purinas y pirimidinas, por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía.

- *Myo-inositol*. Es un azúcar alcohol, se agrega como suplemento de la sacarosa. Es parte integral de varios tipos de membranas de algunos organelos como los cloroplastos. Estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales.

- *Ácido ascórbico*. Es añadido a los medios de cultivo no como vitaminas sino como antioxidante para evitar la oxidación fenólica que suele manifestarse mediante el oscurecimiento del tejido (Suárez, 2020) y generalmente precede a la inhibición del crecimiento, en casos graves a la necrosis y muerte del tejido. Con este mismo fin, también se puede agregar ácido cítrico.

### **i) Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento son hormonas vegetales de origen natural o sintético, cumplen un papel importante al regular los diferentes procesos bioquímicos a nivel celular, relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas. El efecto de una hormona no se caracteriza por ser específica, su acción puede derivar en varios efectos diferentes, incluso, con la presencia y acción conjunta de otra hormona puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a las concentraciones entre sí (Jordán y Casaretto, 2006)

Las hormonas sintéticas, al igual que las naturales promueven e inhiben el crecimiento y el desarrollo vegetal, “algunas de ellas provocan una respuesta más intensa que los compuestos naturales y a la misma concentración molar” (Jordán y Casaretto, 2006, p. 1). Según Alcántara et al. (2019) los reguladores de crecimiento son clasificados según su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes, entre otras clasificaciones. En la Tabla 1 se muestra la clasificación de los reguladores de crecimiento más usados en la actualidad para la micropropagación.

**Tabla 1.**

*Clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal*

<b>Hormona</b>	<b>Efecto a nivel vegetal</b>	<b>Efecto a nivel celular</b>
Auxinas - AIA - AIB - 2,4-D - ANA	- Formación y elongación de tallos - Producción de diferentes raíces adventicias - Aumento de la dominancia apical	- División y elongación celular - Diferenciación celular - Promueve la división celular meristemática - Aumenta contenido osmótico celular - Aumenta la permeabilidad celular - Disminución de la presión de la pared celular.
Citocininas - K - Zea - BAP	- Estimula la generación de brotes axilares a nivel vegetal - Estimula el desarrollo fotomorfogénico vegetal - Induce la iniciación y elongación de raíces - Activa la senescencia de las hojas	- Pueden sustentar e iniciar la proliferación de tejidos - Permite producir una alta proliferación y división celular - Se produce con mayor abundancia en las células de los ápices radiculares

*Nota.* Auxinas: Ácido 3-indol-acético (AIA), ácido indol-butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (NAA o ANA); Citoquininas: Zeatina (Zea), Kinetina (K), 6-Bencilaminopurina (BAP). Fuente. Alcántara et al. (2019, p.112).

**j) Fuente de carbono**

Los cultivos de tejidos vegetales en su mayoría tienen un comportamiento heterótrofo, por ello, se les suministra una fuente de carbono a través de la sacarosa o azúcar común a concentraciones del 2 a 5 % para satisfacer su demanda y garantizar su desarrollo; en algunos casos se la puede remplazar por glucosa, maltosa o galactosa (Mroginski et al., 2010).

**k) Agente gelificante**

El gelificante que se utiliza es el agar – agar, un polisacárido natural extraído de algas rojas del género *Gelidium*; suele ser un sólido que al añadirse a un medio de cultivo se disuelve por calentamiento fuerte (85-100 °C) y hace que el medio adquiera una consistencia sólida al enfriarse a temperatura ambiente (menores a 45 °C), su solidificación es estable a temperaturas de

incubación, no reacciona con los constituyentes del medio y tampoco interfiere en la movilización de los componentes del medio de cultivo (Cruz, 2012).

### **l) Agua**

El agua utilizada en la preparación del medio de cultivo requiere de una purificación por destilación, desionización e incluso purificada por osmosis inversa, debido a que contiene diversos elementos disueltos, partículas sólidas y microorganismos que afectan la calidad del medio de cultivo (Suárez Padrón, 2020, p. 43).

### **2.2.2. Descripción de la *C. officinalis***

#### **a) Taxonomía de la especie.** Según el Catalog of Life (2023)

Reino : Plantae  
Filo : Tracheophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Orden : Gentianales  
Familia : Rubiaceae  
Género : *Cinchona*  
Especie : *Officinalis*

Nombre científico: *Cinchona officinalis* L.

Nombre común: Árbol de la quina, quina y cascarilla

## b) Descripción botánica

Según Villar et al. (2018) describe las características morfológicas de la especie:

- **Arquitectura y corteza.** Son árboles medianos que alcanzan una altura de 11 a 16 m y un diámetro de 28 a 61 cm; presentan una ramificación simpodial al segundo tercio, su copa es globosa y densa. Su corteza externa es de color gris a marrón plomizo con presencia de grietas, la corteza interna es de color crema, pero se oxida rápidamente pasando a un color marrón con tonalidades rojizas y oscuras.

- **Ramita terminal, hojas y estipulas.** Ramita terminal de sección circular, glabras y de color morado; cuando se lignifican son de color marrón, además presentan cicatrices foliares y anillos circulares. Sus hojas son simples, opuestas decusadas, elípticas ha ovado-elípticas, con ápice acuminado, base obtusa, borde entero ligeramente sinuoso, venación principal pronunciada con 6 a 8 pares de nervios secundarios, las láminas son de consistencia coriácea, haz y envés glabro. Cuando maduran cambian de color verde a vino tinto, púrpura, morado o rojizo, alcanzan una longitud de 10 a 17 cm y un ancho de 6 a 12 cm.

Presenta estipulas en las partes apicales de las ramas superiores de la copa, estas estructuras protegen en un inicio a las hojas en desarrollo, miden de 1,7 a 4,2 cm de longitud y de 1,1 a 2,1 cm de ancho; cuando envejecen pasan del color verde a un color rojizo, posteriormente estas se desprenden de la rama dejando cicatrices en forma de anillos.

- **Inflorescencias y flores.** Presenta una inflorescencia en panícula terminal de 11,3 a 19,0 cm de longitud. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, epígenas y pediceladas; cáliz gamosépalo, persistente y regular con 5 lóbulos pequeños; corola gamopétala del tipo campanulada

con 5 lóbulos reflexos triangulares con pubescencia en su cara externa; androceo conformado por 5 estambres inclusos, unidos a la base de la corola por medio del filamento, son de color crema, con inserción medifija y dehiscencia longitudinal; gineceo ligeramente excluido, con ovario ínfero y con cáliz persistente que da origen al fruto.

- **Frutos.** Los frutos son secos, de tipo cápsula, de forma oblonga a ligeramente falcada, miden de 0,4 a 3,5 cm de longitud y de 0,4 a 2,4 cm de ancho, son bicarpelar con dehiscencia longitudinal, conteniendo de 37 a 85 semillas aladas.

### c) Usos de la especie

La corteza es usada para preparar infusiones para curar el paludismo, las fiebres, los resfríos, para lavar y desinfectar heridas de la piel, para hacer gárgaras ante faringitis y evitar infecciones de las vías respiratorias, además, favorece la digestión porque ayuda a la secreción de bilis (Reynel et al., 2006), también ayuda a aliviar dolores y afecciones bucales, los dolores reumáticos (Bussmann y Sharon, 2015), ante la pérdida del apetito y la indigestión (Gupta y Calderón, 2006).

En la industria farmacéutica se usa para extraer sus alcaloides, como es el caso de la quinina, que es empleada en la fabricación de medicamentos (Pacheco y Carrera, 2008, p. 4). y de tinturas como loción capilar para combatir la caspa y seborrea (Burgstaller, 1986, p. 107).

En la industria de los alimentos es empleada para la fabricación agua tónica y del amargo de angostura, este último es usado en la preparación de bebidas, así como en la cocina (Jiménez et al., 2019). La corteza en polvo también se emplea para elaborar vinos de quina (Burgstaller 1986, p. 107).

Con respecto a otros usos: las flores y hojas secas, son utilizadas en infusión para combatir la tos, las raíces frescas en el tratamiento contra el cáncer (Bussmann y Sharon, 2015), la madera es empleada para la fabricación de puertas, ventanas y ebanistería (Reynel et al., 2006).

#### **d) Distribución geográfica**

La *C. officinalis* o “árbol de la quina” es una especie forestal que pertenece al género *Cinchona* y a la familia botánica Rubiaceae. El género *Cinchona* es originario de los Andes de Sudamérica y se encuentra distribuido desde el país de Costa Rica hasta Bolivia en un rango altitudinal que va desde los 1000 m s.n.m. hasta los 3150 m s.n.m. Se han reportado 24 especies en total, de las cuales el Perú es el país que más especies alberga en su territorio con un total de 18 (Aymard, 2019), seguido por el Ecuador con 12, y los demás países con menor número de especies.

De acuerdo con Zevallos (1989) y Fernández (2017), la *Cinchona* en el Perú se encuentran ampliamente distribuido en los bosques montanos y pre montanos a ambos lados de la cordillera de los Andes, en un rango altitudinal que va desde los 300 m s.n.m. para el caso de la *C. micrantha* Ruiz y Pav. hasta los 3500 m s.n.m. para la *C. pubescens* Vahl.

En el caso de la *C. officinalis*, Zevallos (1989) menciona que tiene una distribución amplia y que se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cajamarca, Piura, Lambayeque, San Martín, Huánuco, Pasco, Junín, Madre de Dios y Puno, entre los 1000 y 3150 m s.n.m., pero Huamán et al. (2019) menciona que esta especie es de hábitat restringido que solo se encuentra en las regiones de Piura y Cajamarca según sus observaciones en campo y el análisis de modelamiento de hábitat que empleó para obtener una delimitación más acertada de la especie, sin embargo, Gómez et al. (2016) también ha reportado su presencia en Lambayeque en el distrito de Kañaris.

En la región de Cajamarca se encuentra en las provincias de Chota, Cutervo, Santa Cruz y Jaén en bosques húmedos montano bajo tropical (bh-MBT) y montano tropical (bh – MT) entre los 2 400 a 3000 m s.n.m. (Villar et al., 2018)

### **2.2.3. Propagación de la *C. officinalis***

#### **a) Propagación sexual**

La reproducción sexual es la principal vía de propagación la *C. officinalis* en su hábitat natural, sus semillas poseen una característica morfológica que le permite dispersarse (son pequeñas y aladas) con facilidad, tienen un alto contenido de humedad alrededor del 81 % y son recalcitrantes y (Caraguay et al., 2016), además presenta un bajo poder de germinación de 30 % y 40 % (Vásquez et al., 2018; Jerez, 2017), con la incorporación de micorrizas según ensayos de germinación realizados en vivero alcanza valores de hasta 70 %.

En ensayos de laboratorio, su porcentaje de germinación varía desde un 50 % y 70 % (Caraguay et al., 2016) y aplicando algunos criterios en el momento de la colecta, considerando la pureza, calidad de la semilla, el tipo de almacenamiento y tratamientos pregerminativos se alcanzan valores de germinación de hasta un 96 % caso contrario la producción de plantas es menor (Villar et al., 2018).

#### **b) Propagación asexual**

La propagación asexual o vegetativa es una técnica que permite obtener nuevos individuos con las mismas características fenotípicas de la planta madre. Es aplicada en diversas especies vegetales teniendo como base la existencia de tejidos meristemáticos que poseen una alta

capacidad de división celular y la presencia de hormonas que influyen en la formación de raíces y en su desarrollo hasta llegar a formar una planta completa. En esta técnica se emplea esquejes, estacas, acodos aéreos e injertos (Osuna et al., 2017).

En la *C. officinalis* se ha aplicado ensayos con estacas y esquejes, pero aún no se ha logrado inducir o estimular el enraizamiento, incluso aplicando hormonas según lo mencionan varios autores como, Aldaz y Ochoa (2011), Conde et al. (2017) y Vásquez et al. (2018). En el caso de acodos aéreos se ha logrado estimular el enraizamiento hasta un 50 % solo utilizando materia orgánica como sustrato (Conde, 2016).

Posiblemente, la existencia de compuestos químicos como los alcaloides, taninos y los compuestos fenólicos presentes en la corteza de las *C. officinalis* actúan inhibiendo el enraizamiento de estacas. Latsague y Lara (2003) menciona que los compuestos fenólicos producidos en la planta a altas concentraciones son responsables de que las estacas no enraícen, porque inducen la oxidación de las auxinas que ocasionan la muerte celular en la parte del corte, otros factores como, la edad de las plantas leñosas que suele ser una desventaja en el enraizamiento.

### **2.3. Definición de términos básicos**

- **Auxinas.** Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas) que inducen la formación de raíces, provocan elongación y en algunos casos la división celular, (Perea, 2009).
- **Citoquininas.** Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas) que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias (Perea, 2009).

- **Explante.** Es una parte o segmento de un órgano o tejido vegetal que ha sido separada de una planta y transferido a un medio de cultivo artificial para su crecimiento, multiplicación o conservación (Ruscitti, 2017).
- **Fenolización.** Es la oxidación de compuestos fenólicos liberados por las células dañadas durante los cortes o durante el tratamiento de desinfección. Los productos de la oxidación son tóxicos para el resto del explante y se difunden en el medio de cultivo oscureciéndolo. Este problema se presenta mayormente en especies leñosas debido a que sus tejidos son más ricos en compuestos fenólicos. Algunas de las técnicas para reducir este problema son mediante la utilización de sustancias antioxidantes (Villarreal y Cadima, 2016).
- **Reguladores de crecimiento.** Son compuestos sintetizados químicamente, producen efectos a nivel celular en muy bajas concentraciones al igual que las hormonas naturales cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales, permitiendo su control y su repercusión a nivel fenotípico (Alcántara et al., 2019).
- **Medio de cultivo.** Es una solución nutritiva que funciona como sustrato y fuente energética para el desarrollo de los tejidos. Están constituidos por minerales, compuestos orgánicos, agua, agar-agar como materiales de soporte (Suárez, 2020, p. 42).
- **Micropropagación.** Es la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, usando recipientes plásticos o de vidrio, técnicas de asepsia y un medio de crecimiento definido (De Bartolini y Lallana, 1995).
- **Principio de totipotencia.** Es la capacidad de la célula para generar una planta idéntica, esto es posible, debido que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella (Ferl y Paul, 2000, como se citó en Calva y Pérez, 2005).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación geográfica del laboratorio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (pabellón “2G” ambiente 309) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. Esta casa superior de estudios se ubica en la Av. Atahualpa N°1050 en la ciudad capital de la provincia y región de Cajamarca geográficamente entre las coordenadas 07°10'03" de latitud y 78°29' 35" de longitud a una altitud de 2536 m s.n.m (Estación meteorológica Augusto Weberbauer).

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1. *Materiales experimentales*

- Explantes (yemas apicales y segmentos nodales) de plantas de *C. officinalis*
- Medio de cultivo: Murashige y Skoog 1962
- Hipoclorito de sodio (NaClO)
- Reguladores de crecimiento (BAP, AIA, ANA y AIB)

### 3.2.2. *Materiales, equipos e insumos*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>
- Probeta	- Agitador magnético	- Agar - agar
- Matraz	- Balanza analítica	- Alcohol
- Frascos de siembra	- Autoclave	- Lejía
- Mechero de alcohol	- Cocina eléctrica	- Jabón carbólico
- Bisturí	- pH metro	- Ron de quemar
- Pinzas	- Destilador de agua	- Agua destilada
- Parafilm	- Cabina de flujo laminar	- Sacarosa
- Papel Aluminio	- Cámara de incubación	- Vitaminas

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. *Variables de estudio*

**Tabla 2.**

*Variables de estudio*

	<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Variables independientes	- Hipoclorito de sodio NaClO - Reguladores de crecimiento (BAP, AIA, ANA y AIB)	- Concentraciones del soluto por unidad de volumen (mg/l)
Variables dependientes	- Supervivencia de explantes	- Porcentaje de contaminación - Porcentaje de fenolización - Número de brotes - Longitud de brotes - Número de raíces - Longitud de raíces - Porcentaje de enraizamiento

### 3.3.2. *Diseño experimental*

El diseño experimental empleado fue el Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones, el cual permite poder realizar el análisis estadístico y así comprobar si existen diferencias en las medias de los tratamientos empleados durante la micropropagación de la *C. officinalis*. En las Tablas 3, 5 y 7 se presentan los tratamientos a evaluar, para determinar la concentración más adecuado de NaClO y de los reguladores de crecimiento en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.

Modelo lineal del diseño experimental:

$$Y = u + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i=1,2,\dots,t$  = número de tratamientos

$j=1,2,\dots,r$  = número de repeticiones por tratamiento

$u$  = el verdadero efecto medio

$\tau_i$  = es el efecto del  $i$  – enésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental  $i,j$

### 3.3.3. *Procedimientos*

#### *Fase 0: Selección de plantas madre*

Se seleccionaron plantones de *C. officinalis* propagadas en vivero, aproximadamente de un año de edad, de 20 cm de altura, vigorosas, libres de plagas y enfermedades (Figura 1), procedentes de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca – INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria).

#### **Figura 1.**

*Plantones de C. officinalis*



#### *Medios de cultivo*

- **Medio para establecimiento (ME-01).** En la preparación del medio de establecimiento se empleó la formulación de Murashige y Skoog de 1964 (Anexo 4), suplementado con vitaminas (Tiamina, Mio- Inositol, Piridoxina, Ácido Nicotínico y Glicina), sacarosa 30 g/l, pH 5,8 y agar 12 g/l; solución que se dispensó en frascos de vidrio para ser esterilizada en autoclave a una temperatura de 121 °C por 20 min.

- **Medio para multiplicación (MM-02).** La preparación del medio de cultivo se realizó con la formulación de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas (Tiamina, Mio-Inositol, Piridoxina, Ácido Nicotínico y Glicina), sacarosa 30 g/l, más la incorporación de reguladores de crecimiento AIA + BAP (Tabla 4), el pH 5,8 y agar 12 g/l; la solución se dispuso en frascos de vidrio para ser esterilizada en autoclave a una temperatura de 121 °C por 20 min.
- **Medio para enraizamiento (MR-03).** Se empleó la formulación de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas (Tiamina, Mio-Inositol, Piridoxina, Ácido Nicotínico y Glicina), sacarosa 30 g/l, más la incorporación de los reguladores de crecimiento: ANA + AIB (Tabla 6), el pH 5,8 y agar 12 g/l; la solución se dispuso en frascos de vidrio para ser esterilizada en autoclave a una temperatura de 121 °C por 20 min.

### ***Fase 1: Desinfección y establecimiento de explantes***

Esta fase se inicia con la obtención de explantes de 15 mm de longitud provenientes de los plantones propagados en vivero, a los explantes obtenidos antes de la desinfección se realizó un lavado con jabón carbólico (6 000 ppm) y alcohol etílico (70 %).

Los tratamientos de desinfección de explantes se realizó con NaClO (Tabla 3). El tiempo de inmersión para cada tratamiento fue de 10 min, seguido de tres lavados con agua estéril.

**Tabla 3.**

*Tratamientos para la desinfección de explantes con hipoclorito de sodio*

Variable	Tratamientos	Concentración	Tiempo de inmersión
- Hipoclorito de sodio (NaClO)	T0	0 %	10 min
	T1	1,5 %	
	T2	2,0 %	
	T3	2,5 %	

Una vez desinfectado los explantes se procedió a realizar la siembra, esta actividad se desarrolló dentro de la cabina de flujo laminar (Figura 2), los explantes fueron colocados en medio de cultivo ME-01, después de la siembra los frascos fueron sellados, etiquetados y distribuidos según el diseño completamente al azar en el área de crecimiento del laboratorio, a una temperatura de 23 °C y con fotoperiodo 12 h luz por un periodo de 60 días.

Se tomaron datos cada 15 días después de la siembra, para evaluar el efecto del NaClO. Los indicadores a evaluar (Anexo 1) fueron: el número de explantes contaminados (por hongos o bacterias), sanos y fenolizados.

**Figura 2.**

*Proceso de desinfección y establecimiento de explantes*



*Nota.* Obtención de explantes (A). Desinfección de los explantes (B). Siembra de explantes (C).

## ***Fase 2: Multiplicación***

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron en la Fase 1 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. La siembra se realizó colocando cinco explantes de un tamaño aproximado de 5 mm de longitud en cada frasco de vidrio que contenían el medio MM-02; después de la siembra los frascos fueron sellados, etiquetados de acuerdo a los tratamientos (Tabla 5) y distribuidos según el diseño completamente al azar en el área de crecimiento del laboratorio, a una temperatura de 23 °C y con fotoperiodo 12 h luz por un periodo de 60 días.

Se tomaron datos cada 15 días después de la siembra, para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento (Tabla 4). Los indicadores a evaluar (Anexo 2) fueron: número de brotes, longitud y porcentaje de fenolización.

**Tabla 4.**

*Concentración de los reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación*

<b>Variable</b>	<b>Medio de cultivo + reguladores de crecimiento</b>	<b>Concentración</b>
Auxina	MS + Ácido 3-indol-acético (AIA)	0,2 mg/l
		0,4 mg/l
		0,8 mg/l
Citoquinina	MS + 6-Bencilaminopurina (BAP)	0,3 mg/l
		0,6 mg/l
		1,2 mg/l

**Tabla 5.**

*Tratamientos para determinar el balance hormonal en la fase de multiplicación*

Tratamientos	Concentración	
	AIA	BAP
T0	0 mg/l	0 mg/l
T1	0,2 mg/l	0,3 mg/l
T2	0,2 mg/l	0,6 mg/l
T3	0,2 mg/l	1,2 mg/l
T4	0,4 mg/l	0,3 mg/l
T5	0,4 mg/l	0,6 mg/l
T6	0,4 mg/l	1,2 mg/l
T7	0,8 mg/l	0,3 mg/l
T8	0,8 mg/l	0,6 mg/l
T9	0,8 mg/l	1,2 mg/l

### ***Fase 3: Enraizamiento***

En esta fase se espera que cada explante genere raíces; actividad que se realiza dentro de una cabina de flujo laminar, se colocaron 5 explantes de un tamaño aproximado de 20 mm por frasco con medio MR-03; posteriormente los frascos fueron sellados, etiquetados de acuerdo a los tratamientos (Tabla 7) y distribuidos según un diseño completamente al azar en el área de cultivo y crecimiento del laboratorio, que se encuentra a una temperatura de 23 °C y con fotoperiodo 12 h luz por un periodo de 60 días.

Se realizó evaluaciones cada 15 días después de la siembra, para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento (Tabla 6). Los indicadores evaluados (Anexo 2) fueron: número de raíces, longitud, porcentaje de enraizamiento y porcentaje de supervivencia.

**Tabla 6.***Concentración de los reguladores de crecimiento para la fase de enraizamiento*

<b>Variable</b>	<b>Medio de cultivo MS + reguladores de crecimiento</b>	<b>Concentración</b>
<b>Auxinas</b>	Ácido 3 indol-butírico (AIB)	1,0 mg/l
		1,5 mg/l
		2,0 mg/l
	Ácido 1-naftalenacético (ANA)	1,0 mg/l
		1,5 mg/l
		2,0 mg/l

**Tabla 7.***Tratamientos para determinar el balance hormonal en la fase de enraizamiento*

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración de auxina</b>	
	<b>AIB</b>	<b>ANA</b>
T0	0 mg/l	0 mg/l
T1	1,0 mg/l	1,0 mg/l
T2	1,0 mg/l	1,5 mg/l
T3	1,0 mg/l	2,0 mg/l
T4	1,5 mg/l	1,0 mg/l
T5	1,5 mg/l	1,5 mg/l
T6	1,5 mg/l	2,0 mg/l
T7	2,0 mg/l	1,0 mg/l
T8	2,0 mg/l	1,5 mg/l
T9	2,0 mg/l	2,0 mg/l

**3.3.4. Análisis estadístico**

Después de la evaluación del proceso experimental, se realizó el análisis estadístico y la prueba de comparación múltiple de Tukey para los indicadores planteados en la investigación, analizando datos cuantitativos como el número de explantes contaminados, fenolizados y la supervivencia de explantes en la desinfección (Anexo 5); número y longitud de brotes, número y longitud de raíces y el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de multiplicación (Anexo 6) y enraizamiento (Anexo 7). El procesamiento de datos se realizó con el Software estadístico “InfoStat”.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes

##### 4.1.1. Contaminación de explantes

La Tabla 8 presenta el análisis de varianza relacionado al porcentaje de contaminación de explantes, en ella se demuestra que existe una diferencia altamente significativa entre tratamientos al ser  $p < 0,0001$  y menor al valor del nivel de significancia de 0,05; según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 9) existente dos rangos (a y b) con una Diferencia Mínima Significativa (DMS) igual a 30,10. El testigo (T0) superó el valor de la DMS y presentó el 83,33% de contaminación debido a que no recibió tratamiento con NaClO, mientras que el T1 (1,5 % NaClO) alcanzó un valor de 27,78 %; a mayor concentración del desinfectante en el T2 (2 % NaClO) y T3 (2,5 % NaClO) se obtuvo menor porcentaje de contaminación 5,56 % y 0 % respectivamente.

**Tabla 8.**

*Análisis de varianza de la contaminación de explantes.*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	39097,22	3	13032,41	23,46	<0,0001
Error	17777,78	32	555,56		
Total	56875,00	35			

**Tabla 9.**

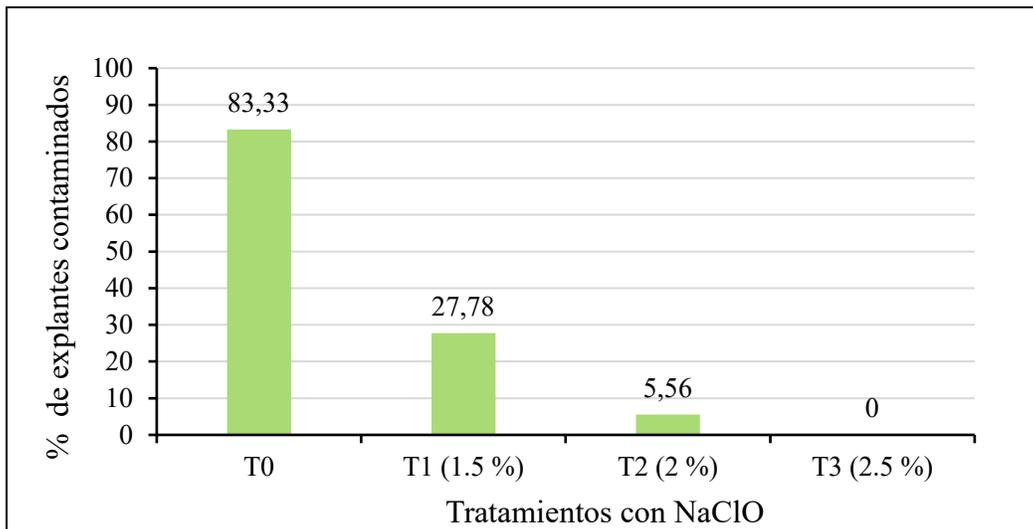
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la contaminación de explantes*

Tratamientos	% de explantes contaminados	n	E.E.	
T0	83,33	9	7,86	a
T1	27,78	9	7,86	b
T2	5,56	9	7,86	b
T3	0,00	9	7,86	b

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  el Error estándar (E.E.). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ); valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=30,10; Error: 555,5556 y GL: 32.

**Figura 3.**

*Porcentaje de contaminación de explantes*



*Nota.* La gráfica muestra el efecto del desinfectante, donde la contaminación disminuye a medida que aumenta la concentración del NaClO.

#### **4.1.2. Fenolización de explantes**

El análisis de varianza (Tabla 10) con respecto a la fenolización presenta una diferencia altamente significativa entre tratamientos ( $p < 0,0001$ ); según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 11) presenta tres rangos (a, b y c), donde las medias de los tratamientos superan el valor de la DMS=31,48 a excepción del T1 (1,5 % NaClO) y el T2 (2 % NaClO) que

presentaron resultados casi similares 38,89 % y 33,33 %, es por ello que no son significativamente diferentes entre sí. El T3 (2,5 % NaClO) presentó un elevado porcentaje de fenolización como consecuencia de una mayor concentración del desinfectante.

**Tabla 10.**

*Análisis de varianza de la fenolización de explantes*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	23611,11	3	7870,37	12,95	<0,0001
Error	19444,44	32	607,64		
Total	43055,56	35			

**Tabla 11.**

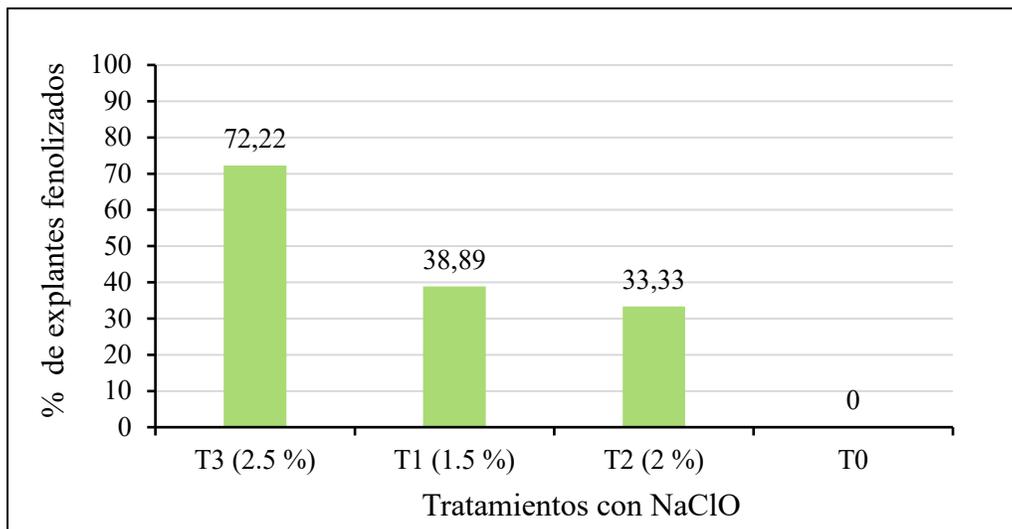
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la fenolización de explantes*

Tratamientos	% de explantes fenolizados	n	E.E.	
T3	72,22	9	8,22	a
T1	38,89	9	8,22	b
T2	33,33	9	8,22	b
T0	0,00	9	8,22	c

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ); valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=31,48; Error: 607,6389 y GL: 32.

**Figura 4.**

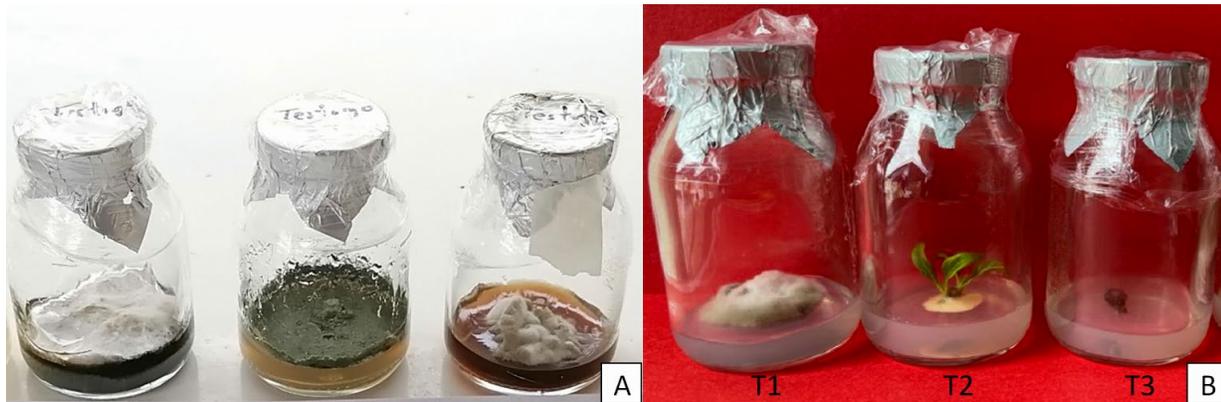
*Porcentaje de explantes fenolizados*



*Nota.* El gráfico expone que la fenolización es mayor a medida que aumenta la concentración del NaClO.

**Figura 5.**

*Problemas presentes durante la fase de desinfección y establecimiento*



*Nota.* Explantes testigo contaminados (A); T1: Explante contaminado por hongo, T2: Explante vivo, pero contaminado con bacteria y T3: Explante fenolizados (B).

#### **4.1.3. Supervivencia de explantes**

El análisis de varianza (Tabla 12) realizado para la supervivencia de explantes, demuestra que existe una diferencia significativa entre tratamientos ( $p = 0,0266$ ); según la prueba Tukey (Tabla 13) existen dos rangos con un DMS=38,74. En el T2 (2 % NaClO) se logró obtener el 61,11 % de explantes vivos y libres de patógenos, siendo este tratamiento significativamente diferente al T0, pero similar con el T1 y T3. El bajo porcentaje de supervivencia en el T0 demuestra la acción efectiva de NaClO en la desinfección de explante.

**Tabla 12.**

*Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en la desinfección*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Tratamientos	9652,78	3	3217,59	3,50	0,0266
Error	29444,44	32	920,14		
Total	39097,22	35			

**Tabla 13.**

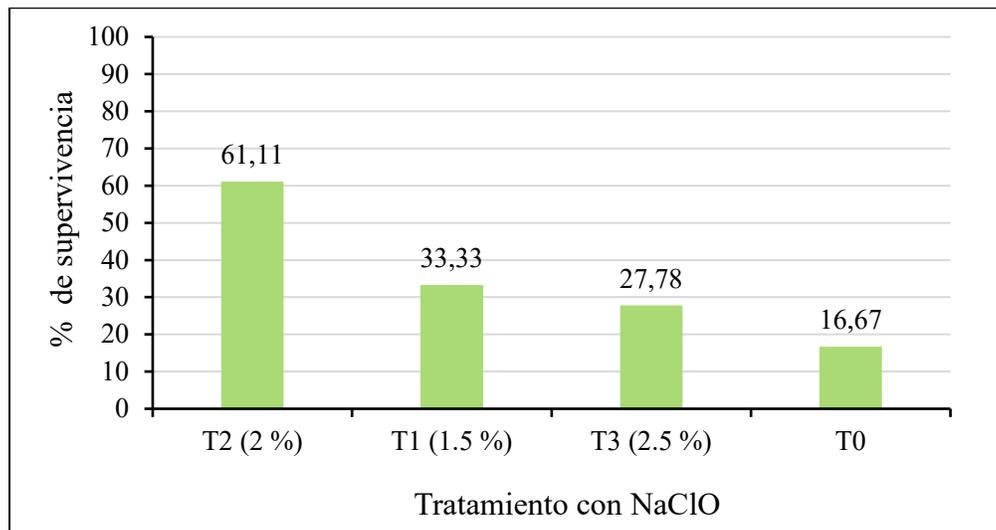
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en la desinfección*

Tratamientos	% de supervivencia	n	E.E.		
T2	61,11	9	10,11	a	
T1	33,33	9	10,11	a	b
T3	27,78	9	10,11	a	b
T0	16,67	9	10,11		b

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ); valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=38,74248; Error: 920,1389 y GL: 32.

**Figura 6.**

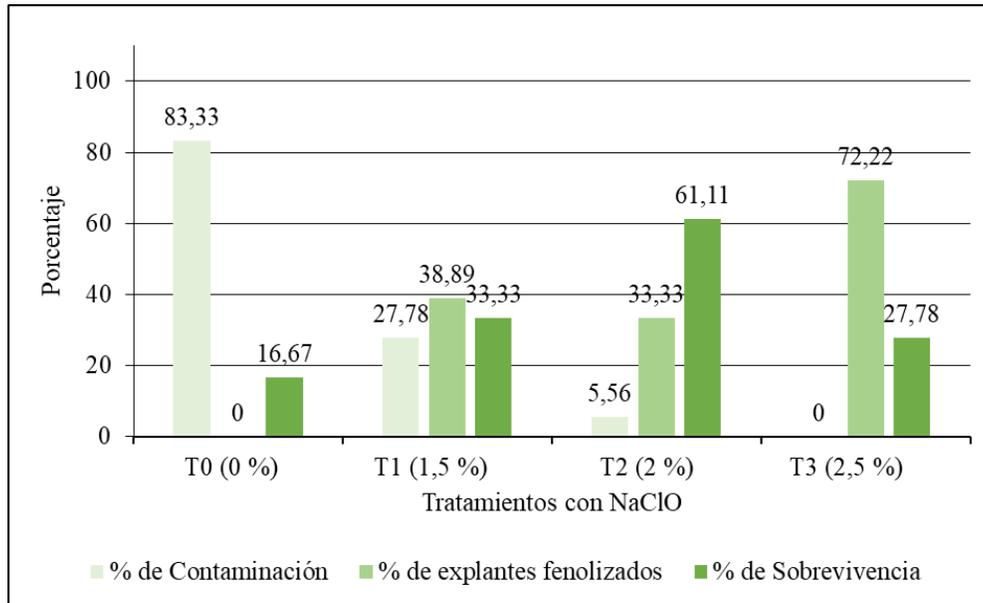
*Porcentaje de supervivencia de explantes en la desinfección*



*Nota.* El gráfico expone una diferencia en el porcentaje de explantes vivos y sanos al emplear NaClO como desinfectante en las concentraciones adecuadas.

**Figura 7.**

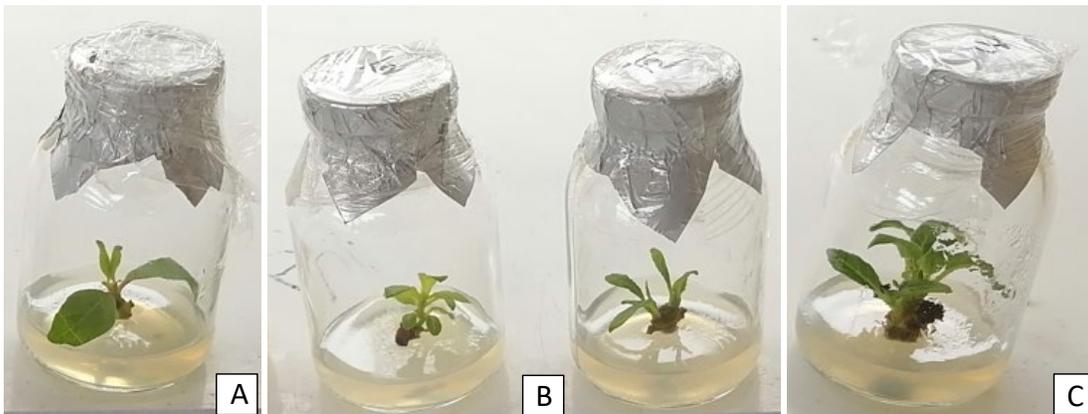
*Efecto del NaClO en la desinfección*



*Nota.* En el gráfico se observar el efecto de NaClO a diferentes concentraciones, el cual favorece en la obtención de explantes sanos.

**Figura 8.**

*Explantes sanos de los tres tratamientos de desinfección*



*Nota.* Explante del tratamiento T1(A). Explantes del tratamiento T2 (B). Explante del tratamiento T3 (C).

La utilización del NaClO en la desinfección de explantes es ampliamente usado por su bajo costo, pero sobre todo por su espectro de acción al ser un potente bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, ya que actúan inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturizando las

proteínas, además libera cloro y oxígeno actuando como agente oxidante contra los microorganismos mencionados (Sánchez y Sáenz, 2005).

Con respecto a la desinfección de explantes no se ha encontrado literatura científica en relación a la especie, sin embargo, los resultados obtenidos en la desinfección con NaClO son similares a los resultados de Lima (2018) y González (2017) durante el establecimiento de la *C. officinalis* a través de semillas, ambos controlan la contaminación al emplear el desinfectante a una concentración del 50 % en tiempos de 5 min, 10 min y 15 min.

En otras especies se empleó este tipo de explantes, según Ramírez et al. (2014) en *Guadua angustifolia* el mejor resultado lo obtuvo con el 2 % de NaClO durante 15 min; para Collado et al., (2004) y Campos (2019) los valores máximos de supervivencia y bajo porcentaje de explantes contaminados y fenolizados de *Swietenia macrophylla* lo consiguieron a una concentración del 3 % y mayor a 10 min de exposición en el desinfectantes.

Para la *C. officinalis* una mayor concentración e incluso mayor tiempo de exposición en el NaClO, provoca mayor daño fitotóxico y tardando más tiempo para recuperarse e iniciar la brotación, como se muestra en el resultado gráfico (Figura 7) donde el T3 (2,5 % NaClO) presenta el 72,22 % de fenolización y 27,78 % de supervivencia. En el caso de González (2017) a mayor concentración del desinfectante, sus semillas presentaron menor porcentaje de germinación, y según Ramírez et al. (2014) sus explantes de bambú tardaron en brotar y otros no brotaron.

Para Ruscitti (2021) la fenolización es resultado de la biosíntesis y la oxidación de los compuestos fenólicos ocasionados por el estrés, los cortes realizados y los métodos agresivos de desinfección, los cuales inhiben el desarrollo y en condiciones extremas provocan la muerte de los

explantes. Por ello, López et al. (2011) recomienda emplear una concentración menor al 3 % para evitar una fenolización excesiva, además el tiempo de exposición debe ser siempre inversamente proporcional a la concentración del desinfectante.

Los resultados más eficientes de desinfección en el establecimiento *in vitro* depende en gran medida de las características de la planta de donde proceden los explantes, la contaminación que puede ser superficial o endógena (Hernández y González, 2010) el tipo de microorganismos (Mroginski et al., 2010), la aplicación de métodos preventivos de desinfección (Castillo, 2004), el tipo, la concentración y el tiempo de exposición de los explantes en el desinfectante (Villalobos y Thorpe, 1993).

## **4.2. Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación**

### **4.2.1 Número de brotes**

El análisis de varianza (Tabla 14) para el promedio de brotes arrojó como resultado un valor de  $p=0,0050$ , esto indica que existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos; mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 15) se manifiestan tres rangos con un DMS=0,81, donde el tratamiento T6 (0,4 mg/l AIA y 1,2 mg/l BAP) es superior a los demás tratamientos y significativamente diferente al T0 al cual no se le aplicó reguladores de crecimiento. Como segundo resultado sobresaliente es el T5 (0,4 mg/l AIA y 0,6 mg/l BAP) el cual difiere de los demás tratamientos que no llegan a superar la DMS con respecto al T0.

**Tabla 14.**

*Análisis de varianza del número de brotes por explante*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	2,82	9	0,31	3,95	0,005
Error	1,59	20	0,08		
Total	4,41	29			

**Tabla 15.**

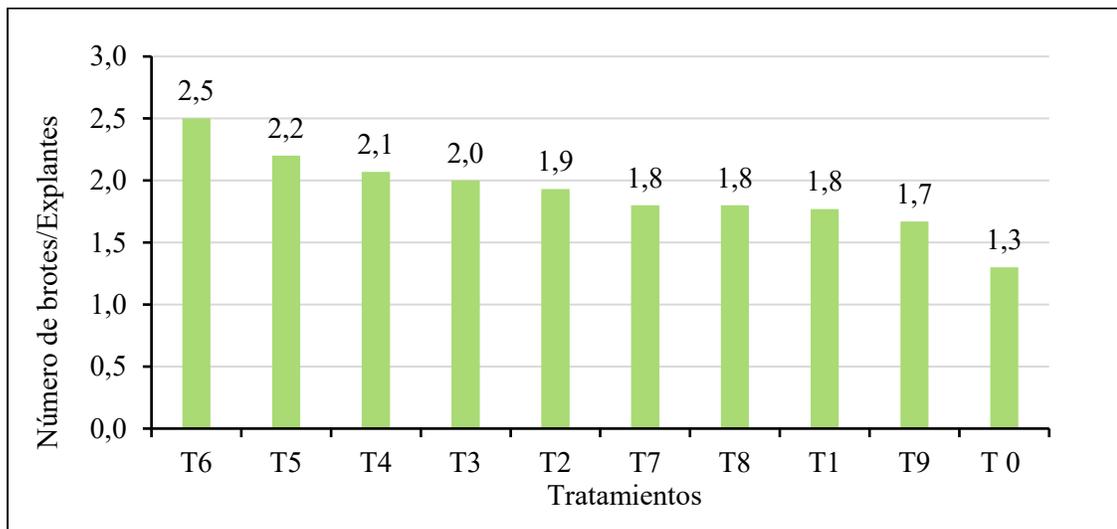
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de brotes por explante*

Tratamientos	Número de brotes/Explantes	n	E.E.		
T6	2,5	3	0,16	a	
T5	2,2	3	0,16	a	b
T4	2,07	3	0,16	a	b c
T3	2	3	0,16	a	b c
T2	1,93	3	0,16	a	b c
T8	1,8	3	0,16	a	b c
T7	1,8	3	0,16	a	b c
T1	1,77	3	0,16	a	b c
T9	1,67	3	0,16		b c
T 0	1,3	3	0,16		c

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ); valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=0,81437; Error: 0,0793 y GL: 20.

**Figura 9.**

*Número de brotes por explante*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

#### 4.2.2 Longitud de brotes

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para la longitud de brotes (Tabla 16) difieren de manera significativa entre tratamientos cuyo valor de  $p=0,0219$ ; mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 17) se evidencian dos rangos con un  $DMS=9,00$ . El tratamiento T6 (0,4 mg/l AIA + 1,2 mg/l BAP) presentó los mejores resultados, seguido por el T8 (0,8 mg/l AIA + 0,6 mg/l BAP) y el T2 (0,2 mg/l AIA + 0,6 mg/l BAP), estos tratamientos a su vez se diferencian significativamente del resto porque no superan la condición del DMS con respecto al T0.

**Tabla 16.**

*Análisis de varianza de la longitud de brotes por explante*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	255,09	9	28,34	2,92	0,0219
Tratamientos	255,09	9	28,34	2,92	0,0219
Error	193,98	20	9,7		
Total	449,07	29			

**Tabla 17.**

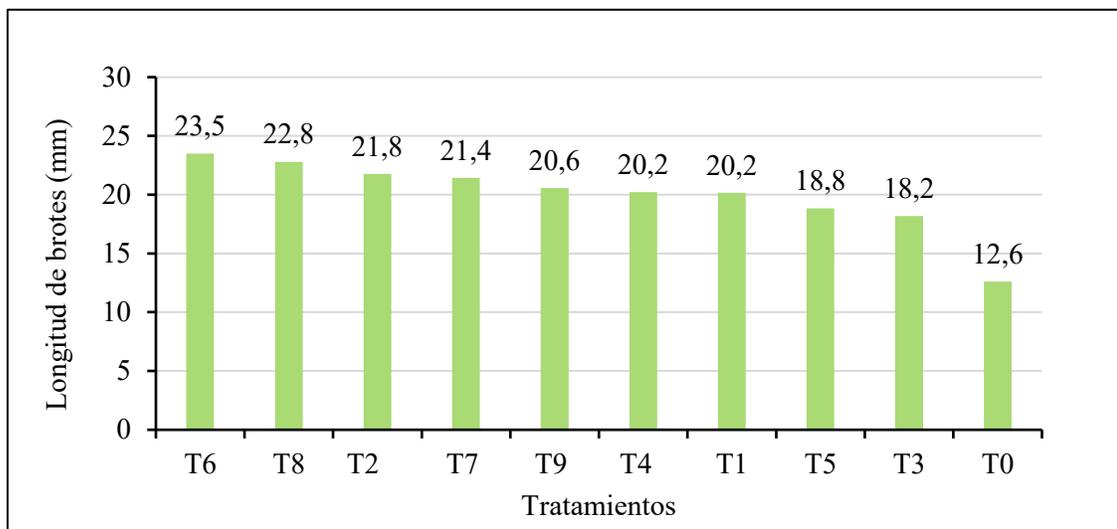
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de brotes por explante*

Tratamientos	Longitud de brotes (mm)	n	E.E.
T6	23,5	3	1,8 a
T8	22,8	3	1,8 a
T2	21,77	3	1,8 a
T7	21,43	3	1,8 a b
T9	20,57	3	1,8 a b
T4	20,23	3	1,8 a b
T1	20,17	3	1,8 a b
T5	18,83	3	1,8 a b
T3	18,2	3	1,8 a b
T0	12,6	3	1,8 b

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ); valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=9,00; Error: 9,6990 y GL: 20.

**Figura 10.**

*Longitud de brotes por explante*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

#### **4.2.3 Supervivencia de explantes en la multiplicación**

Los resultados de la supervivencia de explantes según el análisis de varianzas (Tabla 18) determinan que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p=0,6173$ ) al ser el valor de “p” mayor al nivel de significancia (0,05); en la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 19) tampoco se presenta es diferencia. De todos los tratamientos evaluados el T6 (0,4 mg/l AIA + 1,2 mg/l BAP) alcanzó valores máximos obteniendo el 100 % de explantes vivos, el T3 y el T1 presentaron los valores más bajos con 86,67 % y 83,33 %. Tales resultados alcanzados se lograron sin la incorporación de antioxidantes o de carbón activado para poder controlar la fenolización.

**Tabla 18.**

*Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en la multiplicación*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	603,33	9	67,04	0,8	0,6173
Tratamientos	603,33	9	67,04	0,8	0,6173
Error	1666,67	20	83,33		
Total	2270	29			

**Tabla 19.**

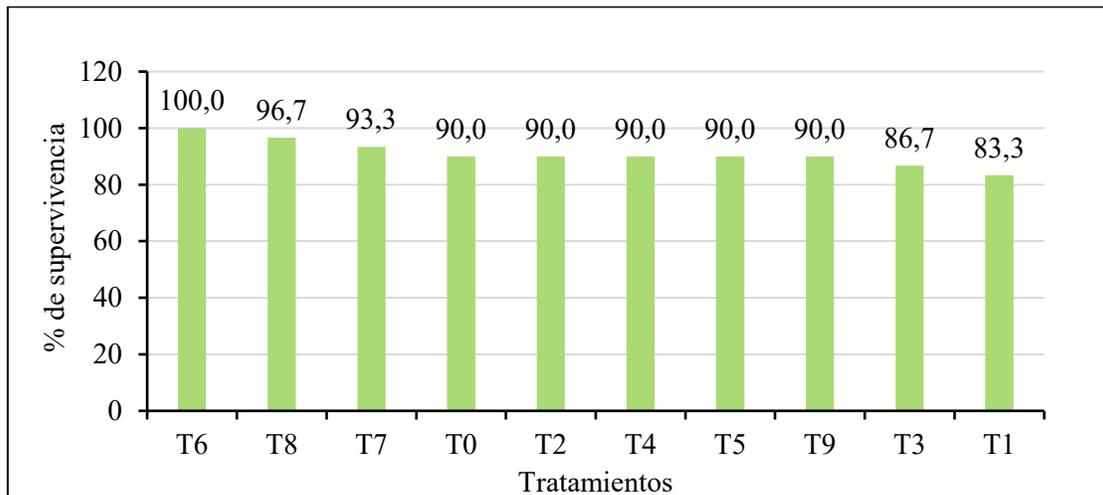
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en la multiplicación*

Tratamientos	% de supervivencia	n	E.E.	
T6	100	3	5,27	a
T8	96,67	3	5,27	a
T7	93,33	3	5,27	a
T9	90	3	5,27	a
T5	90	3	5,27	a
T 0	90	3	5,27	a
T2	90	3	5,27	a
T4	90	3	5,27	a
T3	86,67	3	5,27	a
T1	83,33	3	5,27	a

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=26,39; Error: 83,3333 y GL: 20.

**Figura 11.**

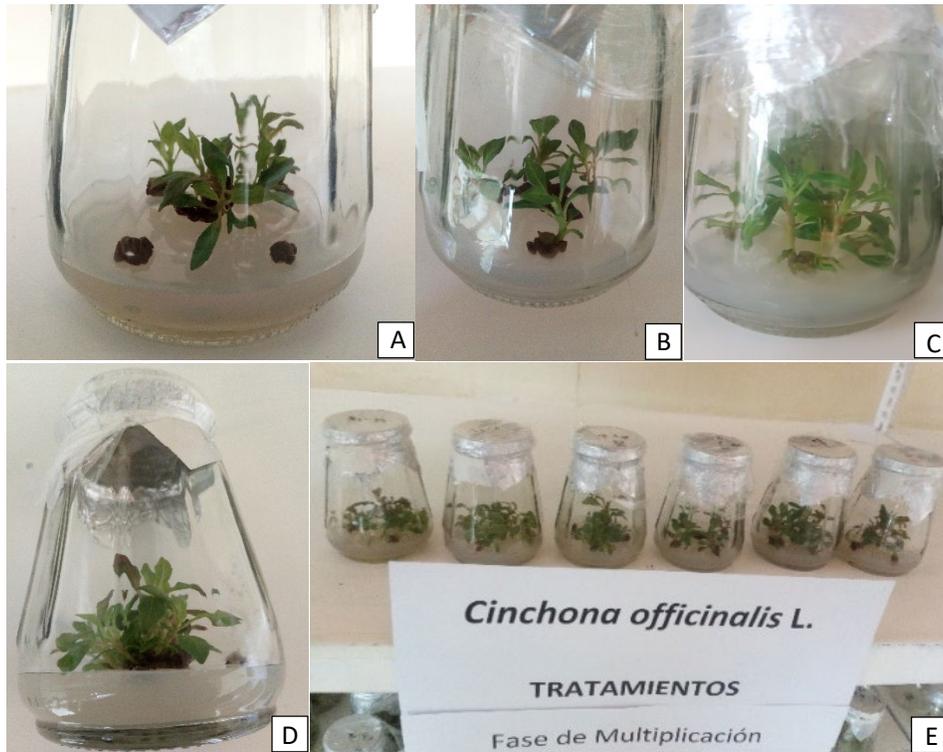
*Porcentaje de supervivencia de explantes en la fase de multiplicación*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

## Figura 12.

*Desarrollo de explantes en la fase de multiplicación.*



*Nota.* Explantes fenolizados (A). Segmento nodal donde se aprecia el brotamiento de una yema axilar y la otra fenolizado (B). Brotamiento de dos yemas axilares de un segmento nodal (C) Explante con más de dos brotes (D). Respuesta de brotamiento en diferentes tratamientos (E).

Los resultados obtenidos en esta fase difieren a los alcanzados en otras investigaciones, los cuales emplearon como material de partida plantas germinadas *in vitro*, explantes de mayor longitud y por un periodo de evaluación de 90 días; mientras que aquí se emplearon explantes de 0,5 a 1cm de longitud, procedentes de vivero y un tiempo de evaluación de 60 días.

Paredes (2019) empleando solo BAP a 2 mg/l y 2,5 mg/l alcanzó valores promedios de 5,03 a 5,87 brotes por explante; otros autores como Lima (2016) y Chamba (2017), empleando BAP (2 mg/l y 2,5 mg/l) + ANA (0,5mg/l) alcanzaron promedio de 4,73 y 6,06 brotes, pero a medida que la concentración del BAP era mayor disminuía el promedio de brotes.

La diferencia del número de brotes se debe a la mayor concentración de BAP, esta citoquinina promueven la división celular, provoca el brotamiento y crecimiento de yemas axilares, pero con una dominancia apical reducida (Jordán y Casaretto, 2006). Con respecto a la longitud de los brotes según los autores antes mencionados, fueron menores a esta investigación. Mesa et al. (2002) sugiere el uso de citoquininas y auxinas en esta fase, ya que favorece en brotamiento y el crecimiento apropiado de los brotes, contrarrestando el efecto reductor de la alta concentración de citoquinina.

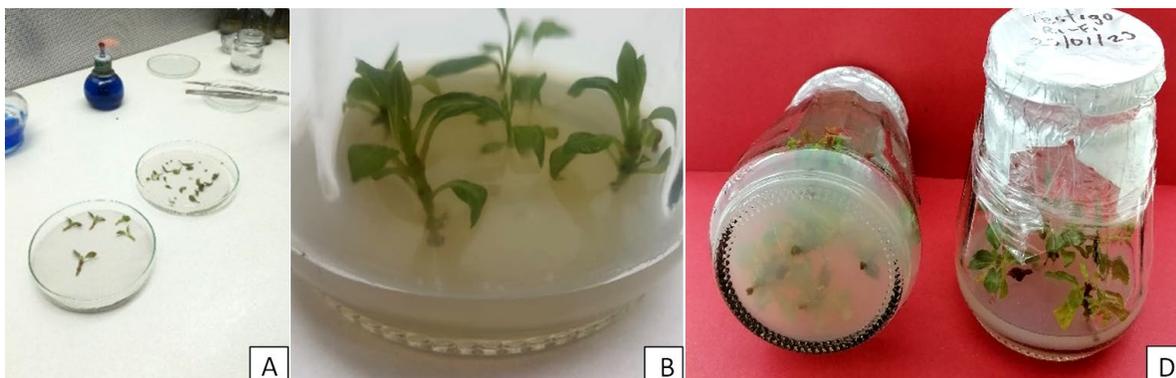
#### **4.3. Efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento**

La formación de raíces en los explantes se debe al aumento intracelular de las auxinas en la sección del corte del explantes ya sea por causas internas de transporte en la planta o por la adición exógena (Ibáñez, 2016). Las auxinas estimulan el proceso de rizogénesis mediante la división y la diferenciación de células localizadas en la parte basal del explante para provocar la formación de raíces adventicias y laterales (Jordán y Casaretto, 2006).

A los quince días de realizada la siembra se evidenció la formación de callos en la base del explante, esta masa de células desorganizadas favorece la formación de raíces (Skoog y Miller, 1965), a los 20 días se apreciaron las primeras raíces en los tratamientos T4, T5, T7 y T8 en un promedio de 2 mm. Finalmente se evidenció el enraizamiento en todos los tratamientos, excepto en el testigo (T0).

**Figura 13.**

*Acondicionamiento y siembra de explantes en la fase de enraizamiento*



*Nota.* Acondicionamiento y siembra de explantes en la cabina de flujo laminar (A). Tamaño de explantes sembrados en la fase de enraizamiento (B). Tratamiento testigo sin enraizar al final la evaluación (C).

#### 4.3.1. Número de raíces

Los resultados del análisis de varianza (Tabla 20) del promedio de raíces por explante no presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos debido a que el valor de  $p=0,0974$  es mayor al nivel de significancia de 0,05; según la prueba de comparación de Tukey (Tabla 21) tampoco existen rangos de diferencia entre tratamientos debido a que las medias no sobrepasan la diferencia mínima significativa que se requiere entre tratamientos ( $DMS=3,72$ ). Según los resultados obtenidos, el tratamiento T4 (1,5 mg/l AIB + 1,0 mg/l ANA) presenta un promedio de 2,93 raíces por explante, seguido por el T2, T9 y T7 con un promedio mayor a 2,5 pero menor a 2,9.

**Tabla 20.**

*Análisis de varianza del número de raíces por explante*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	29,55	9	3,28	1,98	0,0974
Error	33,15	20	1,66		
Total	62,69	29			

**Tabla 21.**

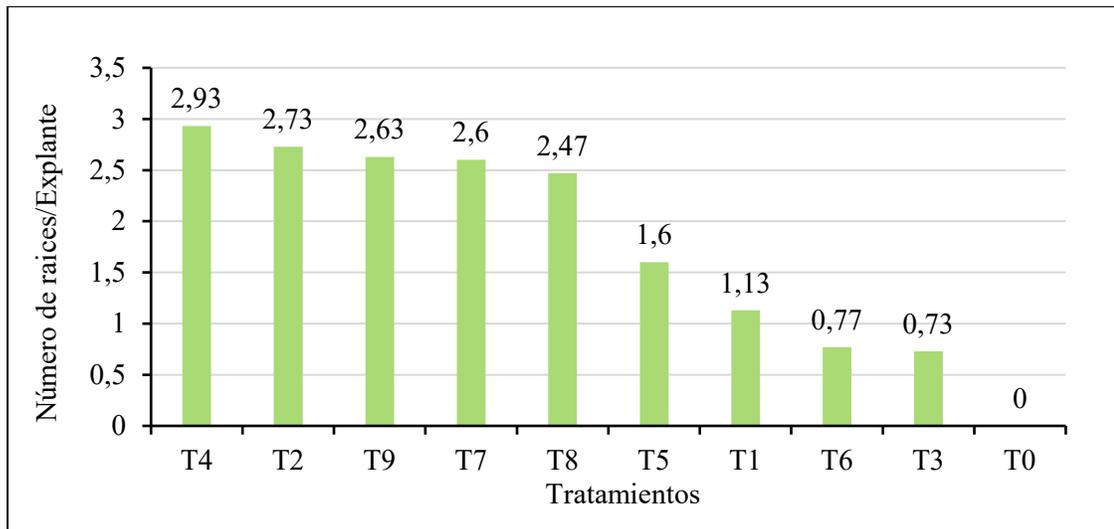
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de raíces por explante*

Tratamientos	Promedio de raíces/Explante	n	E.E.	
T4	2,93	3	0,74	a
T2	2,73	3	0,74	a
T9	2,63	3	0,74	a
T7	2,6	3	0,74	a
T8	2,47	3	0,74	a
T5	1,6	3	0,74	a
T1	1,13	3	0,74	a
T6	0,77	3	0,74	a
T3	0,73	3	0,74	a
T0	0	3	0,74	a

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=3,72; Error: 1,6573 GL: 20.

**Figura 14.**

*Número de raíces por explante*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

### 4.3.2. Longitud de raíces

El análisis de varianza realizado (Tabla 22) demuestra que existe una diferencia significativa ( $p=0,0109$ ) entre la media de los tratamientos; mediante la prueba de Tukey se presentaron dos rangos con un  $DMS=5,12$  (Tabla 23). En el tratamiento T8 (2,0 mg/l AIB + 1,5 mg/l ANA) se alcanzó una longitud promedio de 5,67 mm, seguido por el T7 (2,0 mg/l AIB + 1,0 mg/l ANA) y T4 (1,5 mg/l AIB + 1,0 mg/l ANA). Estos tres tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí, pero si se diferencian significativamente del resto.

**Tabla 22.**

*Análisis de varianza de la longitud de raíces por explante*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	95,96	9	10,66	3,4	0,0109
Error	62,73	20	3,14		
Total	158,69	29			

**Tabla 23.**

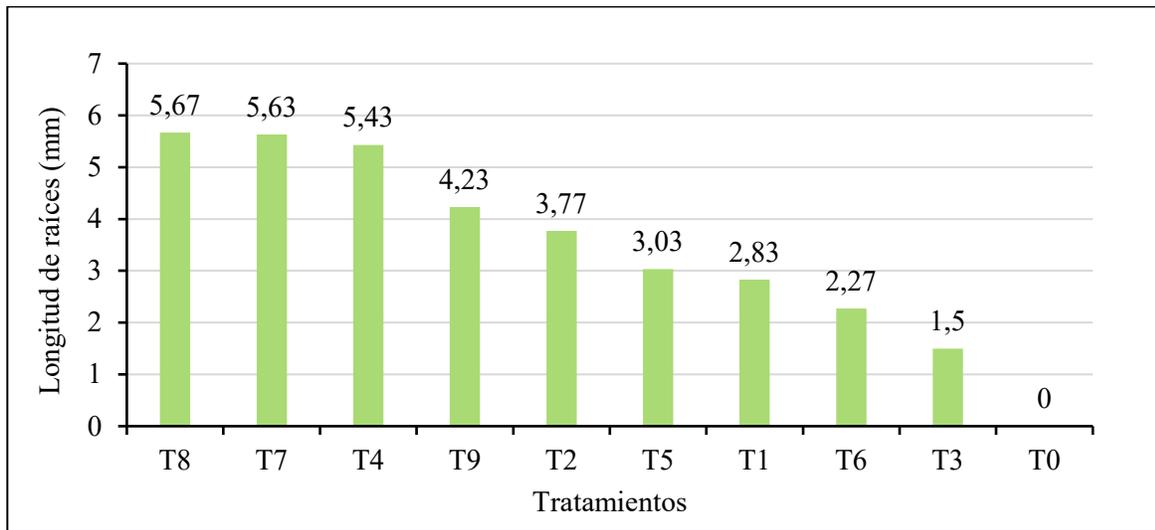
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de raíces por explante*

Tratamientos	Longitud de raíces (mm)	n	E.E.	
T8	5,67	3	1,02	a
T7	5,63	3	1,02	a
T4	5,43	3	1,02	a
T9	4,23	3	1,02	a b
T2	3,77	3	1,02	a b
T5	3,03	3	1,02	a b
T1	2,83	3	1,02	a b
T6	2,27	3	1,02	a b
T3	1,5	3	1,02	a b
T0	0	3	1,02	b

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=5,12; Error: 3,1367 y GL: 20.

**Figura 15.**

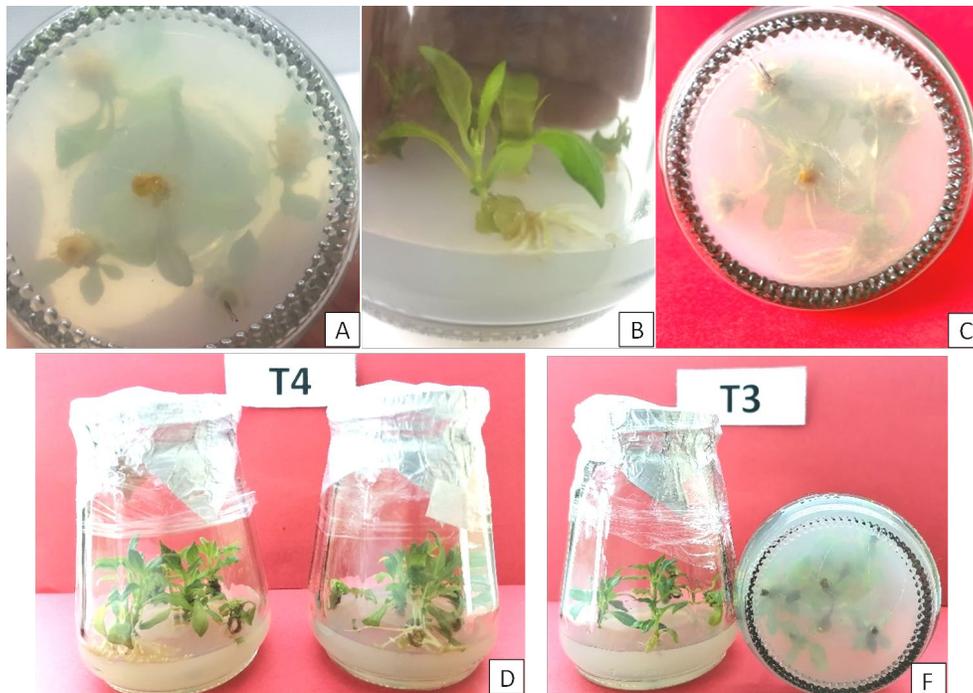
*Longitud de raíces por explante*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

**Figura 16.**

*Formación de raíces*



*Nota.* Formación de callos antes de la aparición de raíces (A). Presencia de raíces tiernas de color verde pálido al mes de realizada la siembra (B). Característica de las raíces durante la última evaluación (C y D). Frascos donde no enraizaron todos los explantes (F).

### 4.3.3. Porcentaje de enraizamiento

El análisis de varianza realizado (Tabla 24) demuestra que existe una diferencia significativa ( $p=0,0114$ ) entre la media de los tratamientos; mediante la prueba de Tukey se presentaron dos rangos con un  $DMS=5,12$  (Tabla 25). En el tratamiento T8 (2,0 mg/l AIB + 1,5 mg/l ANA) se alcanzó el 76,67 % de explantes enraizados, seguido por el T7 (2,0 mg/l AIB + 1,0 mg/l ANA) y T9 (2,0 mg/l AIB + 2,0 mg/l ANA). Estos tres tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí, pero si se diferencian significativamente del resto.

**Tabla 24.**

*Análisis de varianza del porcentaje de enraizamiento*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	12616,67	9	1401,85	3,36	0,0114
Error	8333,33	20	416,67		
Total	20950	29			

**Tabla 25.**

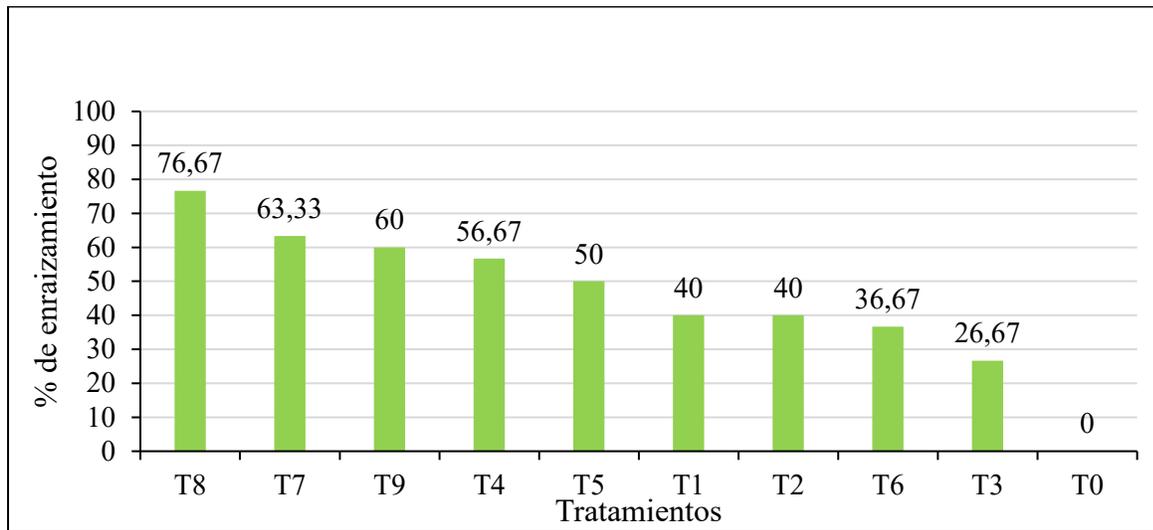
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de enraizamiento*

Tratamientos	% de enraizamiento	n	E.E.	
T8	76,67	3	11,79	a
T7	63,33	3	11,79	a
T9	60	3	11,79	a
T4	56,67	3	11,79	a b
T5	50	3	11,79	a b
T1	40	3	11,79	a b
T2	40	3	11,79	a b
T6	36,67	3	11,79	a b
T3	26,67	3	11,79	a b
T0	0	3	11,79	b

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=59,02; Error:416,66 y GL: 20.

**Figura 17.**

*Porcentaje de enraizamiento*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

#### **4.3.4. Supervivencia de explantes en el enraizamiento**

El análisis de varianza (Tabla 26) realizado para la supervivencia de explantes indica que no hay una diferencia significativa entre medias de los tratamientos al ser  $p=0,5516$  mayor al valor de significancia (0,05); según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 27) existe un solo rango con un  $DMS=7,46$  que no es superado por ninguno de los tratamientos donde todos presentan el 100 % de supervivencia a excepción del T2 y T3 que presentan un 96,67 %, esta diferencia se debió al problema de fenolización de un explantes.

**Tabla 26.**

*Análisis de varianza de la supervivencia de explantes en el enraizamiento*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	53,33	9	5,93	0,89	0,5516
Error	133,33	20	6,67		
Total	186,67	29			

**Tabla 27.**

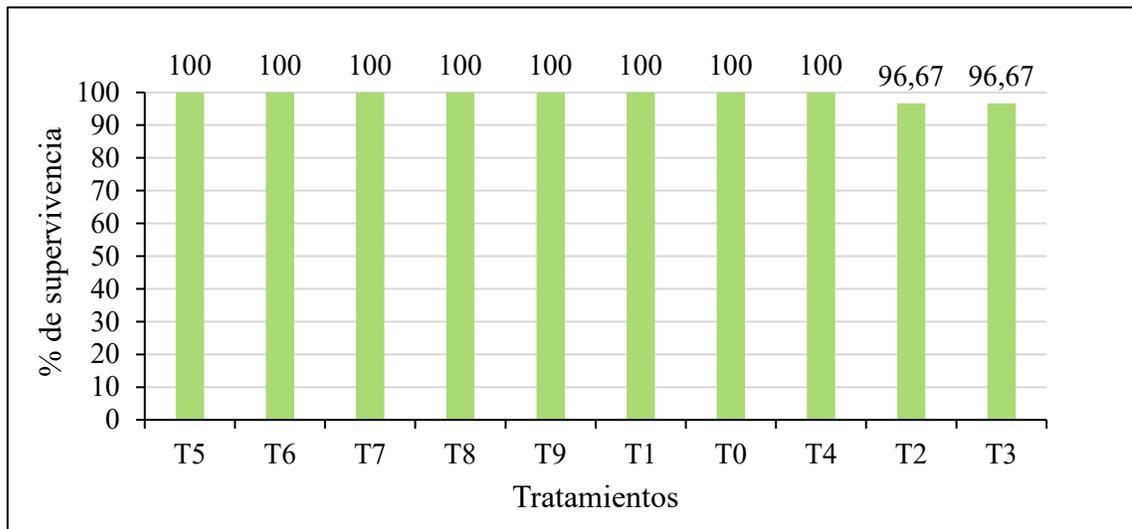
*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la supervivencia de explantes en el enraizamiento*

Tratamientos	% de supervivencia	n	E.E.	
T5	100	3	1,49	a
T6	100	3	1,49	a
T7	100	3	1,49	a
T8	100	3	1,49	a
T9	100	3	1,49	a
T1	100	3	1,49	a
T0	100	3	1,49	a
T4	100	3	1,49	a
T2	96,67	3	1,49	a
T3	96,67	3	1,49	a

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Valores de la prueba: Alfa=0,05; DMS=7,46; Error: 6,6667 y GL: 20.

**Figura 18.**

*Porcentaje de supervivencia de explantes en la fase de enraizamiento*



*Nota.* Distribución descendente de los resultados obtenidos según la prueba de Tukey.

En la propagación *in vitro* no todas las especies forestales requiere de la incorporación de hormonas al medio de cultivo, esto depende de la capacidad de síntesis de la planta para suplir sus necesidades (Indacochea et al., 2018); para Sánchez et al. (2004) y Flores et al. (2009) la

rizogénesis adventicia ocurre de forma espontánea al propagar *Nothofagus procera* y *Ficus carica*, mientras que en otras especies presentan una limitada capacidad rizogénica (Briones, 2015).

Para lograr el enraizamiento de la *C. officinalis* ha sido necesario la incorporación de auxinas (AIB y ANA), a excepción del testigo T0 al cual no se incorporó nada y no se evidenció respuesta alguna sobre la formación de callos y raíces adventicia. Esta especie presenta una limitada capacidad rizogénica, autores como Aldaz y Ochoa (2011), Conde et al. (2017) y Vásquez et al. (2018) en sus investigaciones en campo no han logrado inducir el enraizamiento de estacas y esquejes, solo en acodos aéreos se logró un 50 % de enraizamiento (Conde, 2016). Posiblemente, la existencia de compuestos químicos y fenólicos de la *C. officinalis* actúan inhibiendo el enraizamiento (Latsague y Lara, 2003).

En condiciones *in vitro* se ha logrado el enraizamientos, tales resultados obtenidos son semejantes a los de Chamba (2017) donde las raíces se formaron previa una fase de formación de callos al aplicar ANA a 1mg/l obteniendo resultados de 5,32 raíces por explante y de 2,45 mm; con AIB los resultados fueron menores en número (0,75) y tamaño (0,74 mm) pero la formación de raíces se originaron sin pasar por callos. Paredes (2019) con 1,0 mg/l de AIB alcanzó 20,1 mm de longitud y con 2,0 mg/l obtuvo 2,77 raíces por explante y un porcentaje de enraizamiento máximos del 46,11 %. Campos (2018) al combinar 1 mg/l AIB + 1 mg/l ANA para enraizar la *C. pubescens* alcanzó un promedio de 8,7 raíces y 19,1 mm. Sin embargo

Estas investigaciones ayudan a determinar que el AIB es recomendable utilizarse a concentraciones de 1 mg/l a 2 mg/l para obtener resultados considerables en el enraizamiento, con respecto a ANA se debe emplear a menor concentración de la que se usó, ya que esta hormona aumenta el número de raíces pero también aumenta de manera excesiva la formación de callos

(Quintero et al., 2003), en algunos casos, puede tener efectos inhibitorios por el exceso en la formación de callos y la estimulación de compuestos fenólicos (Uribe et al., 2012 y Vergara, 2018).

El balance de las auxinas y citoquininas juegan un papel importante en el desarrollo vegetal, al controlar el crecimiento y la actividad bioquímica de las plantas pero es necesario tener en cuenta aspectos como: la oportunidad de aplicación, la sensibilidad de la variedad, condición de la planta, etc., porque cada planta requiere de unas condiciones específicas de crecimiento que puede ser afectado por la concentración de ellos en el medio siendo capaces de promover o inhibir el crecimiento de los órganos (Alcántara et al., 2019).

En esta investigación utilizando explantes extraídos de plantas de vivero se ha logrado obtener un 61 % de explantes sanos y sin contaminación; en la multiplicación se obtuvieron brotes con buena longitud (23,5 mm) mayores a los obtenidos por Lima (2016) y Chamba (2017), esta longitud, favorece la obtención de un mayor número de explantes al sub cultivar segmentos nodales; así mismo, también se obtuvo raíces con 5,67 mm en promedio, mayores a los obtenidos por Chamba (2017), en relación al porcentaje de enraizamiento se alcanzó un valor superior (76,67 %) al resultado de Paredes (2019), y con respecto a la supervivencia los resultados fueron similares a las otras investigaciones.

Estos resultados nos dan a entender sobre la respuesta positiva de la especie para ser propagada *in vitro* pero con la única dificultad de que no enraízan todos los explantes (Paredes, 2019). Finalmente, las concentraciones de AIA + BAP en la multiplicación de brotes y de AIB + ANA en la generación de raíces se encuentran dentro del rangos necesarios para la especie (menor a 2 mg/l) ya que según Lima (2016) y Chamba (2017) al aumentar la Concentración de los reguladores de crecimiento sus resultados fueron menores.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los tres tratamientos aplicados en la desinfección de explantes el T2 (2 % de NaClO) ha resultado ser el más eficiente en la desinfección y establecimiento *in vitro* de explantes de *C. officinalis* donde se obtuvo 61,11 % de explantes vivos y libres de patógenos.

En la multiplicación de explantes de *C. officinalis* se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento (auxina + citoquinina) en nueve tratamientos, de los cuales T6 con 0,4 mg/l AIA + 1,2 mg/l BAP fue el más óptimo, al obtener un mayor número de brotes por explante (2,50), mayor longitud (23,50 mm) y una supervivencia del 100 %.

En el enraizamiento de explantes se evaluó el efecto de dos auxinas en nueve tratamientos, se logró alcanzar el mejor resultado en el T8 (2,0 mg/l AIB + 1,5 mg/l ANA) donde el 76,67 % de explantes enraizaron con un número promedio de 2,47 raíces y una longitud de 5.67 mm.

En la desinfección de explantes *ex vitro* de *C. officinalis*, se recomienda ampliar el estudio con más tratamientos donde las concentraciones del desinfectante (NaClO) y los tiempos de inmersión mantengan una relación inversamente proporcional, incluso se sugiere incorporar antioxidantes si es necesario, con la finalidad de lograr menores porcentajes de fenolización.

Realizar investigaciones en el enraizamiento de los explantes en condiciones *in vitro* y *ex vitro* empleando ANA en bajas concentración y en combinación con otros reguladores de crecimiento para lograr mejores resultados.

## CAPÍTULO VI

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara Cortes, J. S., Alcántara Cortés, J. D., Acero Godoy, J., y Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17, 119–129. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1036/1425>
- Aldaz Loja, L. J., y Ochoa Luzuriaga, I. L. (2011). *Propagación asexual de diez especies forestales y arbustivas en el jardín botánico “Reinaldo Espinosa”* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja].  
[https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5348/1/PROPAGACIÓN ASEXUAL DE DIEZ ESPECIES FORESTALES Y ARBUSTIVAS EN EL JARDÍN BOTÁNICO.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5348/1/PROPAGACIÓN_ASEXUAL_DE_DIEZ_ESPECIES_FORESTALES_Y_ARBUSTIVAS_EN_EL_JARDÍN_BOTÁNICO.pdf)
- Alvárez Alfonso, J. (2013). El árbol de la calentura. *Instituto Nacional de Salud*, 19(9–10), 214–215. <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/296/BOLETIN-2013set-oct214-215.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Armijos González, R. (2016). *Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de Cinchona officinalis, Linneo*. [Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid]. <http://oa.upm.es/39541/>
- Aymard, G. A. (2019, November). Breve reseña de los aspectos taxonómicos y nomenclaturales actuales del género Cinchona (Rubiaceae-Cinchoneae). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43, 234–241.  
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.1079>
- Boeri, P. (2015). ¿Cómo se nutren las plantas de probeta? Medios de Cultivo- Reguladores de crecimiento. In *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 46–72). edulp. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Briones, V. (2015). Micropropagación: La técnica de “fotocopiado” de plantas. In *PLANTAS DE PROBETA. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 112–120). edulp. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>

- Burgstaller Chiriani, C. H. (1986). *La vuelta a los vegetales: 600 hierbas medicinales, 700 fórmulas útiles* (10a ed.). HACHETTE.  
<https://capitanswingysanlamuerte.files.wordpress.com/2015/04/la-vuelta-a-los-vegetales.pdf>
- Bussmann, R. W., y Sharon, D. (2015). *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia, La flora mágica y medicinal del norte del Perú*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3485.0962>
- Calva Calva, G., y Josefina Pérez Vargas, D. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6, 1–16.  
[http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov\\_art104a.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf)
- Campos Ruiz, J. (2019). *Propagación in vitro de Swietenia macrophylla King utilizando ácido naftalenacético y bencilaminopurina* [Tesis de posgrado, Universidad Nacional de Trujillo].  
[https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15287/Campos Ruiz%2C Joseph.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15287/Campos_Ruiz%2C_Joseph.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Campos Torres, O. I. (2018). *Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de Cinchona pubescens Valh “Cascarilla”* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Jaén]. <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/114>
- Caraguay Yaguana, K. A., Eras Guaman, V. H., Gonzalez Zaruma, D., Minchala Patiño, J., Yaguana Arevalo, M., y Valarezo Ortega, C. (2016). Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la provincia de Loja – Ecuador. *Revista de Investigacion Altoandina*, 18, 271–280.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5645611>
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Uruguay.  
<http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacion-1009.aspx>
- Catalog of Life. (2023, May 15). *Cinchona L.*  
<https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/8VW8Y>
- Chamba Granda, L. M. (2017). *Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de Cinchona officinalis L., a partir de vitroplantas, en la Argelia-Loja* [Tesis de grado,

Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/18546>

Collado, R., Barbón, R., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., y Ramírez, D. (2004). Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología Vegetal*, 4(3), 143–146.

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/411/html>

Conde Montaña, M. E. (2016). *Propagación in vivo de Cinchona officinalis L., a partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja].

<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/10270>

Conde Montaña, M. E., MorenoSerrano, J. A., Eras Guamán, V. H., Minchala Patiño, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M., y Valarezo Ortega, C. (2017). Multiplicación sexual y asexual de *Cinchona officinalis* L., con fines de conservación de la especie. *Tzhoecoen*, 9, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.26495/rtzh179.121509>

Cruz Pizarro, F. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*.

[http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales\\_manualprac.pdf](http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf)

Cuesta, F., Peralvo, M., y Valarezo, N. (2009). *Los bosques montanos de los andes tropicales*. Programa Regional ECOBONA–INTERCOOPERATION.

<https://www.bivica.org/file/view/id/320>

De Bartolini, B., y Lallana, V. (1995). *Catedra de fisiología vegetal: Terminos comunmente usados en cultivo de tejidos* (p. 23).

[http://www2.fca.uner.edu.ar/files/investigacion/Publicaciones/Compilacion/Terminos\\_CT.pdf](http://www2.fca.uner.edu.ar/files/investigacion/Publicaciones/Compilacion/Terminos_CT.pdf)

Espinosa, C. I., y Ríos, G. (2014). Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Dialnet Plus*, 35, 73–82.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6537271>

Fernández Rafael, A. M. (2017). *Identificación y caracterización del género cinchona en la zona de amortiguamiento del área de conservación municipal-Bosque Huamantanga, Jaén -*

- Perú [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Cajamarca].  
<http://hdl.handle.net/20.500.14074/1700>
- Flores Mora, M., Jiménez Bonilla, V., y Chacón Cerdas, R. (2009). Cultivo de tejidos en Ficus carica con miniestacas. *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 319–325.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43713059012>
- Gisbert Doménech, C., Fita Fernández, A. M., y Díez Nilcós, M. J. (2010). *Prácticas de cultivo in vitro y transformación genética de plantas*. LIMUSA.
- Gisbert Doménech, C., y Picó Sirvent, M. B. (2015). *Micropropagación*.  
[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert and Pico\\_2015 micropropagación.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert%20and%20Pico_2015_micropropagacion.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Gisbert Domenech, M. C. (2011). *Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/11526>
- Gómez Silvera, A., Beraun Macedo, L. A., y Gómez Rengifo, O. J. (2016). *Las Quinas de los bosques de neblina del distrito de Kañaris - Región Lambayeque*.  
<https://repositorio.inia.gob.pe/handle/inia/570>
- González Valdiviezo, K. C. (2017). *Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de vitroplantas de Cinchona officinalis L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja].  
<https://doi.org/10.26495/rtzh1810.226115>
- Gupta, M. P., y Calderón, Á. (2006). Estado del arte sobre la utilización industrial de plantas medicinales en la región andina. *Primera Conferencia Regional: El Futuro de Los Productos Andinos En La Región Alta y Los Valles Centrales de Los Andes*, 24–25.  
[http://repositorio.promperu.gob.pe/bitstream/handle/123456789/1458/Estado\\_Arte\\_Utilizacion\\_Industrial\\_Plantas\\_Medicinales\\_Region\\_Andina\\_2006\\_keyword\\_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.promperu.gob.pe/bitstream/handle/123456789/1458/Estado_Arte_Utilizacion_Industrial_Plantas_Medicinales_Region_Andina_2006_keyword_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Hernández, Y., y González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 01–

19. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&synrm=1&isoyt=1&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&synrm=1&isoyt=1&lng=es)

Huamán, L., Albán, J., y Chilquillo, E. (2019). Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis* L.) en el norte de Perú. *Ecología Aplicada*, 18(2), 145. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i2.1333>

Ibáñez López, S. (2016). *Caracterización molecular de la formación de raíces adventicias en explantos foliares de Arabidopsis thaliana* [Trabajo de fin de grado, Universidad Miguel Hernández de Elche]. [http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3552/1/TFG\\_Ibáñez\\_López%20Sergio.pdf](http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3552/1/TFG_Ibáñez_López%20Sergio.pdf)

Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., y Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 63–89. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>

Indacochea Ganchozo, B. S., Parrales Villacreses, J. c. ., Zhindón Ganchozo, B. A. ., Valverde Lucio, Y. A. ., y Álvarez Indacochea, Blanca V.; Choez Indacochea, P. A. (2019). *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos*. Mawil. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Jerez Bastidas, E. (2017). *Propagación sexual y asexual de la cascarilla (Cinchona officinalis L.), con fines de potencial reproductivo en el vivero catiglata del consejo provincial de Tungurahua* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/7663>

Jiménez, P., Ortego, A., Javier, F., y Sarmiento, P. (2019). *Historia de la quina: De la lucha contra la malaria a la aparición de la tónica* [Tesis de pregrado, Universidad Complutense de Madrid]. [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PATRICIA\\_JIMENEZ-ALFARO\\_ORTEGO.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PATRICIA_JIMENEZ-ALFARO_ORTEGO.pdf)

Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). *Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas* (Vol. 15).

<http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

- Latsague, M., y Lara, J. (2003). Fenoles solubles totales y su relación con la inhibición de la rizogénesis en estacas de *Nothofagus pumilio* (poepp. et endl.) Krasser. *Gayana Botanica*, 60(2), 90–93. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/v60n2/art02.pdf>
- Lima Jiménez, N. R. (2016). *Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de Cinchona officinalis L. a partir de diferentes fuentes de material vegetal* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja]. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/13520>
- Lima Jiménez, N. R. (2018). Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(2), 169–178. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.361>
- López Gómez, P., Iracheta Donjuan, L., Castellanos Juárez, M., Méndez López, I., Aguirre Medina, J. F., Gutiérrez Díez, A., Ojeda Zacarías, M. del C., y Pérez Pérez, R. B. (2011). Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(5), 645–657. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n5/v2n5a2.pdf>
- Mesa, C., Romero, A., y Cruz, A. M. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación in vitro de la *Leucaena leucocephala* vc Perú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36, 271–274. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018103012>
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). (2016). *RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 505 - 2016-MINAGRI*. <https://www.midagri.gob.pe/portal/resoluciones-ministeriales/rm-2016/17356-resolucion-ministerial-n-505-2016-minagri>
- Mroginski, L, y Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 20–40).
- Mroginski, Luis, Sansberro, P., y Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, H. Esteban, y L. Mroginski (Eds.), *Biología y mejoramiento vegetal II* (2.ª ed., pp. 17–25). Instituto Nacional de

Tecnología Agropecuaria. <https://intainforma.inta.gob.ar/“biotecnologia-y-mejoramamiento-vegetal-ii”-un-libro-a-ciencia-cierta/>

Olmos, S., Luciani, G., y Galdeano, E. (2010). Micropropagación. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, H. Esteban, y L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (2.<sup>a</sup> ed., pp. 353–362). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://intainforma.inta.gob.ar/“biotecnologia-y-mejoramamiento-vegetal-ii”-un-libro-a-ciencia-cierta/>

Osuna Fernández, H. R., Osuna Fernández, A. M., y Fierro Álvarez, A. (2017). *Manual de propagación de plantas superiores*. [http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/manual\\_plantas.pdf](http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/manual_plantas.pdf)

Pacheco, J. y, y Carrera, D. F. (2008). *Una aproximación cts al análisis de la industria de la quinina en la zona de Loja en el siglo XVIII*. Escuela de Electrónica y Telecomunicaciones UTPL. <https://www.utpl.edu.ec/jorgeluisjaramillo/wp-content/uploads/2008/08/jorgeluis-la-industria-de-la-cascarilla-junio-2008-blog.pdf>

Paredes Jiménez, D. K. (2019). *Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento in vitro de explantes de Cinchona officinalis L., proveniente de relictos boscosos de la provincia de Loja* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/21599>

Perea, M. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. In *Universidad Nacional de Colombia* (Vol. 9, Issue 19). Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología. [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw\\_\\_Zozfqc](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__Zozfqc)

Pollito, Zevallos, P. A. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y status del género cinchona en el Perú*. <https://doi.org/10.14814/phy2.13284>

- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., y Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de Dioscoreas sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51–56.  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575/1113>
- Ramírez Correa, L. A., Granados Moreno, J. E., y Carreño González, N. E. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1), 155. <https://doi.org/10.22490/21456453.944>
- Reynel Rodríguez, C., Pennington, R. T., Pennington, T. D., Flores, C., y Daza, A. (2006). *Árboles útiles del Ande Peruano : una guía de identificación, ecología y propagación de las especies de la Sierra y los Bosques Montanos en el Perú* (Darwin Initiative Project (ed.); 2<sup>a</sup> ed.) [Book]. s.n.
- Ruscitti, M. (2021). *Micropropagación: Cultivo de tejidos vegetales in vitro*.  
[https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/98291/mod\\_resource/content/1/micropropagacion 2021.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/98291/mod_resource/content/1/micropropagacion%202021.pdf)
- Sánchez Gutierrez, Y., Torres, Y., Robaina, A., Bauta, M., y Rayas, A. (2015). Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación in vitro de *Xathosoma* spp . clon ‘ INIVIT MX-2007 ’ y *Colocasia esculenta* ( L .) Schott . clon ‘ INIVIT MC-2012. *Biotecnología Vegetal*, 15(3), 157–161. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/459/503>
- Sánchez Olate, M., Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H., y Escobar, R. (2004). Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. *Bosque*, 25(1), 123–128. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002004000100011>
- Sánchez Saldaña, L., y Sáenz Anduaga, E. (2005). Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, 15(2), 82–103.  
[https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15\\_n2/pdf/a02.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf)
- Skoog, F., y Miller, C. O. (1965). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In E. Bell (Ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Development*. (ed., pp. 481–494). Harper and Row.

- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Ugarte, C., Villarroel, C. L., Aguirre, G., y State, M. (2016). Medios de cultivo. In G. Aguirre Villarroel, J. Pierre Baudoin, y L. Leigue Arnéz (Eds.), *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos* (pp. 78–88). Universidad Mayor de San Simón. [https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C Baudoin%2C Leigue UMSS 2016.pdf](https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf)
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., y Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botánica*, 69, 105–112. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/v69n1/art10.pdf>
- Vasquez, J., Lapid, E., Barboza, M., Vasquez, S., y Quispe, L. (2018). Comparación de sustratos en la propagación sexual y asexual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis*). *Revista de Investigación En Agroproducción Sustentable*, 2(3), 77–85. <https://doi.org/10.25127/aps.20183.407>
- Vergara Arellano, R. C. (2018). *Micropropagación de Cedrela lilloi C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados in vitro* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3528/vergara-arellano-renzo-carlos.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Villalobos, V. M., y Thorpe, T. A. (1993). Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. In W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas* (pp. 127–142). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Villar Cabeza, M. A., Marcelo Bazán, F. E., y Baselly Villanueva, J. R. (2018). *Estudio silvicultural de la quina*. Instituto Nacional de Innovación Agraria.

- Villarroel, C. L., y Cadima, X. (2016). MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS. In G. Aguirre Villarroel, J. Pierre Baudoin, y L. Leigue Arnéz (Eds.), *La aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* (pp. 89–104). Universidad Mayor de San Simón.
- Villarroel Vogt, C., y Cadima, X. (2016). Micropropagación de plantas. In G. Aguirre Villarroel, J. Pierre Baudoin, y L. Leigue Arnéz (Eds.), *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos* (pp. 89–106). Universidad Mayor de San Simón. [https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C Baudoin%2C Leigue UMSS 2016.pdf](https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf)
- Viñas, M., y Jiménez, V. M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(2), 229–242. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a23.pdf>

## ANEXOS

### Anexo 1. Hoja de evaluación para la fase de desinfección y establecimiento

TABLA DE EVALUACIÓN PARA CUANTIFICAR EL RESULTADO DE LA DESINFECCIÓN										
Fecha de siembra:...../...../.....			Fecha de evaluación: ...../...../.....				N° de evaluación: .....			
Tratamientos/ Repeticiones	N° de explantes contaminados			N° de explantes fenolizados	N° de explantes Sanos	% de explantes contaminado	% de explantes fenolizados	% de supervivencia		
	Hongos	Bacterias	Sub Total							
<b>T0</b>	R 1									
	R 2									
	R 3									
<b>T1</b>	R 1									
	R 2									
	R 3									
<b>T2</b>	R 1									
	R 2									
	R 3									
<b>T3</b>	R 1									
	R 2									
	R 3									

### Anexo 2. Hoja de evaluación para la fase de multiplicación

TABLA DE REGISTRO PARA EVALUAR LA FASE DE MULTIPLICACIÓN																	
Fecha de siembra:...../...../.....				Fecha de evaluación: ...../...../.....								N° de evaluación: .....					
Tratamientos/ Repeticiones	N° de brotes			Longitud de brotes (cm)								Sobrevivencia			Número de brotes/Explante	Longitud de brotes /Explante	% de sobrevivencia
	F1	F2	TOTAL	F1				F2				F1	F2	Total			
<b>T0</b>	R 1																
	R 2																
	R 3																
<b>T1</b>	R 1																
	R 2																
	R 3																
<b>T2</b>	R 1																
	R 2																
	R 3																
<b>Tn</b>	R 1																
	R 2																
	R 3																

### Anexo 3. Hoja de evaluación para la fase de enraizamiento

TABLA DE REGISTRO PARA EVALUAR LA FASE DE ENRAIZAMIENTO																		
Fecha de siembra:...../...../.....					Fecha de evaluación: ...../...../.....							N° de evaluación: .....						
Tratamientos/ Repeticiones	N° de raíces			Longitud de raíces (cm)								Sobrevivencia			Número de raíces/Explante	Longitud de raíces /Explante	% de sobrevivencia	% de enraizamiento
	F1	F2	TOTAL	F1				F2				F1	F2	Total				
T0	R1																	
	R2																	
	R3																	
T1	R1																	
	R2																	
	R3																	
T2	R1																	
	R2																	
	R3																	
Tn	R1																	
	R2																	
	R3																	

### Anexo 4. Formulación del medio de cultivo Murashige y Skoog 1962

N°	COMPUESTO	FORMULA	CANTIDAD
<b>Macroelementos</b>			g/l
1	Nitrato de Amonio	NH4 NO3	1,65
2	Nitrato de Potasio	KNO3	1,9
3	Cloruro de Calcio	CaCl2 2H2O	0,44
4	Sulfato de Magnesio	MgSO4 7H2O	0,37
5	Fosfato de Potasio	KH2PO4	0,17
<b>Microelementos</b>			mg/l
6	Ácido Bórico	H3BO3	6,2
7	Sulfato de Manganeso	MnSO4 H2O	16,9
8	Sulfato de Zing	ZnSO4 7H2O	8,6
9	Ioduro de Potasio	KI	0,83
10	Molibdato de Sodio	Na2MoO4 2H2O	0,25
11	Sulfato de Cobre	CuSO4 5H2O	0,025
12	Cloruro de Cobalto	CoCl2 6H2O	0,025
<b>Hierro</b>			mg/l
13	Sulfato de Fierro	FeSO4 7H2O	27,84
14	EDTA de Sodio	Na2 EDTA	37,24
<b>Vitaminas</b>			
	Tiamina HCL		1,00
	Mio - Inositol		100,00
	Ac. Nicotínico		0,50
	Piridoxina HCL		0,50
	Glicina		2,00

**Anexo 5. Resumen promedio de los datos evaluados en la desinfección y establecimiento**

<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>% de explantes contaminados</b>	<b>% de explantes fenolizados</b>	<b>% de supervivencia</b>
T0	R 1	100	0	0
T0	R 1	100	0	0
T0	R 1	100	0	0
T0	R 2	100	0	0
T0	R 2	100	0	0
T0	R 2	100	0	0
T0	R 3	50	0	50
T0	R 3	50	0	50
T0	R 3	50	0	50
T1	R 1	0	50	50
T1	R 1	0	50	50
T1	R 1	50	50	0
T1	R 2	0	50	50
T1	R 2	50	50	0
T1	R 2	0	50	50
T1	R 3	100	0	0
T1	R 3	50	50	0
T1	R 3	0	0	100
T2	R 1	0	0	100
T2	R 1	0	50	50
T2	R 1	50	0	50
T2	R 2	0	0	100
T2	R 2	0	50	50
T2	R 2	0	50	50
T2	R 3	0	50	50
T2	R 3	0	50	50
T2	R 3	0	50	50
T3	R 1	0	100	0
T3	R 1	0	50	50
T3	R 1	0	50	50
T3	R 2	0	100	0
T3	R 2	0	0	100
T3	R 2	0	50	50
T3	R 3	0	100	0
T3	R 3	0	100	0
T3	R 3	0	100	0

**Anexo 6. Resumen promedio de los datos evaluados en la multiplicación**

<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Promedio de brotes/Explante</b>	<b>Longitud promedio de brotes</b>	<b>% de supervivencia</b>
T 0	R 1	1,15	7,35	82,50
T 0	R 2	1,10	9,73	100,00
T 0	R 3	1,33	9,05	90,00
T 1	R 1	1,93	14,35	100,00
T 1	R 2	1,50	14,30	80,00
T 1	R 3	1,40	12,40	72,50
T 2	R 1	2,13	17,98	100,00
T 2	R 2	1,53	13,43	82,50
T 2	R 3	1,70	17,33	90,00
T 3	R 1	1,85	15,00	90,00
T 3	R 2	1,80	15,23	90,00
T 3	R 3	1,38	10,95	82,50
T 4	R 1	2,13	17,00	100,00
T 4	R 2	2,15	14,48	85,00
T 4	R 3	1,80	14,98	82,50
T 5	R 1	2,38	15,03	100,00
T 5	R 2	1,63	12,35	82,50
T 5	R 3	2,28	16,78	92,50
T 6	R 1	2,38	18,30	100,00
T 6	R 2	2,13	14,50	100,00
T 6	R 3	2,23	19,75	100,00
T 7	R 1	1,53	20,48	100,00
T 7	R 2	1,43	13,63	90,00
T 7	R 3	1,83	13,33	90,00
T 8	R 1	1,73	14,25	90,00
T 8	R 2	1,65	16,20	100,00
T 8	R 3	1,60	20,20	100,00
T 9	R 1	1,68	15,40	100,00
T 9	R 2	1,30	13,03	82,50
T 9	R 3	1,68	14,25	90,00

**Anexo 7. Resumen promedio de los datos evaluados en el enraizamiento**

<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Promedio de raíces/Explante</b>	<b>Promedio de longitud de raíz</b>	<b>% de Enraizamiento</b>	<b>% de supervivencia</b>
<b>T 0</b>	R 1	0,00	0,00	0,00	100,00
<b>T 0</b>	R 2	0,00	0,00	0,00	100,00
<b>T 0</b>	R 3	0,00	0,00	0,00	100,00
<b>T1</b>	R 1	2,10	4,10	70,00	100,00
<b>T1</b>	R 2	0,90	2,70	20,00	100,00
<b>T1</b>	R 3	0,40	1,70	30,00	100,00
<b>T2</b>	R 1	6,40	6,80	50,00	90,00
<b>T2</b>	R 2	0,30	0,30	10,00	100,00
<b>T2</b>	R 3	1,50	4,20	60,00	100,00
<b>T3</b>	R 1	1,40	1,60	30,00	100,00
<b>T3</b>	R 2	0,50	2,30	40,00	100,00
<b>T3</b>	R 3	0,30	0,60	10,00	90,00
<b>T4</b>	R 1	4,50	6,80	80,00	100,00
<b>T4</b>	R 2	1,50	2,90	40,00	100,00
<b>T4</b>	R 3	2,80	6,60	50,00	100,00
<b>T5</b>	R 1	1,30	3,10	40,00	100,00
<b>T5</b>	R 2	2,80	4,80	90,00	100,00
<b>T5</b>	R 3	0,70	1,20	20,00	100,00
<b>T6</b>	R 1	1,30	3,40	50,00	100,00
<b>T6</b>	R 2	0,60	1,70	40,00	100,00
<b>T6</b>	R 3	0,40	1,70	20,00	100,00
<b>T7</b>	R 1	2,30	6,80	60,00	100,00
<b>T7</b>	R 2	3,30	6,70	60,00	100,00
<b>T7</b>	R 3	2,20	3,40	70,00	100,00
<b>T8</b>	R 1	2,60	3,00	60,00	100,00
<b>T8</b>	R 2	2,80	7,50	90,00	100,00
<b>T8</b>	R 3	2,00	6,50	80,00	100,00
<b>T9</b>	R 1	3,30	4,20	70,00	100,00
<b>T9</b>	R 2	1,60	4,60	40,00	100,00
<b>T9</b>	R 3	3,00	3,90	70,00	100,00

## Anexo 8. Panel fotográfico del estudio realizado en el laboratorio



A: Pesado del medio Murashige y Skoog



B: Agregado de vitaminas al matraz con medio Murashige y Skoog.



C: Ajuste de pH del medio de cultivo



D: Esterilización del medio de cultivo y los materiales necesarios para la siembra *in vitro*



E: Plantas donantes de explantes



F: Desinfección previa de explantes con jabón y alcohol



G: Distribución de los explantes en la cámara de crecimiento



H: Explantes sanos después de la desinfección



I: Distribución de los frascos en la cámara de crecimiento



J: Desarrollo de explantes en la multiplicación



K: Tratamiento T6 en la cámara de crecimiento



L: Medición de longitud de brotes



M: Distribución de frascos en la cámara de crecimiento



N: Enraizamiento de explantes



Ñ: Siembra de explantes en la multiplicación



O: Siembra de explantes en el enraizamiento