

Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas

Carlos Iván Espinosa I¹, Gabriel Ríos¹

¹Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto, C.P.: 1101608, Marcelino Champagnat, Loja, Ecuador

ciespinosa@utpl.edu.ec

Recibido: 2014-08-28; aceptado: 2014-10-23

RESUMEN.-

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

PALABRAS CLAVES: conservación, cultivo *in vitro*, efectos micropropagación, especies forestales, sobrevivencia de plántulas

ABSTRACT.-

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

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

INTRODUCCIÓN

Los bosques de montaña o bosques montanos representan uno de los ecosistemas más diversos del mundo (Myers *et al.*, 2000). A pesar de esta elevada diversidad, los bosques de montaña enfrentan una acelerada pérdida de hábitat provocada por la actividad humana (Dinerstein *et al.*, 1995; Myers, 1986). Según cálculos por lo menos el 70% de bosque interandino del Ecuador ha desaparecido (Morocho y Romero, 2003). Esta pérdida de hábitat sumado a la alta concentración de especies endémicas ha hecho que la conservación de estos bosques sea prioritaria a nivel de Ecuador (Sierra, 1999). Existen pocos estudios que evalúan los efectos de la pérdida del hábitat sobre especies amenazadas, no obstante muchas especies de distribución restringida como *Cinchona officinalis* (Linnaeus, Carl von) podrían haber perdido alrededor del 60% de su distribución potencial (ej. Espinosa *no publ.*). La pérdida de hábitat y el consecuente aislamiento de las poblaciones se prevé tenga consecuencias negativas para el éxito reproductivo y el flujo de genes de las especies de árboles tropicales (Nason y Hamrick, 1997; McCauley, 1995; Young *et al.*, 1993; Templeton *et al.*, 1990). De esta forma, el éxito de reproducción sexual de las especies puede verse gravemente afectado, lo cual, a su vez repercute en la implementación de acciones de repoblación eficientes. En este contexto la propagación de especies que utilizan herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* o micropropagación se constituye en una alternativa de reproducción viable. La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas tejidos o células cultivadas asépticamente y bajo control estricto de las condiciones del ambiente (Lara *et al.*, 2003). Esta técnica se ha convertido en una importante alternativa dentro de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies (Hartmann y Kester, 1995), es utilizado como herramienta fundamental en la investigación, la producción vegetal (Engels, 2003; Lira, 2000,) y como una alternativa de preservación y manejo de especies nativas (Pierik, 1990), o en vías de extinción (Muñoz de Malajovich, 2006).

A pesar de las ventajas de la micropropagación existen puntos considerados como críticos en el uso de esta técnica para procesos de repoblación. Las condiciones a las cuales son sometidas las plántulas *in vitro* de alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ y baja densidad fotosintética induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esas condiciones (Rai *et al.*, 2011; Hazarika, 2003). En la mayor parte de los procedimientos empleados en la micropropagación no se hace referencia al control efectivo del desarrollo de las plantas *in vitro* (Brainerd *et al.*, 1982). El ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes donde se realiza la reproducción *in vitro* puede afectar las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plántulas (Buddenford-Joosten y Woltering, 1994; Kozai *et al.*, 1992). Las concentraciones de hormonas vegetales utilizadas en los procesos de micropropagación pueden desbalancear las concentraciones endógenas de hormonas, por lo cual el tejido podrá desarrollar caminos morfogénicos alternativos (Ascon-Bieto y Talon, 1993), así las células involucradas en crecimiento que deberían permitir la elongación de la planta, inician procesos de diferenciación e incrementan, por ejemplo, la cantidad de brotes axilares (Lomax *et al.*, 1995). De esta manera determinar los efectos del proceso de micropropagación sobre el tejido vegetal es vital para optimizar los protocolos de propagación (Holdgate y Zandvoort, 1992; Kozai *et al.*, 1992).

En el presente trabajo se evalúa los efectos de la micropropagación sobre los patrones de crecimiento y sobrevivencia de plántulas *in vitro* de *Cinchona officinalis*, una especie que se encuentra fuertemente amenazada y para la cual los procesos de micropropagación pueden convertirse en una herramienta importante de restauración de poblaciones. Específicamente nos interesa responder las siguientes preguntas; i. Las plántulas que han sufrido procesos de micropropagación poseen un mayor potencial de brotación que el material no micropropagado? ii. La tasa de crecimiento y el crecimiento total de los individuos están influidos por el potencial de brotación?

iii. La probabilidad de supervivencia de las plántulas es dependiente de la micropropagación y está afectada por las características de tamaño de la plántula?

METODOLOGÍA

Especie de Estudio.-

Cinchona officinalis habita las estribaciones de Los Andes desde los 2300 hasta los 3100 m.s.n.m (Garmendia, 2005), y es endémica del valle de Loja, sur del Ecuador (Garmendia, 2005; Anderson, 1998). *C. officinalis* enfrentó una reducción significativa en el tamaño de la población durante la época de la colonia y posteriormente durante la segunda guerra mundial, lo cual ha puesto la especie al límite de su desaparición (Madsen, 2002; Espinosa *et al.*, en prep.). Las poblaciones cercanas a la ciudad de Loja fueron particularmente afectadas, los mercados europeos de cascarilla durante 1640-1776 (el comienzo de su explotación) se suministraron casi exclusivamente con las poblaciones de los alrededores de esta ciudad (Madsen, 2002). Hoy en día la pérdida de hábitat y la fragmentación de las pocas poblaciones remanentes colocan a la especie en un estado crítico de conservación (Espinosa no publ.).

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

Obtención del material y establecimiento del cultivo.-

La introducción *in vitro* se la realizó a partir de semillas recolectadas en la parroquia San Pedro de Vilcabamba (Cerro Aguarango), Loja, Ecuador. En este sector específicamente en el cerro Aguarango, en la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Podocarpus se encuentra una población remanente de *C. officinalis*. Las semillas colectadas pasaron por un protocolo de

desinfección, el cual consiste en lavar las semillas con agua destilada, desinfectar con alcohol al 70% por un minuto y finalmente enjuagar con agua destilada (Willan, 1991).

Las semillas desinfectadas fueron sembradas *in vitro*, en medio nutricional Gamborg (B5) (1968) al 50%, el cual se ha utilizado en el cultivo *C. officinalis* y *C. pubescens Vahl, Martín (Henrichsen)* (Schripsema *et al.*, 1999; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997). Adicional al medio Gamborg se agregaron 7gr/1 agar y 10 gr/1 sacarosa. Una vez homogenizado el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.8 ± 0.02 , pHs más básicos o ácidos puede frenar el crecimiento y desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990). Cuando las semillas germinadas alcanzaron una edad de 2 meses se dividieron dos lotes de plántulas. El primer lote se mantuvo bajo condiciones de cultivo *in vitro* para su desarrollo y el segundo lote se utilizó en un proceso de micropropagación. El protocolo de micropropagación consistió en una combinación de 0.5 mg/1 de BAP (bencilaminopurina) y 0.1 mg/1 de ANA (ácido naftaleno acético) según lo propuesto por Armijos (Armijos, no publ.).

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

Monitoreo de crecimiento.-

Una vez culminada la fase de micropropagación y repicadas las plántulas de las dos proveniencias se inició la fase de desarrollo de plántulas. A partir del mes de crecimiento de los segmentos nodales se marcaron 15 frascos provenientes de material micropropagado y 15 frascos de material proveniente de semillas, en total se monitorearon 120 plántulas en laboratorio. Durante 4 meses entre junio y octubre del 2011

durante la fase de crecimiento se monitorizó mensualmente los frascos marcados, en cada individuo se evaluaron: los brotes iniciales (al iniciar el monitoreo), incremento de brotes (brotes incrementales) y crecimiento en altura de las plántulas (mm).

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

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

Análisis de datos.-

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

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

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

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

RESULTADOS

El monitorización se desarrolló durante 8 meses entre julio del 2011 a abril del 2012, esta actividad incluyo 4 meses de seguimiento *in vitro* (de julio a octubre) y 4 meses *ex vitro* (de noviembre a febrero). Durante la fase *ex vitro* se contabili-

zaron 732 plántulas provenientes de la micropropagación y 1256 provenientes de semillas.

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

provenientes de semillas tuvieron un valor promedio de 5 brotes (rango entre 0 y 16), menor al encontrado en las plántulas micropropagadas con un valor promedio de 7 brotes (rango entre 0 y 16 brotes).

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

Tabla 1. Efecto de la procedencia y la cantidad de brotes sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento *in vitro*. La significancia de las variables dentro del modelo lineal se muestra como: *** para P valores <0.001, **>0.01, *0.05.

	Crecimiento		Tasa de Crecimiento	
	Estimador	P valor	Estimador	P valor
Intercepto	39,329	***	10,614	***
Brotos Iniciales	-1.679	***	-0.5005	***
Semillas	-23.542	***	-5.716	**
B.Iniciales x Semillas	2.404	***	0.5793	**

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

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

Los resultados de los modelos lineales muestran un efecto significativamente negativo de los brotes iniciales sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento de las plántulas. Las plántulas con menor cantidad de brotes iniciales tienen un crecimiento y una tasa de crecimiento mayor a las plántulas con mayor número de brotes. La

procedencia de las plántulas afectó significativamente al crecimiento, en donde registró una menor tasa de crecimiento de las plántulas provenientes de semillas.

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

La procedencia demostró afectar significativamente tanto el crecimiento como la tasa de crecimiento bajo condiciones *ex vitro*, de acuerdo con los modelos lineales utilizados. Las plántulas procedentes de semillas tienen un mayor crecimiento y una mayor tasa de crecimiento. La

interacción entre tamaño inicial y la proveniencia tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento, en el caso de las plántulas provenientes de semillas existe una relación

negativa entre tamaño inicial y crecimiento, lo cual implica que las plántulas provenientes de semillas con menor tamaño inicial tienen un crecimiento mayor y más acelerado (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la proveniencia y el tamaño inicial sobre el crecimiento y la tasa de crecimiento *ex vitro*. La significancia de las variables dentro del modelo lineal se muestra como: *** para P valores <0.001, **>0.01, *0.05.

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

Factores que determinan la sobrevivencia.-

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

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

DISCUSIÓN

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

mayor producción de brotes y reducen la dominancia apical durante la fase *in vitro*.

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

Los efectos residuales mostrados podrían estar afectando el potencial de crecimiento de las plántulas. En donde, las plántulas que tuvieron un mayor número de brotes iniciales demostraron un menor crecimiento, algunos autores plantean que la formación de brotes afectaría al crecimiento de las mismas (Kubota *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados muestran efectos diferentes entre las plántulas provenientes de semillas y micropropagadas. En el caso de las primeras tuvieron una relación directa entre número de brotes y crecimiento; es posible que en el caso de estas plántulas el número de brotes esté directamente relacionado con el vigor, de esta manera

plántulas más vigorosas tienen un mayor número de brotes y un mayor crecimiento esta respuesta ha sido observada normalmente en otras especies de árboles (Zaidman *et al.*, 2010) donde el vigor de las plántulas está directamente relacionado con el crecimiento y el incremento del área foliar .

Durante la fase *ex vitro* se pudo evidenciar un cambio en el patrón de crecimiento; así las plántulas provenientes de semillas tuvieron un mayor crecimiento que las plántulas micropropagadas. Varios estudios han mostrado que el cultivo *in vitro* genera cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas (Buddenford-Joosten y Woltering, 1994; Kozai *et al.*, 1992; Zárate *et al.*, 1988). Estas modificaciones podrían alterar las respuestas de las plántulas, de esta forma es posible que los efectos residuales de los reguladores de crecimiento en el caso de las plántulas micropropagadas ya no actúen durante la fase de aclimatación.

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

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

El tamaño de las plántulas durante el proceso de aclimatación es fundamental para su desarrollo y

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

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte del proyecto "EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *Cinchona officinalis* EN LA PROVINCIA DE LOJA". PROY_IECOLOGÍA_0024 financiado por la UTPL en su convocatoria 2010. Agradecemos especialmente a Rosa Armijos por la información sobre los protocolos de micropropagación de *C. officinalis*, a la Reserva el Madrigal por el acceso a semillas de la especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre Z, Madsen JE, Cotton E, Balslev H. (eds.) 2002. Botánica Austroecuatorial: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchi. Ediciones Abya-Yala, Quito.
- Amancio S, Rebordao JP y Aves MM. 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **58**: 31–37.
- Anderson L. 1998. A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchonae). *Memories of the New York Botanical Garden*. **80**: 1–75.
- Ascon-Bieto J. y Talon M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal .1ra Edición. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, España
- Atarés A., 2010. El cultivo *in vitro* de las plantas: ventajas y aplicaciones. Jornadas de divulgación científica. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Brainerd KE y Fuchigami LH. 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. *Journal of Experimental Botany*. **33**: 388–392
- Buddenford-Joosten JMC y Woltering EJ. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Reg.* **15**:1–16
- Cáceres K. 2004. Propagación *in vitro* de los porta injertos de cerezo (*Prunus avium* L.) y *Prunus cerasus*. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 83 pp.
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.
- Clifford BR, y Taylor AR. 2008. Bioestadística. Editorial Pearson Educación. México. 317 pp.
- Dinerstein E, Olson DM, Graham DJ, Webster A L, Primm SA, Bookbinder MP, y Ledec, A. 1995. Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean. *World Bank* 129 pp.
- Engels JMM. 2003. Plant genetic resources management and conservation strategies: problems and progress. *Acta Hortícola*. **623**: 179–191.
- Garmendia A. 2005. El árbol de la Quina (*Cinchona* sp.): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja.
- Harrington DP, y Fleming TR. 1982. A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika* **69**: 553–566.
- Hartmann H, y Kester D. 1995. *Propagación de plantas, principios y prácticas*. Ed. Continental, México. 760 pp.
- Hazarika BN. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*. **85** (12): 1704–1712
- Holdgate DP y Zandvoort EA. 1992. Automated micropropagation and the application of a laser beam for cutting. En: Kurata K. y Kozai T, Transplant production systems:

- 297-231. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Jacyna T y Barnard J. 2008. Modification of Branching Behavior in Apical-Dominant Apple Trees with Plant Growth Regulators and Their Residual Effects on Tree Growth After Transplanting. *Journal of the American Pomological Society*, **62** (4) 160–172.
- Kozai T, Fujiwara M, Hayashi M y Aitken-Christie J. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, K. y Kozai. *Transplant Production Systems: 247-282*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Kubota C, Ezawa M, Kozai T, Wilson SB. 2002. In situ estimation of carbon balance of *in vitro* sweet potato and tomato plantlets cultured with varying initial sucrose concentrations in the medium. *Journal of American Society of Horticultural Science*. **127**: 963–970
- Lara A, Valverde R, Gómez L, e Hidalgo N. 2003. Micropropagación de la Planta Medicinal *Psychotria acuminata*. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe*, Universidad de San José de Costa Rica
- Lira R. 2000. *Fisiología Vegetal*. Primera Edición. Ed. Trillas. Impreso en México.
- Lomax TL, GK Muday y Rubery PH. 1995. Auxin transport: 509–530. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer.
- Madsen JE. 2002. Historia cultural de la cascarilla de Loja. En: Aguirre Z, Madsen JE, Cotton E, Balslev H (eds.) *Botánica Austroecuatorialiana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*: 385–399. Ediciones Abya-Yala, Quito.
- McCauley DE. 1995. Effects of population dynamics on genetics in mosaic landscapes: 178–198 in Hansson L, Famgh L, and Merriam G, editors. *Mosaic landscape and ecological processes*. Chapman & Hall, London.
- Morocho D y Romero J (Eds.) 2003. *Bosques del Sur. El estado de 12 remanentes de bosques andinos de la provincia de Loja*. Fundación Arcoiris/ PROBONA. Loja, Ecuador.
- Muñoz de Malajovich MA. 2006. *Biología*. Editorial Universidad Nacional de Quilmes.
- Myers N, Mittermaeier RA, Mitternaeier CG, Da Fonseca GAB y Kent J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priorities. *Nature*. **403** (25): 853–858
- Myers N. 1986. Tropical deforestation and mega-extinction spasm. En: Soulé ME. (ed). *Conservation biology, the science of scarcity and diversity*: 394–409. Sinauer Associates, Sunderland.
- Nason JD, y Hamrick JL. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* **88**:264–276.
- Pérez L. 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. GEO. Santa Clara, Cuba. Aguirre Z., Madsen JE, Cotton E, y Balslev H (Eds.) 2002. *Botánica Austroecuatorialiana: Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*. Quito: Abya Yala.
- Pierik R. 1990. *Cultivo in vitro de Plantas Superiores*. 3era edición. *Ediciones Mundi-Prensa*. Madrid, España.
- R Core Team. 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rai MK, Shekhawat NS, Harish A, Gupta K, Phulwaria M, Ram K y Jaiswal U. 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **106**(2):179–190.

- Ramos-Valdivia A, van der Heijden R y Verpoorte R. 1997. Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphatesynthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta*. *Planta* **203**, 155–161.
- Sánchez A, y Arguedas M. 1997. Desinfección de suelos en viveros forestales por solarización. Plagas y enfermedades forestales #21. Cartago, Costa Rica. Tecnológico de Costa Rica. 4 pp.
- Schripsema J, Ramos-Valdivia A y Verpoorte R. 1999. Robusta quinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspensión cultura. *Phytochemistry* **51**: 55–60.
- Sierra R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. *Proyecto INEFAN/GEF_BIRF y EcocCiencia*. Quito.Ecuador.
- Soares FP, Paiva R, Alvarenga A, Nery FC, Vargas DP, Silva D. 2011. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Ciência e Agrotecnologia*, **35**(1), 152–157.
- Souza FV, Canto AM, Souza A, y Costa MA. 2010. Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **32**(2): 612-617.
- Templeton AR, Shaw K., Routman E, y Davis SK. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**: 13–27.
- Willan RL. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales. Depósito de documentos de la FAO. Producido por Departamentos de Montes. ISBN 92-5-302291-4 Roma.
- Young AG, Merriam HG, y Warwick SI. 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh (sugar maple) populations. *Heredity* **71**: 277–289.
- Zaidman BZ, Ghanim M, Vaknin Y. 2010. Effect of seed weight on seed vigour and early seedling growth of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Seed Science and Technology*. **38**(3): 757–766
- Zárate D, Arce M, Solano P, Gutiérrez M, Domínguez L, y Chávez M. 1988. Inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes foliares del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) híbrido Blazer. *Fitotecnia Mexicana*. **11**: 199–204.