Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de Cinchona officinalis, Linneo.

Tesis Doctoral
Rosa Armijos González
2016

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL

TESIS DOCTORAL

***Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la
variación somaclonal de Cinchona officinalis, Linneo.***

Autora: Rosa Armijos González¹

Director: Dr. César Pérez Ruiz²

¹Departamento de Ciencias Naturales- Universidad Técnica Particular de Loja.

²Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal, E. T.S. Ingenieros Agrónomos
Universidad Politécnica de Madrid.

Madrid, 2016

Cesar Félix Pérez Ruiz, Catedrático del Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid

CERTIFICA:

Que los trabajos de investigación desarrollados en la memoria de tesis doctoral:

“Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo”, son aptos para ser presentados por Rosa Enith Armijos González ante el Tribunal que en su día se consigne, para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Madrid.

VºBº Director de Tesis

Dr. César Félix Pérez Ruiz

Tribunal nombrado por el Mgfco. y Exmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día..... de.....2016.

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa y lectura de Tesis el día.....de.....de 2016 en la E.T.S.I. Ingenieros Agrónomos.

Calificación.....

.....

EL PRESIDENTE

.....

LOS VOCALES

.....

EL SECRETARIO

Con mucho cariño a Marlon, Francisco y Sofía

a mis padres Carlos y María, hermanos, sobrina y familia política

por su confianza y apoyo permanente.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a Dios, por darme la luz de cada día. A toda mi familia, en especial a Marlon, Francisco y Sofía por ser mis compañeros de vida y ser siempre mi apoyo y fortaleza; a mis padres Carlos y María por todo su amor y enseñanzas, a mis hermanos Karla, Carlos, Paúl, Pablo y a mi sobrina Luciana por ser compañeros de inolvidables aventuras y a mi familia política por todo su cariño.

Al doctor Cesar Pérez por su aprecio, paciencia, apoyo incondicional y asesoría durante el desarrollo del trabajo tesis.

De manera especial a mis compañeros de trabajo del Departamento de Ciencias Naturales por su apoyo desinteresado, a Yadi mi buena amiga y compañera, por su orientación valiosa en el desarrollo y culminación en este trabajo y por siempre estar dispuesta a ayudar; a Pablo por su ayuda y mucha paciencia para el análisis de los datos; a Baito, Diego, Elizabeth, José Miguel por su cariño y que de una u otra forma contribuyeron, a mis amigas Marthi y Rita. También de manera muy importante por su apoyo a Jackson González, María Fernanda Gia, Félix Jara, Paúl Córdova, Adriana Santos, Fernando Serrano y Julissa Medina. Agradezco a Omar Malagón por el empujoncito final para la culminación de este trabajo.

A los doctores Luis Miguel Romero ex rector de la UTPL y César Pérez de la UPM, por su empeño desinteresado en organizar y sacar adelante el Programa de Doctorado conjunto en Gestión y Manejo de Recursos Fitogenéticos. Finalmente a los directivos y personal de la Universidad Técnica Particular de Loja y Universidad Politécnica de Madrid por el aporte financiero y logístico para la ejecución de este trabajo, y por la confianza depositada en la formación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	31
METODOLOGÍA GENERAL.....	33
CAPITULO 1	37
<i>In vitro</i> germination and shoot proliferation of the threatened species <i>Cinchona officinalis</i> L (Rubiaceae).	37
CAPITULO 2	63
Evaluación de la estabilidad genética en explantes cultivados <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> , mediante marcadores ISSR.	63
CAPITULO 3	97
Conservación <i>in vitro</i> de <i>Cinchona officinalis</i> : crecimiento limitado y crioconservación de segmentos nodales y yemas.	
CONCLUSIONES GENERALES	137

RESUMEN

Cinchona officinalis (Rubiaceae), especie endémica del Valle de Loja, ubicado en la región sur del Ecuador, es un recurso forestal de importancia medicinal y ecológica, además la especie ha sido catalogada como planta nacional y es un ícono de la región sur por su aporte a la farmacopea mundial. Esta especie, entre los siglos XVII-XIX sufrió una gran presión en sus poblaciones debido a la extracción masiva de la corteza para la cura del paludismo. Aunque la actividad extractiva generó grandes ingresos a la Corona Española y a la región Sur del Ecuador, ésta fue poco o nada sustentable ecológicamente, provocando la desaparición de la especie en muchos sitios de la provincia, pues, en su momento, no se consideraron alternativas de recuperación de las poblaciones naturales.

Actualmente la extracción y consumo de la corteza en la zona de origen es baja o nula, sin embargo esta zona enfrenta nuevas amenazas. La deforestación a causa de proyectos de desarrollo en infraestructuras, la práctica de actividades agrícolas y de ganadería, y los efectos del cambio climático han ocasionado, en estos últimos años, la fragmentación de los ecosistemas. La mayoría de los bosques del sur del Ecuador se han convertido en parches aislados (los bosques en los que se distribuye *C. officinalis* no son la excepción) siendo esta la principal causa para que la especie se encuentre en estado de amenaza. Los individuos de la especie tienen una alta capacidad de rebrote y producen semillas durante todo el año; sin embargo la capacidad germinativa y la tasa de sobrevivencia son bajas, además de estas dificultades la especie requiere de la asociación con otras especies vegetales para su desarrollo, lo cual ha limitado su distribución en pequeños parches aislados.

Con esta problemática, la recuperación natural de las poblaciones es una necesidad evidente. Varios trabajos y esfuerzos previos se han realizado a nivel local: i. Identificación de la distribución actual y potencial; ii. Determinación de la fenología y fructificación iii. Programas de educación ambiental, iv. Análisis moleculares para determinar la diversidad genética. v. Ensayos de propagación vegetativa; y otras acciones de tipo cultural.

No obstante, el estado de conservación y manejo de las poblaciones naturales no ha mejorado significativamente, siendo necesaria la aplicación de estrategias integradas de conservación *in situ* y *ex situ*, que permitan la recuperación y permanencia de las poblaciones naturales a largo plazo.

El presente trabajo tiene como fin dar alternativas para el cultivo de tejidos *in vitro* de *Cinchona officinalis* centrados en la propagación masiva a partir de semillas, análisis de la fidelidad genética y alternativas de conservación de tejidos. Los objetivos específicos que

se plantean son: i. Analizar el proceso de germinación y proliferación *in vitro*. ii. Evaluar la estabilidad genética en explantes cultivados *in vitro*, mediante marcadores ISSR. iii. Establecer protocolos de conservación *in vitro* mediante limitación del crecimiento y criopreservación de segmentos nodales y yemas.

Los resultados más significativos de esta investigación fueron:

- i. **El desarrollo de protocolos eficientes para mejorar los porcentajes de germinación y la proliferación de brotes en explantos cultivados *in vitro*.** Para evaluar el efecto de los fenoles sobre la germinación, se determinó el contenido total de fenoles y el porcentaje de germinación en semillas de *C. officinalis* comparados con una especie de control, *C. pubescens*. Para inducir a proliferación, se utilizaron segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* en medio Gamborg (1968) suplementado con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas). Los resultados obtenidos sugieren que el contenido de compuestos fenólicos es alto en las semillas de *C. officinalis* en comparación con las semillas de *C. pubescens*. Estos fenoles pueden eliminarse con peróxido de hidrógeno o con lavados de agua para estimular la germinación. La formación de nuevos brotes y callos en la mayoría de las combinaciones de reguladores de crecimiento se observó en un período de 45 días. El mayor porcentaje de proliferación de brotes, formación de callos y presencia de brotes adventicios se obtuvo en medio Gamborg (B5) suplementado con 5.0 mg/l 6-bencil-aminopurina y 3.0 mg/l de ácido indol-3-butírico.
- ii. **La evaluación de la fidelidad genética de los explantes obtenidos con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal y diversos subcultivos.** Se realizó el seguimiento a los explantes obtenidos de la fase anterior, determinando el índice de multiplicación y analizando la fidelidad genética de los tejidos obtenidos por las dos vías regenerativas: brotación directa y regeneración de brotes a partir de callos. Este análisis se realizó por amplificación mediante PCR de las secuencias ubicadas entre microsatélites-ISSR (Inter simple sequence repeat). El medio Gamborg (B5) con 3.0 mg/l de AIB y 5.0 mg/l de BAP usado como medio de inducción en la primera etapa de cultivo generó el mayor índice de proliferación (11.5). Un total de 13 marcadores ISSR fueron analizados, 6 de éstos fueron polimórficos. El mayor porcentaje de variación somaclonal fue inducido en presencia de 1.0 mg/l 2,4-D combinado con 0.2 mg/l Kin con un 1.8% en el segundo

sub-cultivo de regeneración, la cual incrementó a 3.6% en el tercer sub-cultivo. Todas las combinaciones con presencia de 2,4-D produjeron la formación de callos y presentaron variación genética. Por su parte la fidelidad genética se mantuvo en los sistemas de propagación directa a través de la formación de brotes a partir de meristemos preformados.

- iii. **El establecimiento de protocolos de conservación *in vitro* y crioconservación de segmentos nodales y yemas.** Para la conservación limitando el crecimiento, se cultivaron segmentos nodales en los medios MS y B5 en tres concentraciones de sus componentes (25, 50 y 100%); y en medio B5 más agentes osmóticos como el manitol, sorbitol y sacarosa en diferentes concentraciones (2, 4 y 8%); los cultivos se mantuvieron por 12 meses sin subcultivos. Para el establecimiento de protocolos para la crioconservación (paralización del metabolismo) se usaron yemas axilares y apicales a las cuales se les aplicaron los métodos de encapsulación-deshidratación y vitrificación. La efectividad de los protocolos usados se determinó en función de la sobrevivencia, reducción del crecimiento y regeneración. Los resultados obtenidos en este apartado reflejan que un crecimiento limitado puede mantener tejidos durante 12 meses de almacenamiento, usando medio B5 más manitol entre 2 y 8%. En los protocolos de crioconservación, se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación tras la congelación en NL en el tratamiento control seguido por el método crioprotector de encapsulación-deshidratación.

Este trabajo brinda alternativas para la propagación de *C. officinalis* bajo condiciones *in vitro*, partiendo de material vegetal con alta diversidad genética. El material propagado puede ser fuente de germoplasma para la recuperación y reforzamiento de las poblaciones naturales así como una alternativa de producción para las comunidades locales debido a la demanda actual de corteza de la zona de origen para la elaboración de agua tónica.

ABSTRACT

Cinchona officinalis (Rubiaceae) is endemic to the Loja Valley, located in the southern area of Ecuador. The importance of this plant as medical and ecological resource is so great that it has been designated as the national flower and is an icon of the southern region for its contribution to the world pharmacopoeia. Between XVII-XIX centuries its population suffered great reduction due to massive harvesting of the bark to cure malaria. Although extraction activity generated large revenues to the Spanish Crown and the southern region of Ecuador, this was not ecologically sustainable, causing the disappearance of the species in many areas of the province, because during that time alternatives to prevent extinction and recover natural populations were not taken in account.

Currently the extraction and consumption of bark in the area of origin is almost absent, but this species faces new threats. Deforestation due to infrastructure development, the practice of farming and ranching, and the effects of climate change had led to the fragmentation of ecosystems during the recent years. Most of the forests of southern Ecuador have become isolated patches, including those where *C. officinalis* is diffused. The lack of suitable habitat is today the main threat for the species.

The species has a high capacity for regeneration and produces seeds throughout the year, but the germination rate is low and the growth is slow. In addition, the species requires the association with other plant species to develop. All these factors had limited its distribution to small isolated patches.

The natural recovery of populations is essential to face this problem. Several studies and previous efforts had been made at local level: i. Identification of current and potential distribution; ii. Phenology determination. iii. Environmental education programs, iv. Molecular analysis to determine the genetic diversity. v. Testing of vegetative propagation; and other actions of cultural nature.

Despite these efforts, the state of conservation and management of natural populations has not improved significantly. Implementation of integrated *in situ* and *ex situ* conservation strategies for the recovery and permanence of long-term natural populations is still needed.

This work aims to provide alternatives for *in vitro* culture of tissue of *Cinchona officinalis* focused on mass propagation from seeds, genetic fidelity analysis and tissue conservation alternatives. The specific aims are: i. Analyze the process of germination and proliferation *in vitro*. ii. To evaluate the genetic stability of the explants cultured *in vitro* by ISSR markers. iii. Establish protocols for *in vitro* conservation by limiting growth and cryopreservation of nodal segments and buds.

The most significant results of this research were:

- i. **The development of efficient protocols to improve germination rates and proliferation of buds in explants cultured *in vitro*.** To study the effect of phenols on germination, the total phenolic content and percentage germination was measured in *C. officinalis* and in a control species, *C. pubescens*, for comparison.

The content of phenolic compounds in *C. officinalis* seeds is higher than in *C. pubescens*. These phenols can be removed with hydrogen peroxide or water washes to stimulate germination.

To analyze the regeneration, we used nodal explants from seedlings germinated *in vitro* on Gamborg medium (1968) supplemented with different combinations of growth regulators (auxins and cytokinins) to induce proliferation. The formation of new shoots and calluses was observed within a period of 45 days in most combinations of growth regulators. The highest percentage of shoot proliferation, callus formation and adventitious buds were obtained in B5 medium supplemented with 5.0 mg/l 6-benzyl-aminopurine and 3.0 mg/l indole-3-butyric acid.

- ii. **Evaluating genetic fidelity explants obtained with various combinations of plant growth regulators and different subcultures.** The genetic fidelity was analyzed in tissues obtained by the two regenerative pathways: direct sprouting and shoot regeneration from callus.

This analysis was performed by PCR amplification of the sequences located between microsatellite-ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Among a total of 13 ISSR markers analyzed, 6 were polymorphic. The highest percentage of somaclonal variation was induced in the presence of 1.0 mg/l 2,4-D combined with 0.2 mg/l Kin with 1.8% in the second round of regeneration, and increased to 3.6% in the third round.

The presence of 2,4-D induced genetic variation in all the combinations of growth regulators. Meanwhile genetic fidelity remained systems propagation through direct shoot formation from meristems preformed.

- iii. **Establishing conservation protocols *in vitro* and cryoconservation of nodal segments and buds.** For medium-term conservation (limited growth) nodal segments were cultured in MS and B5 media at three concentrations (25, 50 and 100%); we tested B5 medium with different concentrations of osmotic agents such as mannitol, sorbitol and sucrose (2, 4 and 8%); cultures were maintained for 12 months with regular subculturing. To establish protocols for cryoconservation (cessation of metabolism) different methods of encapsulation-dehydration and vitrification were applied to axillary and apical buds. The effectiveness of the used protocols is determined based on the survival, growth and regeneration success. The results show that these tissues can be maintained in storage for 12 months, using B5 medium plus mannitol between 2 and 8%. The cryoconservation protocol with highest percentage of recovery was obtained by contral treatment, followed by freezing in NL with encapsulation-dehydration method.

This work provides alternatives for the propagation *in vitro* of *C. officinalis*, starting from plant material with high genetic diversity. The obtained material represents a source of germplasm to support the recovery and strengthening of natural populations as well as a creation of alternative sources for local communities due to the current demand of bark for the preparation of tonic water.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Cinchona* (Rubiaceae), tienen su origen en los Andes de Sudamérica, su descubrimiento y taxonomía ha sido desde siempre bastante confuso (Nieto 2000). Se distribuyen a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes desde los 12° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (Anderson & Taylor 1994b). El género *Cinchona* lo constituyen las especies llamadas comúnmente cascarillas o quinas con más de cuarenta especies e híbridos naturales (Andersson 1993). De éstas, en Ecuador se encuentran doce especies y cuatro híbridos (Ulloa & Jorgensen 1995), siendo siete endémicas (Garmendia 2005) como *Cinchona officinalis*, que sólo se encuentra distribuida en el valle de Loja, en el sur de Ecuador (Andersson & Taylor 1994; Andersson 1998; Garmendia 2005). Esta especie habita en el bosque siempreverde montano bajo, en los lugares donde se encuentra distribuida, está asociada a especies arbustivas, que hacen que ésta tenga condiciones adecuadas para su crecimiento y desarrollo.

Las especies de *Cinchona* se hicieron famosas a principios del siglo XVII porque se utilizaron para curar entre otras enfermedades, la fiebre producida por la malaria. Luego su uso se hizo oficial en la Farmacopea Británica, dando crédito sobre su efectividad aun cuando no estaban identificadas taxonómicamente. El uso específico de la corteza permitió desarrollar tratamientos eficaces, para la cura de la malaria (originada por distintas especies de *Plasmodium*), enfermedad que destruye los glóbulos rojos y que ha sido descrita desde la más remota antigüedad. Según las estimaciones de la OMS en el 2013, 198 millones de personas en el mundo fueron infectadas y se produjeron 584000 muertes a causa de la malaria o paludismo (OMS 2015).

Entre las especies del género, una de las más efectivas fue *Cinchona officinalis* que ha sido utilizada por siglos para el tratamiento de la malaria, fiebre, y otras enfermedades (Madsen 2002, Garmendia 2005). Pertenece al grupo de especies medicinales que históricamente han sido exportadas desde el Ecuador al resto del mundo (Balslev et al. 2008). La *Cinchona* es probablemente la planta más importante en la historia de la medicina y ha sido descrita por muchos como el más grande descubrimiento médico, constituyéndose en el primer fármaco-terapéutico que aportó América a la farmacopea universal (Buitrón 1999).

Luego de varias observaciones por parte de los jesuitas, comenzaron a comprobar que la corteza era la que curaba los escalofríos de las fiebres logrando extender su uso a otras

regiones (Garmendia 2005). Además de las aplicaciones antipalúdicas o como una bebida amarga (Staba and Chung 1981). Se utiliza como aditivo amargo en la industria alimentaria y química (Garmendia 2005) y también es usada extensivamente para arritmias cardíacas.

Los compuestos alcaloides que hacen posible el control y cura del paludismo se concentran en mayor cantidad en la corteza (Ulloa & Jorgensen 1995), encontrándose entre 7-12% en total de alcaloides (McCalley 2002; Warhurst et al. 2003). La corteza se colectaba entre los 7 y 16 años de edad, para una mejor acumulación de los compuestos (Bisset 1982; Jorgensen & León, 1999).

Los componentes metabólicos que actúan en el control o eliminación del paludismo son la quinina, quinidina, cinchonidina y cinconina. La quinina compuesto principal de la corteza ha demostrado ser droga eficaz para la cura de paludismo, desde el uso de la corteza pulverizada, el aislado alcaloide cristalizado hasta su síntesis (Koblitz et al., 1983a; Hay et al, 1986).

En 1820, Pelletier y Caventón aislaron el alcaloide quinina, siendo posible a partir de entonces certificar el contenido de quinina en las cortezas de las diferentes especies (Acosta 1989; Garmendia 2005). Inglaterra, Francia y Holanda utilizaron esta información en sus expediciones para conseguir semillas y desarrollar plantaciones en colonias asiáticas. Estableciéndose así las primeras fábricas de quinina en Francia. Con estas acciones se pudo determinar las dosis preventivas y curativas, aumentando la demanda de los medicamentos. Posteriormente, con el objetivo de establecer plantaciones de *Cinchona*, se organizaron expediciones a Sudamérica para la recolección de semillas y plantas estableciéndose enormes plantaciones en Java y la India. A pesar de las grandes extensiones cultivadas el nivel de alcaloides obtenidos de la corteza fue bajo en comparación a las plantas silvestres (Nieto 2000; Garmendia 2005). Las expediciones a los países sudamericanos continuaron y así también el tráfico de semillas y plantas de *Cinchona* a pesar de su prohibición. Las plantaciones asiáticas llegaron posteriormente a una producción del 90% de quinina que se consumía a nivel mundial. Y en Sudamérica se establecían factorías para procesar la corteza y obtener sulfato de quinina, sin embargo las leyes prohibían la explotación de los árboles silvestres, llegando al fracaso de esta actividad (Garmendia 2005; Cuví 2009)

En 1945 se logra sintetizar la cloranquina, y tras la Segunda Guerra Mundial se convirtió en una droga de uso común que resultó eficaz en el tratamiento antimalárico; con esto se paralizan las expediciones cinchoneras, desplazando a la quinina de origen vegetal. Sin embargo las cepas de *Plasmodium falciparum* causante del paludismo empezaron a presentar resistencia a la cloranquina, obligándose a explotar nuevamente la corteza en 1965 y a sintetizar nuevas drogas en los años siguientes. En las zonas de origen las poblaciones silvestres disminuyeron considerablemente debido a la sobreexplotación y a la modificación de los ecosistemas (Madsen 2002). Muchos esfuerzos se han realizado durante los últimos 150 años para mejorar las plantaciones de especies e híbridos de *Cinchona* en áreas tropicales; así como el para mejorar la métodos de cuantificación, producción y aislamiento de los alcaloides (Birch & Doughty 1948; Geerlings et al. 1999; Ravishakara et al. 2001; Shibuya et al. 2003; Horie et al. 2006) debido a su importancia medicinal y comercial (Koblitz et al. 1983a).

A pesar de todos los esfuerzos realizados por sustituir el uso de la corteza, ésta se sigue usando para el tratamiento de la malaria como una droga terapéutica para casos severos de la enfermedad y ante cepas del plasmodio resistentes a drogas antimaláricas sintéticas (Estrella 1992; Warhurst et al. 2003; Kaufman & Rúveda 2004; Taylor 2005). Hoy en día, también se han originado varios fármacos derivados de *Artemisia annua* (artemisina) para el control de la malaria (van del Kooy & Sullivan 2013), sin embargo en casos severos de resistencia se usa la combinación con otros atimaláricos, lo que da un espacio para el uso combinado con la quinina.

El consumo de la corteza de *Cinchona* vuelve a resurgir, desde que en 1783 se incluye quinina en bebidas carbonatadas para la producir agua tónica, como bebida refrescante; su consumo se ha extendido por todo el mundo. Esta bebida también surgió como medida profiláctica contra la malaria. Sin embargo, debido a los efectos secundarios en mujeres embarazadas, personas con trastornos hepáticos y niños se ha sugerido evitar su uso o disminuir las dosis a pequeñas medidas terapéuticas (Feás et al. 2008).

Cinchona officinalis

Figura 1. *Cinchona officinalis* (Köhler, 1897)

Por algún tiempo la planta de la quina permaneció relegada y sobre todo sin un conocimiento científico de su especie y sus virtudes, no fue hasta 1742 que Carlos Linné, en su obra *Species Plantarum* (1742), clasifica científicamente y bautiza a la planta como *Cinchona officinalis* en honor de la Condesa Ana de Chinchón, que se atribuye como la primera mujer curada por la planta, sin embargo hoy en día se sabe que la *Cinchona* fue conocida gracias a la curación del Virrey, esposo de Condesa (Acosta 1989).

Cinchona officinalis (Fig. 1), tiene hábito de arbusto o árboles medianos a grandes hasta 6m de alto; con un tronco de 6cm de diámetro; glabros o pubescentes; el tallo algunas veces se descascara en forma de láminas; corteza amarga que generalmente es rojiza o pálida; las hojas son opuestas, decusadas, pecioladas, grandes; lámina ovada, elíptica, obovada, oblonga o sub-orbicular, papirácea a coriácea, alcanzan hasta los 11cm de largo. Inflorescencia terminal, paniculada, densa o espaciadamente ramificada (aspecto piramidal), con pequeñas brácteas en las ramificaciones; flores pediceladas, pocas o abundantes, de colores rosadas o purpúreas. Cápsulas de 1-2cm de largo. Las semillas de 5mm se disponen ascendentemente y de manera imbricada, son de tipo aladas de margen entero o irregular. Las características con respecto al tamaño hacen referencia a las plantas

encontradas actualmente, ya que las descripciones de las primeras plantas descritas hablan de árboles de mayor tamaño entre 8 a 25 m de altura (Madsen 2002; Mendoza et al. 2004).

Estado de conservación de *Cinchona officinalis*

En el siglo XVII se hace hincapié que la quina proveniente de Loja- Ecuador era la de mejor calidad, lo que ocasionó la explotación masiva de los cascarilleros y grandes beneficios económicos para el comercio por la compra a esta región. Por mucho tiempo se consideró a los árboles de Loja como la especie genuina y certificada por el éxito medicinal y comercial de la corteza (Nieto 2000; Taylor 2005). En varias de las expediciones a este sector se hicieron informes detallados sobre morfología, hábitat y sobre consejos para que se tomaran medidas y evitar la sobreexplotación de los quinares, sin embargo por su falta de descripción botánica no se pudo especificar a qué variedad de quinina se referían (Garmendia 2005). En la expedición de Mutis y la Real Expedición a Nueva Granada se describieron siete especies nuevas de quina y se puso en alerta sobre la escasez de la verdadera *Cinchona* de Loja (Nieto 2000; Madsen 2002; Garmendia 2005). Por tal motivo los bosques de Cajanuma y Uritusinga ubicados en la provincia de Loja fueron los lugares mayormente explotados. Siendo estas las principales fuentes de explotación de *Cinchona* o cascarilla hasta el siglo XIX provocando su desaparición total en muchos sitios (López 1968; Nieto 2000), a causa de una explotación no sustentable de este recurso natural (Madsen 2002). Según algunos autores la extracción exagerada de los árboles y la modificación del hábitat, han dado como resultado que algunas de las especies del género en la actualidad se encuentren amenazadas (Buitrón 1999; Valencia et al. 2000).

C. officinalis tiene su particularidad de distribución en el bosque nublado, que se caracteriza por presentar arboles aislados o en asociación con otras especies formando manchas de bosque (Acosta 1947). En la actualidad se pueden encontrar pequeños remanentes (Fig. 2) de bosques de *Cinchona*, sobre todo en partes altas y con poca accesibilidad, lo que confirma su distribución restringida a condiciones ecológicas determinadas (Madsen 2002; Garmendia 2005). El bosque de montaña se caracteriza por una alta concentración de endemismos (Sierra 1999) y según Garmendia (2005), las exigencias en cuanto a las características ambientales para el crecimiento de las especies de *Cinchona* influyen para un alto número de endemismos en el género que incluyen a *C. officinalis*. Siendo las especies endémicas las más vulnerables, con bajas posibilidades de éxito reproductivo y flujo de genes (Espinosa & Rios 2014).

Figura 2. Mapa de distribución actual de los remanentes de *Cinchona officinalis* en la provincia de Loja-Ecuador, elaborado por María Fernanda Tapia (2012).

La demanda por la corteza ha disminuido considerablemente, pero en el presente, factores como la modificación del hábitat para actividades de cultivo, crianza de animales, tala de árboles, construcción de vías, colonización, entre otras han ocasionado la reducción y fragilidad del hábitat de *C. officinalis* (Madsen 2002; Garmendia 2005). Según Tapia-Armijos et al. (2015) el porcentaje de deforestación en la región sur del Ecuador en el periodo 1989-2008 ha sido de 2.86% mayor a los años anteriores habiéndose transformando el 46% de la cobertura vegetal, a causa de la deforestación y la fragmentación, lo cual influye directamente sobre el funcionamiento de los ecosistemas y la conservación de la biodiversidad. Entre éstos el ecosistema de montaña donde habita de *C. officinalis* (Madsen 2002).

La *Cinchona* debido a su endemismo (Andersson 1998; Garmendia 2005), propiedades medicinales, descubrimiento en el Ecuador, provisión de corteza de Cinchona al resto del mundo, valor económico de exportación entre otras, fue denominada como “Planta nacional del Ecuador” considerando que ésta representa fitológicamente al Ecuador (Acosta 1989).

Métodos de propagación

Las plantas del género *Cinchona* pueden crecer entre 1 y 2 m anuales, pudiendo alcanzar entre 8 a 25 m de altura. Pueden propagarse por semilla (Fig. 3) o vegetativamente por estacas o injertos (Rentería 2002; Pappa 2004; Díaz & Loján 2004).

Figura 3. Plantas de *Cinchona officinalis* propagadas por semillas en proceso de rustificación o aclimatación de condiciones *in vitro* a *ex vitro* **a.** González (2010) **b.** Guzmán (2011).

Propagación por semillas

En *C. officinalis*, la floración y fructificación a lo largo del año ocurre con periodos variables, razón por la cual es posible obtener semillas durante todo el año, teniendo como picos los meses donde existe mayor precipitación de lluvias (Díaz & Loján 2004; Günter et al. 2008; Vélez datos no publicados). La producción de semillas comienza a los cuatro años de edad de la planta, alcanzando en promedio de 113,76 g de semillas/árbol (Díaz & Loján 2004). Debido a su condición de aladas (Fig. 4a) y a su bajo peso, las semillas son dispersadas con facilidad por el viento, alcanzando considerables distancias (Günter et al. 2008); como *C. pubescens*, que sus semillas alcanzan hasta los 15 metros de distancia con relación a la planta madre (Rentería 2002). Según Romero-Saritama (2015) las semillas al ser pequeñas aportan poco al crecimiento de la plántula germinada, dependiendo inmediatamente de los recursos que tengan disponibles a su alrededor, lo que no asegura su sobrevivencia. Con respecto a la polinización, en *C. officinalis* ésta es facilitada por animales (Günter et al. 2008), aparentemente por insectos.

Figura 4. *Cinchona officinalis* **a.** Semilla alada **b.** Plántulas provenientes de germinación en condiciones *in vitro* **c.** plántula regenerada por estolón en condiciones naturales

La viabilidad de las semillas del género *Cinchona* según varios reportes se pierde rápidamente; cuando las semillas están frescas germinan entre un periodo de 11-20 días y si son semillas viejas, el porcentaje de germinación disminuye según sea el periodo de almacenamiento (Acosta 1947; Pappa 2004). En *C. ledgeriana* la germinación comienza a los 21 días llegando a obtenerse hasta un 90% de germinación (Acosta, 1947); éstas semillas pueden germinar en ausencia o presencia de luz (Aerts & Verpoorte 1992). En semillas de *C. pubescens* recién colectadas y expuestas a la luz durante el proceso de germinación, alcanzan un porcentaje de hasta el 70% y éstas no pueden estar almacenadas por un periodo superior a los 4 meses puesto que pierden su viabilidad (Rentería, 2002).

Al igual que el periodo de almacenamiento, se ha determinado también que la exposición a la luz, es un factor influyente en la germinación. Según Pappa (2004) las semillas de *Cinchona* no germinan en oscuridad; y según Rentería (2002) las semillas de *C. pubescens* requieren de la presencia de luz para germinar y crecer en el suelo, siendo bajo el número de plántulas que sobreviven en ausencia de luz; también se ha reportado la presencia de dormancia en otras especies del género debido a su deficiente germinación, donde la luz difusa rompe la dormancia en *C. josephiana* (Thomas 1946). Por otro lado la presencia de dormancia también fue reportada en *C. ledgeriana*, y la germinación fue estimulada con la exposición a temperatura constante o alternada (Barton 1947). Finalmente en *C. officinalis* se ha determinado que la germinación en laboratorio es de 27% a los 40 días (Fig. 4b) y en semillas que han sido almacenadas en condiciones de bajas temperaturas por periodos de 3 meses aproximadamente, pueden alcanzarse porcentajes de germinación de hasta un 7% en un periodo de 100 días bajo condiciones de invernadero (Díaz & Loján 2004).

En resumen, los porcentajes de germinación en las especies de *Cinchona* son altos cuando las semillas son recién colectadas y éstos disminuyen con el almacenamiento; pero además se deben considerar los requerimientos de ciertas condiciones particulares a causa de la presencia de dormancia en algunas especies tales como *C. officinalis* (Ellis et al. 1985).

Propagación vegetativa

Las especies de *Cinchona* pueden propagarse en su ambiente natural o bajo condiciones *in vitro* de forma asexual o vegetativa, a través de retoños o rebrotes (Fig.4c) (Madsen 2002; Garmendía 2005). En *C. pubescens* se producen rebrotes en la parte basal de los árboles después de la tala (Rentería, 2002). La propagación de estas especies también puede realizarse mediante injertos o estacas a partir de plántulas provenientes de semillas (Pappa 2004).

Según George & Debergerh (2008), las mayores ventajas de la propagación *in vitro* en comparación con los métodos tradicionales de propagación son: 1) Inicio del cultivo a partir de pequeños segmentos, 2) Obtención de plantas libre de enfermedades, 3) Flexibilidad en el ajuste sobre los factores nutricionales, físicos y químicos que influyen sobre la regeneración vegetativa, 4) Obtención de clones que resultan lentos o difíciles de obtener; 5) Adquisición de nuevas características temporales beneficiosas para la producción, 6) Producción continua durante todo el año; 7) Menor cantidad de recursos y espacio; 8) Menos manos de obra y tiempo para subcultivos. Así también se presentan algunas desventajas como: 1) Elevados costos para el equipamiento e implementación de un laboratorio; 2) Baja capacidad autótrofa de las plantas; 3) Plantas susceptibles a la pérdida de agua y la mala adaptación a las condiciones *ex vitro*. Con esta técnica han sido propagadas un buen número de plantas medicinales que producen principios activos o que son vulnerables en su hábitat como *Catharanthus roseus*, *Taxus brevifolia* entre otras.

Por tanto, el cultivo *in vitro* también ha venido aplicándose como otra forma de propagación de las plántulas del género *Cinchona*, ya sea a partir de semillas o de partes vegetativas; su aplicación en la propagación de plántulas inició con la finalidad de contrarrestar dos principales problemas: la variación en el rendimiento de la producción de alcaloides en los distintos individuos y para disminuir el tiempo de espera en la cosecha de la corteza que va entre los 7 y los 16 años de la planta; por este motivo la técnica de cultivo *in vitro*, principalmente para establecer el cultivo de células en suspensión, se empezó a usar para producir alcaloides en altas cantidades y en un menor tiempo (Tabla 1).

Los primeros reportes en el cultivo *in vitro* para la proliferación de brotes fueron en *C. ledgeriana* (Hunter 1979), iniciados yemas apicales y axilares para proliferación de nuevos brotes. Mientras que en 1981, Staba & Chung, iniciaron los cultivos en *C. ledgeriana* y *C. succirubra* a partir de brotes. Por su parte Koblitz et al. (1983a) obtuvieron en sus cultivos brotes de mayor longitud de los brotes en *C. ledgeriana* y *C. succirubra*. Entre otros estudios están los realizados por Krikorian et al. (1982) y Hunter (1986) para inducir el enraizamiento y transferir a las plantas a condiciones *ex vitro*. Adicionalmente Hunter (1986) y Robins (1994) realizaron varias experiencias en la conservación de germoplasma *in vitro* de explantos de *Cinchona*, reduciéndose el porcentaje de proliferación de brotes. Luego la mayoría de reportes se basaron en los anteriores para el uso del cultivo de tejidos *in vitro* en la producción de alcaloides de *Cinchona*.

A continuación se detallan algunos de los estudios realizados en las especies de *Cinchona*.

Introducción

Tabla 1. Protocolos empleados en el cultivo *in vitro* de especies del genero *Cinchona*

Especie (s)	Explante de origen	Objetivo del estudio	Cultivo o vía regenerativa <i>in vitro</i>	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento mg/l	Referencia
<i>C. ledgeriana</i> y <i>C. succirubra</i>	Plántulas germinadas	Producción de quinina y quinidina	Hojas, raíces, células en suspensión.	MS	5.0 BA- 3.0 IBA. 5.0 BA- 1.0 2,4-D	Staba and Chung, 1981
<i>C. officinalis</i> , Ledgeriana	Yemas y ápices	Multiplicación de brotes y raíces	Brotes	---	----	Krikorian et al.1982
<i>C. ledgeriana</i> y <i>C. succirubra</i>	Semillas	Propagación en masa	Brotes y raíces	Konp's + B5; MS+B5	0.18 IAA - 2.3-6.8 BA 1.0 BA - 1.0 IBA- 1.0 AG ₃ en combinación con diferentes concentraciones de Floroglucinol, carbón activado y AIA.	Koblitz et al. 1983a
<i>C. ledgeriana</i> y <i>C. succirubra</i>	Hojas	Producción de Alcaloides en un cultivo de células en suspensión	Callos y células en suspensión	MS	0.2 Kin- 1.0 2,4-D - 0.1 AG ₃ .	Koblitz et al. 1983b
<i>C. ledgeriana</i>	Células en suspensión	Permeabilización de células, para liberación de alcaloides	Cultivo de células en suspensión	B5	0.1 BA - 0.5 2,4-D	Parr et al. 1984
<i>C. succirubra</i>	Células en suspensión	Actividad de la vía de shikimato	Cultivo de células en agitador y fermentador.	MS	0.2 Kin- 1.0 2,4-D - 0.1 AG ₃ .	Schmauder et al. 1985
<i>C. ledgeriana</i> y <i>C. pubescens</i>		Cultivo de células	Adición de micelios al cultivo para el incremento de antroquinonas	B5	0.2 Kin- 1.0 2,4-D	Wijnsma et al. 1985

Introducción

Especie (s)	Explante de origen	Objetivo del estudio	Cultivo o vía regenerativa <i>in vitro</i>	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento mg/l	Referencia
<i>C. ledgeriana</i>	Semillas	Callos y células en suspensión	Condiciones de cultivo: birreactores y frascos agitadores	B5	0.1 Kin- 1.0 2,4-D	Allan & Scragg 1986
<i>C. succirubra</i>	Tallos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Callos, células en suspensión	Producción de antraquinonas modificando nutrientes y hormonas	B5	0.1 Kin- 1.0 2,4-D	Khouri et al. 1986
<i>C. ledgeriana</i>	Plántulas	Brotes, raíces	Propagación y conservación de germoplasma	MS	1.0 BAP- 1.0 IBA	Hunter 1986
<i>C. ledgeriana</i>	Raíces	Raíces en cultivo en suspensión, precursores de alcaloides	Incremento en la producción de alcaloides	MS	0.1 Kin- 1.0 2,4-D	Hay et al. 1986; 1987
<i>C. ledgeriana</i>	Células en suspensión	Células transformadas	Toxicidad de quinolina al cultivo de células	B5		Walton et al. 1987
<i>C. ledgeriana</i> , <i>C. robusta</i>	Cultivo de células en suspensión	Cuantificación de alcaloides	Brotes y estructuras globulares compactas	B5, MS	2.0 2,4-D-0.2 Kinetina 50 de cisteína 0.5 BAP	Giroud et al. 1989
<i>C. ledgeriana</i>	Raíces, cotiledones, hipocótilos	Producción de alcaloides	Células en suspensión, estructuras globulares	B5	2.0 2,4-D-0.2 Kinetina	Hoekstra et al. 1990
<i>C. robusta</i>	Células en suspensión	Medición del peso fresco de un cultivo de células	Células en suspensión	B5, LS	2.0 2,4-D-0.2 Kinetina 2.0 NAA-0.2 Kinetina	Blom et al. 1992
<i>C. robusta</i>	Células en suspensión	Purificación y caracterización de strictosidina	Cultivo de células en suspensión	---	-----	Stevens et al. 1993

Introducción

Especie (s)	Explante de origen	Objetivo del estudio	Cultivo o vía regenerativa <i>in vitro</i>	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento mg/l	Referencia
<i>C. robusta</i>	Tallos de plántulas	Elicitación para la producción de antraquinonas	Cultivo de células en suspensión	B5	2.0 2.4-D-0.2 Kinetina	Ramos-Valdivia et al. 1997
<i>C. robusta</i>	Células en suspensión	Elicitación para la producción de antraquinonas	Cultivo en suspensión	---	-----	Schripsema et al. 1999
<i>C. robusta</i>	Células en suspensión	Mejora de la acumulación de antraquinonas	Células en suspensión	----	Protocolo de Ramos-Valdivia et al. 1997	Ying-Shan et al. 2002

Es importante evaluar la integridad genética de los explantes durante el proceso de cultivo *in vitro*, debido a que en éste se generan condiciones de estrés para las células y los tejidos pudiendo desencadenarse procesos mutagénicos. Éstos pueden dar origen a cambios genéticos y epigenéticos a los cuales se denomina variación somaclonal (Larkin & Scowcroft 1981; Jain & De Klerk 1998; Maraschin et al. 2002). La variación puede estar influenciada por la variación preexistente en los explantes y las condiciones de estrés que ocurren durante el proceso de cultivo (Bhojwani & Santu 2013). Por lo tanto la valoración de la fidelidad genética en el proceso de cultivo es importante para determinar el grado de alteración. Se han desarrollado diferentes técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares, para el estudio de variación somaclonal, éstas últimas demuestran una amplia utilidad en el análisis de la estabilidad genética mediante la detección de polimorfismos. Dentro de éstas los ISSRs (Inter- simple sequence repeat), que son marcadores conocidos como secuencias repetidas inter simples, permite detectar niveles de variación en las regiones microsatélites (Zane et al, 2002) que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Esta técnica es fácil de montar, altamente repetible y tiene la ventaja de utilizar marcadores o primers universales para las plantas (Eguiarte et al. 2007; Kunakh et al. 2015).

Además al ser el cultivo *in vitro* una estrategia de conservación de especies amenazadas, por permitir la multiplicación masiva de plantas (Bhojwani & Dantu 2013) con fines de reforestación en su hábitat natural, también ha sido aplicada en la conservación en bancos de germoplasma (Murch et al. 2000). La estrategia empleada de conservación dependerá de la naturaleza del material vegetal, duración de su ciclo de vida, modo de reproducción y tamaño de individuos, si es posible conservar semillas, o si presentan un número restringido de individuos (Hunter 1986; Cruz et al. 2013). En varios casos, la conservación de semillas no es factible debido a la reproducción vegetativa de la especie o la pérdida de viabilidad de las semillas durante el proceso previo a la conservación. Las ventajas de aplicar esta tecnología con fines de conservación son: i. Bajo impacto en las poblaciones naturales (Reed et al. 2013), ii. Estabilidad genética durante el almacenamiento, iii. Bajos costos de mantenimiento (Gopal et al. 2002; Paunescu 2009); iv. A través de la micropropagación se puede generar un gran número de propágulos (Reed et al. 2011). La conservación puede desarrollarse a través de dos métodos: el primero modificando el ambiente de cultivo para desacelerar el crecimiento celular, con el objetivo de aumentar el periodo de transferencia a un nuevo

cultivo. Mientras que el segundo, la crioconservación, permite la conservación indefinidamente debido a que los tejidos son conservados en nitrógeno líquido (-196°C) y se paraliza la actividad metabólica de las células (Sen-Rong 2012).

El cultivo *in vitro* es reconocido como una herramienta potencial para propagar tejidos a gran escala y en corto tiempo; así como conservar recursos fitogenéticos que presentan dificultades para propagarse y mantenerse en su medio natural (Liu & Yang 2012). La sostenibilidad de esta herramienta depende del mantenimiento de la fidelidad genética en los mencionados procesos (Levitus et al. 2011). Siendo la variación somaclonal un resultado no deseado, es de vital importancia el monitoreo de la integridad genética del material vegetal, para que sea apto y pueda ser utilizado en programas de reintroducción o restauración de las especies en el medio ambiente. Por lo tanto, en *C. officinalis*, al ser una especie que presenta dificultades de propagación en su medio natural, la técnica de cultivo *in vitro* se presenta como una alternativa útil para propagar masivamente nuevos explantes, los cuales deben partir de material vegetal con diversidad genética como semillas, para asegurar el reforzamiento de las poblaciones naturales. Así también este proceso debe ser complementado con la conservación *in vitro* de tejidos que garanticen permanencia de la especie y su posterior utilización. El presente trabajo reporta un procedimiento de propagación, evaluación de la estabilidad genética y procesos para la conservación de explantes bajo condiciones *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta M. (1947) Cinchonas del Ecuador. Quito: Publicaciones científicas Mas, 271 pp.
- Acosta M (1989) La *Cinchona* o Quina Planta Nacional del Ecuador. *Rev Acad Colomb Cien* 17 (65):305-311.
- Aerts R., Verpoorte R. (1992) The influence of tryptophan and tryptamine feeding and light on alkaloid biosynthesis in *Cinchona* seedlings. *Planta Med* 58:150-152.
- Allan E.J, Scragg A.H. 1986. Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 litre air-lift bioreactors. *Biotechnology Letters*. 8(9):635-638.

- Andersson L., Taylor M. (1994) Rubiaceae; Cinchoneae-Coptosapeltea. 162:1-4. In: Garling G., Andersson L. (Eds.), Flora of Ecuador 50:1-114. University of Gotenborg; Riksmuseum; Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Goteborg; Stockholm.
- Balslev H., Navarrete H., de la Torre L., Macía M. (2008) Introducción. In: De la Torre L., Navarrete H., Muriel M., Macía M., Balslev H. (eds). Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 2008: 1–3.
- Barton L (1947) Effect of different storage conditions on the germination of seeds of *Cinchona ledgeriana* Moens. Contrib Boyce Thompson Inst 15:1-10
- Bhojwani S., Santu P. (2013) Plant tissue culture: an introductory text. Springer, 309 pp.
- Birch H., Doughty L. (1948) The distribution and interrelationships of the alkaloids in the bark of *Cinchona Ledgeriana*. *Biochem J.* 43(1):38-44
- Bisset N. (1982) Economics aspects of medicinal and aromatic plants. In proceeding of the fourth meeting of Turkish pharmacognosists. Eskisehir, 55-65.
- Blom T, Kreis W, van Iren F, Libbenga K (1992) A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* 11(3):146-149.
- Buitrón, C. X. 1999. Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. TRAFFIC International, Cambridge, 136 pp.
- Cruz C., González M., Engelmann F. (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2:73-95.
- Cuvi N. (Ciencia e imperialismo en América Latina: la Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas (Tesis de Doctorado), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 168 pp.

- Díaz M, Loján M (2004) Fenología y propagación en vivero de especies forestales nativas del bosque protector "El Bosque". (Tesis de pregrado- Ingeniero Forestal), Universidad Nacional de Loja, Loja, 119 pp.
- Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (2007). Ecología Molecular. INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México, 594 pp.
- Ellis R, Hong T, Roberts E (1985) Handbook of seed technology for genebanks. 2 Vols. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, 456 pp.
- Espinosa CI., Ríos G. (2014) Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* *in vitro* y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 35 (1,2): 73-82.
- Estrella E. (1992). Hipólito Ruiz (S XVIII). Compendio Histórico- Médico Comercial de las Quinas. Investigación, Introducción y Notas. En Buitrón X. (Ed.) Ecuador: Uso y Comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. (pp. 77-79). TRAFFIC International, Cambridge.
- Feás X. Brasic J., Frente C., Cepeda A. (2008) Aspectos toxicológicos del consumo de bebidas refrescantes que contienen quinina. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 28(2):20-25.
- Garmendía A. (2005) El Árbol de la Quina (*Cinchona spp.*): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja, 204 pp.
- Geerlings A., Hallard D., Martinez A., Lopes I., van der Heijden R., Verpoorte R. (1999) Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* Ledgeriana hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* 19: 191-196.
- George E., Debergh P. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. In George E. Hall M., De Klerk G. (Eds.) *Plant propagation by tissue culture* 3rd edn. Springer, pp. 29-64.
- Giroud C., Van Der Leer T., Van Der Heijden R., Vepoorte R., Heeremans C., Niessen W., Van Der Greef J. (1989) Thermospray Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry

- (TPS LC/MS) Analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures, *Plant Med.* 57:142-148.
- Gopal J., Chamail A., Sarkar D. (2002) Slow-growth in vitro conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. *Potato Research* 45: 23-213.
- Günter S., Stimm B., Cabrera M., Diaz M., Lojan M., Ordoñez E., Richter M., Weber M. (2008) Tree phenology in montane forest of southern Ecuador can be explained by precipitation, radiation and photoperiodic control. *Journal of Tropical Ecology.* 24:247-258.
- Hay C, Anderson L, Phillipson J, Curless D, Brown T (1987) In vitro culture of *Cinchona* species. Part II Time-course studies on the uptake of radio-labelled alkaloid precursors and alkaloids by *C. ledgeriana* root suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9(3):197-206
- Hay C, Anderson L, Phillipson J, Roberts M (1986) *In vitro* culture of *Cinchona* species. Precursor feeding of *C. ledgeriana* root suspension cultures with L-tryptophan. *Plant Cell Reports* 5(1):1-4
- Hoekstra S., Harkes P., Verpoorte R., Libbenga K. (1990) Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Reposts.* 8: 571-574.
- Horie M., Oishi M., Ishikawa F., Shindo T., Yasui A. (2006) Liquid chromatographic analysis of *Cinchona* alkaloids in Beverages. *Journal of AOAC International* 89(4):1042-1047.
- Hunter C. (1979) *In vitro* culture of *Cinchona ledgeriana* L. *J Horti Sci* 54(2):111-114
propagation and germplasm storage of *Cinchona*. In Withers L., Alderson P. (Eds.) *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworths, pp. 291-301.
- Hunter C. (1986) *In vitro* propagation and germplasm storage of *Cinchona*. In Withers L., Alderson P. (Eds.) *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworths, pp, 291-301.

- Hunter C. (1988) *Cinchona spp.*: Micropropagation, and the *in vitro* production of quinine and quinidine. In: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 4. Medicinal and aromatic plants I. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 367–387.
- Jain S., De Klerk G. (1998) Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. En Prieto H. Jordan M., Barrueto P., Cordeiro M., Durzan D. (Eds.) Biotecnología Vegetal. Santiago de Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp. 88-92.
- Jorgensen P., León S. (1999) Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden 75:1-1181.
- Kaufman T., Rúveda E. E. 2004. Cuando el éxito tiene sabor amargo: Aislamiento y síntesis de quinina. Revista Ciencia Hoy en línea, 14: 81.
- Khouri H., Ibrahim R. And Rideau M. (1986) Effects of nutritional and hormonal factor on growth and production of anthraquinone glucosydes in cell suspensión cultures of *Cinchona succirubra*. *Plan Cell Reports* 5: 423-426.
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983a) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. Alkaloid production in cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 2(3):122-125.
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983b) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports* 2(2):95-97.
- Krikorian A., Singh M., Quinn C. (1982). Aseptic micropropagation of *Cinchona*: prospects and problems En George E. Plant propagation by tissue culture Part 2 In Practice, Exegetics limited, England. 758 pp
- Kunakh V., Mel'nyk V., Drobyk N., Andreev I., Spiridonova K., Twardovska M., Konvalyuk I., Adonin V. (2015) Chapter 9: Genetic Variation Induced by Tissue and Organ

- Culture in *Gentiana* Species. Biotechnology and Applications. The Gentianaceae 2:199-238.
- Larkin P., Scowcroft W. (1981) Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. En Kaeppler S., Kaeppler H., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*. 43 179-188.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. (2011). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA. Argentina, pp.648.
- Liu X. Yang G. (2012) Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 48: 172-179.
- López J. (1968) Ensayos científicos escritos en homenaje a Tomás Romay: Eugenio Espejo, propulsor de la medicina en Ecuador Colonial (1747-1795), Academia de ciencias de Cuba 143- 154.
- Madsen J. (2002) Historia cultural de la cascarilla de Loja En: Aguirre Z, Madsen J, Cottas E, Balslev H (eds) Botánica Austroecuatoriana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Ediciones AbyaYala. Quito, pp. 385-399.
- Maraschin S., Sugui J., Wood K., Bonham C., Buchi D., Cantao M., Carobrez S., Araujo P., Peixoto M., Verpoorte R., Fontana J. (2002) Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. *Brazilian Journal of medical and Biological Research* 35: 633-643.
- McCalley D (2002) Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatography A* 967(1): 1-19.
- Mendoza H., Ramírez B., Jiménez L. (2004) Rubiaceae de Colombia, Guía ilustrada de géneros. Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá, 351 pp.

- Murch S., Krishnaraj S., Saxena P. (2000) Phytomaceuticals mass producction, standardization and conservation. En Sujatha G., Ranjitha B. Effect of phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulagris* L. Acta Physiol Plant. 29: 189-195.
- Nieto M. (2000) Remedios para el imperio: Historia natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH, Bogotá, 280 pp.
- OMS (2015) Paludismo, Nota descriptiva N° 94
- Pappa F. (2004) Cultivo de la Quina. Ancafé, 11 pp.
- Parr A. Robins R., Rhodes M. (1984) Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulpoxide effects on alkaloids release and long-term membrana integrity. *Plant Cell Reports*. 3: 261-265.
- Paunescu A. (2009). Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. Romanian Biotechnological Letters. Vol 14: 4095-4103.
- Prieto H., Jordan M., Barrueto P., Cordeiro M., Durzan D. (2005) Biotecnología Vegetal. Santiago de Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, 206 pp.
- Ramos-Valdivia A., Van Der Heijden R., Verpoorte R. (1997) Elicitor–Mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. *Planta*. 203:155-161.
- Ravishakara M., Shrivastava N., Padh H., Rajani M. (2001) HPTLC method for the estimation of alkaloids of *Cinchona officinalis* stem bark its marketed formulations. *Planta Med* 67:294-296.
- Razdan M. (2005) Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, Inc. USA, 376 pp.
- Reed B., Gupta S., Uchendu E. (2013) Chapter 5: *In vitro* genebanks for preserving tropical biodiversity. In Normah M., Chin H., Reed B. (Eds.) Conservation of tropical plant species.

- Reed B., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V. (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 47:1-4.
- Rentería J. (2002) Ecología y manejo de la cascarilla (*Cinchona pubescens* Vahl), en Santa Cruz, Galápagos (Tesis de pregrado-Ingeniería Forestal), Universidad Nacional de Loja, Loja, 102 pp.
- Robins R. (1994) Secondary products from cultured cell and organs: I. Molecular and cellular approaches. En Dixon R., Gonzáles R. *Plant Cell culture*. The practical approach series. (pp. 169-198). The Practical Approach Series, United States.
- Romero-Saritama JM. (2015) Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (RUBIACEAE) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencia Biológicas*. Vol. 16 (2): 27-35.
- Schmauder H, Groger D, Koblitz H, Koblitz D. (1985) Shikimate pathway activity in shake and fermenter cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 4 (5):233-236.
- Schripsema J., Ramos-Valdivia A., Verpoorte R. (1999) Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry* 51:55-60.
- Sen-Rong H., Ming-Hua Y. (2012) A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:287-296.
- Shibuya H., Kitamura Ch., Maehara S., Nagahata M., Winarno H., Simanjuntak P., Kim HS., Wataya Y., Ohashi K. (2003) Transformation of *Cinchona* alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. Isolated from *Cinchona pubescens*. *Chem. Pharm. Bull.* 51(1)71-74.
- Sierra R. (1999) Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN-GEF-BIRF y EcoCiencia. Quito- Ecuador, 174 pp.

- Staba J, Chung A (1981) Quinine and quinidine production by *Cinchona* leaf, root and unorganized cultures. *Phytochemistry* Vol. 20(11):2495-2498.
- Stevens L., Giroud C., Pennings J., Verpoorte R. (1993) Purification and characterization of strictosidine synthase from a suspension culture of *Cinchona robusta*. *Phytochemistry* Vol. 33(1):99-106
- Tapia-Armijos MF, Homeier J, Espinosa CI, Leuschner C, de la Cruz M. (2015) Deforestation and Forest Fragmentation in South Ecuador since the 1970s – Losing a Hotspot of Biodiversity. *PLoS ONE* 10(9): e0133701. DOI:10.1371/journal.pone.0133701
- Taylor, L. (2005) *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*, Square One Publishers, 519 pp.
- Thomas A (1946) *Cinchona* en Uganda. *Empire J Exp Agric* 14:75-84.
- Ulloa C., Jorgensen P. (1995) *Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador*, Ediciones Abya-Yala, Quito, 329 pp.
- Valencia R., Pitman N., León-Yáñez S. and Jorgensen P. (2000) *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador 2000*. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 489 pp.
- van der Kooy F., Sullivan S. (2013) The complexity of medicinal plants: The traditional *Artemisia annua* formulation, current status and future perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* 150:1-13.
- Walton N., Parr A., Robins R., Rhodes M. (1987) Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports* 6: 118-121.
- Warhurst D, Craing J, Adagu I, Meyer D, Lee S. (2003) The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the *Cinchona* alkaloids. *Malaria Journal* 2:26.

- Wijnsma R., Go J., Van Weerden I., Harkes P., Verpoorte R., Svendsen B. (1985) Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona* Spec. *Plant Cell Reports*. 4:241-244.
- Ying-Shan H., van der Heijden R., Verpoorte R. (2002) Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona* Robusta by biosynthetic precursor and inhibitors. *Biotechnology Letters* 24:705-710
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. En Dávila M., Castillo M. Laurentin H. Uso de Marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en Agave. *Rev. Fac. Agron.* 33: 93-111.

OBJETIVOS

Cinchona officinalis al ser una especie representativa de la provincia de Loja y al formar parte de un ecosistema frágil como el bosque de montaña es necesaria la aplicación de medidas de manejo y conservación que garanticen la permanencia de la especie en el lugar de origen.

Objetivo general:

Establecer alternativas para la conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo.

Objetivos específicos:

1. Analizar del proceso de germinación y proliferación *in vitro* de *Cinchona officinalis*, L (Rubiaceae).

En condiciones naturales se ha observado la baja capacidad generativa y regenerativa de la especie, presentando una baja densidad poblacional. Por lo tanto es necesario determinar qué factores pueden estimular la germinación de las semillas y evaluar la posibilidad de su propagación bajo condiciones *in vitro*.

2. Evaluar la estabilidad genética en explantes cultivados *in vitro* de *Cinchona officinalis*, mediante marcadores ISSR.

A pesar de las ventajas que ofrece el cultivo *in vitro*, pueden generar estrés a los tejidos provocando cambios a nivel genético o epigenético. Por lo tanto, es necesario analizar la influencia del proceso de regeneración y de los subcultivos sobre la estabilidad genética a través del uso de marcadores moleculares tales como los ISSR.

3. Establecer protocolos de conservación *in vitro* de *Cinchona officinalis*: crecimiento limitado y criopreservación de segmentos nodales y yemas.

La aplicación de distintas herramientas de conservación *ex situ* se hacen necesarias cuando las especies presentan algún grado de amenaza en su hábitat. La conservación con limitación del crecimiento y criopreservación usando el cultivo *in vitro* de tejidos, permite mantener en un reducido espacio y con menos recursos, material vegetal viable y con diversidad genética. Por ende se analizarán protocolos de conservación con la

Objetivos

modificación de los componentes del medio y a la adición de agentes osmóticos; y los procesos de crioprotección previo a la crioconservación de tejidos.

METODOLOGÍA GENERAL

El presente estudio se desarrolló en los laboratorios del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja. Para iniciar cada uno de los ensayos se recolectó materia vegetal de *Cinchona officinalis* en el sector Aguarango de la parroquia San Pedro de Vilcabamba- Loja, ésta zona es área de amortiguamiento del Parque Nacional Podocarpus.

Para el objetivo del capítulo 1 de análisis del proceso de germinación y proliferación *in vitro* de *C. officinalis*. Para analizar el factor que influye sobre la germinación, se partió de semillas de *C. officinalis* y *C. pubescens*, éstas últimas como un control. Se cuantificaron los fenoles totales con el método de *Folin-Ciocalteu* (Jordán 1975) y la germinación de semillas sin embeber y de semillas embebidas durante 24 horas de ambas especies.

A partir segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro*, se indujo la multiplicación de brotes, formación de callo y regeneración de brotes indirectos. Para esto se utilizó el medio B5, (Gamborg 1968) usado en especies de *Cinchona* (Parr et-al 1984; Wijnsma et-al, 1985; Khouri et-al, 1986; Allan & Scragg 1986; Walton et-al 1987; Giround et-al, 1989) + 2% de sacarosa y solidificado con agar al 0.07%. Para la inducción de proliferación y formación de callos y regeneración indirecta se tomaron segmentos nodales y fueron cultivados en medio B5 más diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

Para el objetivo del capítulo 2 sobre la determinación del grado de variación somaclonal (Larkin & Scowcroft 1981; Jain et al. 1998; Olhof & Phillips 1999; Maraschin et al. 2002) en diferentes etapas del cultivo. Como parte inicial se determinó periódicamente en los diferentes subcultivos, el índice de multiplicación de los explantes en cada una de las combinaciones de reguladores de crecimiento usadas en el capítulo anterior.

De material vegetal procedente de tres subcultivos de las diferentes combinaciones para inducir a proliferación y formación de callo con regeneración más el tratamiento control se tomaron muestras de las cuales se extrajo el ADN. Las muestras colectadas fueron congeladas a -80° C hasta obtener todas las muestras y hacer el análisis con marcadores universales UBC de ISSR. En este análisis se determinó el grado de variación genética en

los subcultivos con relación a la planta madre (explanto de partida) y entre los dos tipos de cultivos.

Finalmente para el objetivo del capítulo 3 se establecieron protocolos de conservación limitando el crecimiento y crioconservación de explantos. Para el almacenamiento limitando el crecimiento se evaluó la influencia de dos medios de cultivo el medio MS (1962) y el B5 (1986) en diferentes concentraciones de sus componentes; así también se evaluó el efecto osmótico del manitol, sorbitol y sacarosa en tres distintas concentraciones sobre el crecimiento, multiplicación y sobrevivencia de los explantes mantenidos durante un año sin subcultivos.

Para la crioconservación se partió de yemas que pasaron por un proceso de encapsulación–deshidratación y por vitrificación previo al congelamiento en nitrógeno líquido (Mari et al. 1995; Engelmann 2004; Sant et al. 2008). Finalizada esta fase se procedió a recuperar los explantes, evaluando la viabilidad a través del crecimiento y el porcentaje de mortalidad de los explantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan E.J, Scragg A.H. (1986) Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 litre air-lift bioreactors. *Biotechnology letters*. 8(9):635-638.
- Engelmann F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro*. En González M., Panta A., Roca W., Escobar R., Engelmann F. Development and large shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tiss Organ*. 92: 1-13.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Giroud C., Van Der Leer T., Van Der Heijden R., Vepoorte R., Heeremans C., Niessen W., Van Der Greef J. (1989) Thermospray liquid chromatography/ mass spectrometry (TPS LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures. *Plant Med*. 57:142-148.

- Jain S., De Klerk G. (1998) Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. En Prieto H. Jordan M., Barrueto P., Cordeiro M., Durzan D. (Eds.) *Biotechnología Vegetal*. Santiago de Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp. 88-92.
- Jordán M. (1975) Histologische und physiologische Untersuchungen zur Kapazität der Androgenese bei in vitro kultivierten Prunus-, Pyrus-, Ribes- und Nicotiana Antheren. Inaugural-Dissertation, Justus Liebig-Universität, Gießen, 113 pp.
- Khoury H., Ibrahim R. Rideau M. (1986) Effects of nutritional and hormonal factor on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 5: 423-426.
- Larkin P., Scowcroft W. (1981) Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. En Kaeppler S., Kaeppler H., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*. 43 179-188.
- Maraschin S., Sugui J., Wood K., Bonham C., Buchi D., Cantao M., Carobrez S., Araujo P., Peixoto M., Verpoorte R., Fontana J. (2002) Somaclonal variation: A morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:633-643.
- Mari S., Engelmann F., Chbrillange., Huet C., Michaux-Ferriere N. (1995) Histocytological study of coffee (*Coffea racemosa* and *S. sessiflora*) *In vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation dehydration technique. *Cryo-Lett* 16: 289-298.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Olhof P., Phillips R. (1999) Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. En Kaeppler S., Kaeppler H., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*. 43 179-188.

- Sant R., Panis B., Taylor M., Tyagi A. (2008) Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* Var. Esculenta) accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 92: 107-111.
- Walton N., Parr A., Robins R., Rhodes M. (1987) Toxic of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports*, 6: 118-121.
- Wijnsma R., Go J., Van Weerden I., Harkes P., Verpoorte R., Svendsen B. (1985) Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona* Spec. *Plant Cell Reports*. 4: 241-244.

CAPITULO 1

***In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae)**

Rosa Armijos González ¹, César Pérez Ruiz ²

¹Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja, CP: 11-01-608, Loja, Ecuador.

²Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal, E.T.S Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

Manuscrito aceptado en:

Journal Forestry Research

Abstract

Cinchona officinalis is a forest product and endemic species of the Loja Valley in the southern region of Ecuador. Because of over-exploitation in the nineteenth century and current modification of its ecosystem, *C. officinalis* populations are threatened. Currently the natural regeneration of the populations is low, despite the fact that its plant regeneration capacity and seed formation are high. An efficient protocol for germination, shoot proliferation and plantlets regeneration was developed for this species. Phenolic compounds content and germination rate of *C. officinalis* seeds were compared with a control species, *C. pubescens*. Nodal segments from seedlings of *C. officinalis* were cultured on Gamborg (1968) medium supplemented with different combinations of plant growth regulators. Results suggest that the phenols compounds content is high in *C. officinalis* and should be removed with hydrogen peroxide or water washes to stimulate germination. Shoots and callus developed in a period of 45 days in nodal segments in most of plant growth regulators combinations tested. The highest shoot proliferation, callus formation and adventitious bud presence rates were obtained in medium supplemented with 5.0 mg l⁻¹ 6-benzyl-aminopurine and 3.0 mg l⁻¹ indole-3-butyric acid.

Keywords *Cinchona officinalis*; phenols; germination; shoot; callus.

Introduction

Cascarilla, *Cinchona officinalis* L., is an endemic species from the Loja valley of Ecuador (Andersson 1998; Garmendia 2005) and a forest product that has been extremely useful for mankind (Acosta 1989). The species has enabled the development of effective treatments for the cure and prevention of malaria caused by different species of *Plasmodium* (Ulloa and Jorgensen 1995; McCalley 2002; Warhurst et al. 2003). *Cinchona officinalis* trees from Loja became quickly scarce. The species was highly exploited in the Cajanuma knot and Uritusinga, essentially in order to obtain the bark from which the active principle quinine can be extracted, thus causing massive deforestation in the Loja province. The demand for the bark decreased in the twentieth century since quinine was obtained by chemical synthesis, reducing the pressure on wild plant populations. However, nowadays human activities such as farming, ranching, and logging are causing an alarming destruction of the

mountain forest, which seems to be even more severe than bark harvesting (Madsen 2002). The small remaining populations in the cloud forest are distributed in patches, accompanied by specific vegetation (Acosta 1947). Several studies on the species denote specific conditions and limited distribution ranges, indicating a high susceptibility to deforestation and to the influence of human activities. Nevertheless, the trees of *Cinchona* were observed to have a high capacity of regrowth in natural conditions (Acosta 1947), but now there is a low percentage of observed regeneration, suggesting low genetic diversity and reduction in reproductive success (Espinosa and Rios 2014). In contrast to the low regeneration there is high production of winged seeds. These seeds are easily transport by the wind, but they are unable to germinate because of their specific growth and germination requirements (Acosta 1947; Garmendia 2005).

Several techniques have been used for the propagation of genus *Cinchona* and for enhancement of alkaloid production, including culture *in vitro*. These studies were mainly focused on the production of quinoline alkaloids, but a few were aimed at the propagation and recovery of natural populations of *Cinchona* (Hay et al. 1986; Khouri et al. 1986; Giroud et al. 1989; Hoekstra et al. 1990; Giroud et al. 1991; Blom et al. 1992; Stevens et al. 1993; Ramos-Valdivia et al. 1997; Geerlings et al. 1999). A preliminary study was carried out to assess seed germination. During the imbibition of *C. officinalis* a water staining caused by the elimination of compounds was observed. This suggested the likely presence of phenolic compounds in the complete seeds. We assume that the dormancy already mentioned by several authors in *C. josephiana* (Thomas 1946) and in *C. ledgeriana* (Barton 1947) might be caused by the presence of phenolic compounds. According to Thomas (1946) *Cinchona* seeds need light to stimulate germination. While hydrogen peroxide can increase activity in the embryo (Verkhoturov and Frantenko 2006; Lu et al. 2013) and stimulate the oxidation process during germination (Bailly et al. 2008). Therefore this study evaluated the influence of photoperiod and hydrogen peroxide treatments on the germination rate of *C. officinalis*. We also assessed the effect of various plant growth regulators (PGRs) on the propagation process. This will allow massive propagation of *C. officinalis* as a prerequisite for its reintroduction into its native environment.

Materials and methods

Measurement of phenolic compounds

The amount of phenols in complete seeds and germination percentage of *C. officinalis* was determined before and after imbibition. A parallel process was carried out in *C. pubescens* as a biological control. This species has not shown any problems in germinating and regenerating and therefore was selected as control for the experiment. Total phenols were determined by Folin-Ciocalteu method (Jordán 1975) using tannic acid like standard (Rosales and González 2003). The values are represented in ppm, with absorbance measured at 730 nm.

In vitro germination

To assess the germination of *C. officinalis*, the species was compared with *C. pubescens* as a biological control. The seeds of *C. officinalis* were obtained from the Cajanuma knot in the province of Loja and seeds of *C. pubescens* were obtained from Santa Cruz Island-Galápagos. The seeds were surface-sterilized in soapy water for five min, followed by immersion in 70% alcohol for 30 sec, and submersion in 1% (v/v) sodium hypochlorite solution for 10 min. Three rinses in sterile distilled water were done after each step. The seeds of both species were imbibed for 24 h and separated into two different treatment groups before being placed in culture medium. The first group of seeds was immersed in hydrogen peroxide 100 % (10 Vol) for 1 min and the other group of seeds was sown directly into the MS culture medium. MS medium was supplemented with sucrose (20 g l⁻¹) and solidified with agar (7 g l⁻¹), and the pH was adjusted to 5.8 prior to autoclaving. Seeds were incubated at 22.0 °C in 12 h and 24 h photoperiods with a photon flux density of 57 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which was provided by cool white fluorescent lamps.

Shoot proliferation

Nodal segments (approximately 1.0-1.5 cm) from 4-month-old seedlings were placed vertically on B5 medium supplemented with sucrose (20 g l⁻¹) and solidified with agar (7 g l⁻¹). The pH was adjusted to 5.8 prior to autoclaving. The explants were cultured in B5 medium without plant growth regulators (PGRs), as a control, or supplemented with 0.5,

1.0, 5.0 mg l⁻¹ of 6-benzyl-aminopurine (BAP) or 0.2 mg l⁻¹ of kinetin (KIN) in combination with 0.1 mg l⁻¹ of α -naphthaleneacetic acid (NAA), 3.0 mg l⁻¹ of indole-3-butyric acid (IBA), or 1.0, 2.0 mg l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Cultures were maintained under a photoperiod of 12 h light with a photon flux density of 57 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Light was provided by cool white fluorescent lamps.

Histological analysis

To determine the origin of the regenerated shoots, several tissue samples were used for histological analysis. The samples were fixed in FAA (40% formaldehyde, 50% ethanol, 100% glacial acetic acid) for 24 h. Samples were dehydrated in gradient alcohol (25, 50, 70, and 95%) for 30 min and 100% alcohol for 2, 3 and 12 h. The clarification process was performed in two steps: first in ethanol-xilol (1:1) for 3 h followed by xilol for 45 min, 2 and 4 h. After each exposure period the xilol was changed. The embedding was performed for 24 h in xilol-paraffin (1:1), maintained at 58.0 °C, then in 100% paraffin sectioned at 10 μm thickness and stained with hematoxylin and eosin. Finally, the samples were placed on slides and were sealed with histofluid mounting medium-Marienfeld and observed under a microscope (Labomed Lx 400).

Data collection and statistical analysis

The concentration of total phenols of the complete seeds and the percentage value of germination (on petri dishes with wetted paper) for both species were assessed after 15 days. Overall, 300 seeds were used for each species, distributed in three replicate groups of 100 seeds. The percentage value of germination was evaluated after 25 days. Overall, 600 seeds were used from each species, distributed in three replicate groups of 50 seeds per each treatment or combination. The percentages values of shoots/explant, callus induction, adventitious shoots from callus, and the color and structure of callus were assessed after 45 days. This experiment was repeated three times with 25 explants for each combination. Germination and shoot proliferation data are presented as the mean $\pm$ SE and data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Significant differences between means were assessed with Duncan's test with $P \leq 0.05$, using language R (R Development Core Team 2013).

Results and discussion

Effect of phenolic compounds on germination

Based on preliminary studies, we proceeded to verify the presence of phenolic compounds and its influence on the germination of two species of *Cinchona* genus. In *C. pubescens* phenol concentration was low in both embedded and unembedded seeds, and the germination percentage was similar in both cases, whereas phenol concentration in *C. officinalis* was different. In unembedded seeds the phenol concentration was higher than embedded seeds corresponding with low germination rates; nevertheless, after 24 h of imbibition, seeds showed a low concentration of phenol. Removal of phenols in water greatly influenced the germination percentage in *C. officinalis*, increasing the rate approximately 9-fold (Table 1).

Table 1. Effect of imbibition on phenol extraction and germination in *C. pubescens* and *C. officinalis* seeds

Species	Imbibition period (hours)	Phenols concentration p.p.m.	Percentage of germination (mean $\pm$ SE)
<i>C. pubescens</i>	0	0.5	53.5 $\pm$ 3
	24	0.3	56.6 $\pm$ 3
<i>C. officinalis</i>	0	2.6	2.8 $\pm$ 6
	24	0.4	25.0 $\pm$ 2

Seed production of *Cinchona* is high and occurs constantly during the year in most species of this genus. However, germination and seedling survival of *C. officinalis* is low in natural conditions. One of the causes for this low survival is the need for specific conditions for germination and growth in the natural habitat. But it has also been observed under laboratory conditions that a seed-intrinsic factor is the presence of phenols. These substances act in many species of the family Rubiaceae as germination inhibitors. The presence of phenols in *C. pubescens* was low, and this species has no difficulty germinating. This has been observed in its regenerative capacity in natural conditions, *e.g.*, it is an invasive species in the Galapagos Islands. Moreover, is evident that *C. officinalis* has a higher total phenols content than *C. pubescens*, which is directly related to the low percentage of germination.

In vitro germination

To promote seed germination of *C. pubescens* and *C. officinalis* two factors – hydrogen peroxide and the impact of photoperiod – were evaluated (Table 2). Hydrogen peroxide in *C. pubescens* caused damage to the seed coat and embryos. Exposure of 24 hours photoperiod resulted in higher germination percentages in this species. However, the highest percentage (90%) was achieved without peroxide hydroxide exposure. In the case of *C. officinalis*, the results were opposite. There was a markedly high germination rate under exposure to hydrogen peroxide (72.2 and 86.7%). But exposure to two light periods had no significant effect on seed germination.

Table 2. Effect of H₂O₂ and photoperiod on germination of *C. pubescens* and *C. officinalis*.

Species	Time of immersion in H ₂ O ₂	Photoperiod (hours)	Percentage of germination (mean ± SE)
<i>C. pubescens</i>	0	12	56.6 ± 28 acd
	0	24	90 ± 9.1 a
	1 min	12	35.6 ± 8 bc
	1 min	24	62.2 ± 33 acd
<i>C. officinalis</i>	0	12	10 ± 16 b
	0	24	28.9 ± 10 bd
	1 min	12	72.2 ± 36 ac
	1 min	24	86.7 ± 21 a
Significance of three-way ANOVA			
Species			.
H ₂ O ₂			*
Photoperiod			**
Species * H ₂ O ₂			***
Species * Photoperiod			NS
H ₂ O ₂ * Photoperiod			NS
Species * H ₂ O ₂ * Photoperiod			NS

Notes: Mean ± SE, followed by different letters are significantly different at 5% level according to Duncan's test. Interaction was done using three-way ANOVA. ***Significant at P<0.0001; **significant at P<0.001; *significant at P<0.05; significant at P<0.1; NS non-significant.

The results showed that in the case of *C. pubescens*, the germination rate was higher under 24 h of photoperiod exposure, whereas the hydrogen peroxide treatment did not have a significant influence on it. Similar observations in *C. pubescens* were reported by Rentería (2002), who showed that direct light exposure was required for the germination of small seeds which are characterized by a low nutrient content.

According to Ellis et al. (1985) the seeds of *Cinchona* are usually non-endospermic, very small and show dormancy. Some studies on seed viability showed a low percentage of germination such as Díaz and Loján (2004) that reported a 27% of germination rate of *C. officinalis* in 34 days, whereas Koblitz et al. (1983a) obtained germination percentages of 5.8 and 15% with *C. succirubra* and *C. ledgeriana*, respectively.

When submitting the seeds of *C. officinalis* to imbibition and washing with water, the phenol content decreased and increased the percentage of germination. Exposure to light did not have a significant effect on germination for this species (Table 2). In small seeds such as *C. officinalis*, to phenol removal is simple with the application of several washes or hydrogen peroxide. Imbibition and hydrogen peroxide washing of *C. officinalis* seeds increased germination considerably. The effect of this substance on the elimination of phenols to facilitate germination is known in other species (Baker et al. 2005). Hydrogen peroxide is a breaker of seed dormancy or stimulator of germination, due it increases the activity in the embryo (Verkhoturov and Frantenko 2006; Lu et al. 2013) and stimulates the oxidation process during germination (Bailly et al. 2008) in several species such as *Hordeum vulgare* (Verkhoturov and Frantenko 2008) and *Amaranthus retroflexus* (Xuanyu et al. 2011).

Shoot proliferation

In order to increase the shoot proliferation rate, nodal segments with axillary buds were excised from seedlings and cultured in B5 medium supplemented with various combinations of cytokinins (BAP, KIN) and auxins (NAA, IBA, 2,4-D). In all cases, the first response was observed after 10 days. The formation of different types of structures depended on both concentration and type of hormones (Table 3; Fig. 1-2) on B5 medium. The role of hormones in such morphogenic responses are known in other species of

Cinchona, with the objective of inducing the production of metabolites through cell cultures upkeep (Staba and Chung 1981; Koblitz et al 1983a; 1983b; Hay et al. 1986; Khouri et al. 1986; Giroud et al. 1989; Hoekstra et al. 1990; Giroud et al. 1991; Blom et al. 1992; Stevens et al. 1993; Ramos-Valdivia et al. 1997; Geerlings et al. 1999).

Table 3. Effect of different combinations of cytokinins with auxins supplemented to B5 medium on shoot proliferation, callus formation and regeneration of adventitious shoots of *C. officinalis*.

Combination of PGRs (mg l ⁻¹)		Shoots/explant	Callus induction (%)	Adventitious shoots (#)	Predominant response	Color and structure of callus
0	0 (control)	4.8 ± 0.4 a	3.8 ± 1.3 e	0b	Shoots	Green
0.5 BAP	0.1 NAA	4.3 ± 0.2 a,b	20.1 ± 2.4 d,e	0b	Shoots	Green-friable
1.0 BAP	0.1 NAA	3.1 ± 0.3 a,b,c	31.4 ± 2.8 d	0b	Shoots	Green-compact
5.0 BAP	3.0 IBA	5.3 ± 0.4 a	73.6 ± 2.9 b,c	15 ± 0.5 a	Shoots/Adv. shoots	Green-friable
0.2 KIN	1.0 2,4-D	1.6 ± 0.2 c	100 ± 2.5 a	0b	Callus/roots	White-red-friable
1.0 BAP	2.0 2,4-D	0.9 ± 0.1 c	68.2 ± 2.9 c	0b	Callus/roots	White-spongy
5.0 BAP	1.0 2,4-D	2.4 ± 0.2 b,c	90.8 ± 3.5 a,b	0b	Callus/ roots	Green-brown-compact

Average numbers of explants per treatment ± SE, followed by different letters are significantly different at 5% level using Duncan's test.

The highest proliferation rate (5.3 shoots/explant) at 45 days was obtained with BAP (5.0 mg l⁻¹) in combination with IBA (3.0 mg l⁻¹). These shoots originated from axillary buds. The effect of BAP for improving bud formation has been evaluated alone or in combination with auxin in *Cinchona* (Staba and Chung 1981; Koblitz et al. 1983a; Hoekstra et al. 1990; Giroud et al. 1991) and other medicinal plants with positive results (Siddique and Anis 2007). After 10 weeks, this combination also stimulated callus formation and from this the regeneration of adventitious shoots (15 shoots/callus) and also more efficient in the formation of friable callus with indirect caulogenesis (Fig. 1d; 2C-D). The same combination was used by Staba and Chung (1981) to induce the production of alkaloids in disorganized cultures and organ cultures of *Cinchona*. However, our study was characterized by rapid growth of shoot and roots.

Next the callus phase was observed as small green globular structures (Fig.2D) accompanied by vascular tissue (Fig. 2C) that culminated in the formation of shoots. Similar response was observed by Hoekstra et al. (1990) in *C. ledgeriana*. Green compact globular structures were formed from a fine cell suspension culture, characterized by the presence of moderately differentiated cells. Nevertheless, the structures were formed by using a 2,4-D and KIN combination. The combination of IBA with BAP in many other species allows callus formation, similar response was observed in *Tylophora indica* where high percentage of callus and shoot regeneration in combinations obtained BAP-IBA (Sharma et al. 2014), *Hydrangea macrophylla* did something similar but with a lower percentage of sprouting (Liu et al. 2011) and also observed in *Viburnum dentatum*, where the frequency of shoot regeneration was influenced by the presence of IBA (Dai et al. 2011).

Fig. 1. *In vitro* propagation of *Cinchona officinalis* in B5 medium with different combinations of PGRs; **a.** Differentiation of pre-existing axillary buds on control B5 medium. Formation of callus at the base of explants and shoots from preexisting axillary buds; **b.** on B5 medium + 0.5 mg l⁻¹ BAP with 0.1 mg l⁻¹ NAA and **c.** B5 medium + 1.0 mg l⁻¹ BAP with 0.1 mg l⁻¹ NAA; **d.** Differentiation of pre-existing axillary buds, formation of callus and compact globular structures on B5 medium + 5.0 mg l⁻¹ BAP with 3.0 mg l⁻¹ IBA. **e.** Formation of callus and roots regeneration on B5 medium + 0.2 mg l⁻¹ KIN with 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D; **f.**

Formation of friable and reddish callus and roots regeneration on B5 medium + 1.0 mg l⁻¹ BAP with 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D; g. Formation of small and compact callus on B5 medium + 5.0 mg l⁻¹ BAP with 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D.

Shoot formation (4.3 shoots/explant) also was observed in 0.5 mg l⁻¹ BAP and 0.1 mg l⁻¹ NAA. In the control group (4.8 shoots/explant), sprouting could be due to breakage of apical dominance and to the presence of young tissue (Fig. 2a), whereas in the treatment group it was due to the presence of BAP, which facilitated axillary bud initiation. Moreover the combination of KIN and 2,4-D has been widely used in the culture of *Cinchona* to obtain secondary metabolites from callus and suspension cultures (Koblitz et al. 1983b; Schmauder et al. 1985; Wijnsma et al. 1985; Hay et al. 1986; 1987; Hoekstra et al. 1990; Blom et al. 1992; Ramos-Valdivia et al. 1997).

Fig. 2 Histological analyses of *in vitro* regenerated tissues of *Cinchona officinalis* at 45 days (Bar = 10 μm); **A** Longitudinal section of several shoot from pre-existing axillary buds (AX) on control B5 medium. **B** i.e Formation of callus on B5 medium + 1.0 mg l⁻¹ BAP with 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D, presence of parenchyma cells (PC) and disintegration of epidermis (EP). **C** Differentiation of vascular bundle (VE). **D** Active cell division

and forming globular structures or meristemoid (ME), presence of parenchyma cell (PC) and complete disintegration of the epidermis (EP). **E** Developed of druses. Apical bud (AP); Tissue vascular (TV)

The first callus tissue formation in the rest of the treatments was visible at 20 days of culture, starting in the base of the explants, and it spread out to the rest of the tissue at 45 days. The highest rate of callus formation (100%) was obtained with the combination 0.2 mg l⁻¹ KIN with 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D. In the combination with BAP and 2,4-D, high percentages of callus formation were also obtained. The lowest percentage of callus formation was in the presence of BAP with NAA. All calluses formed were translucent, whitish, and spongy appearance some of them were friable, but not all were morphogenic (Fig. 1e,f-2b). These calluses originated in meristematic areas subsequently formed adventitious roots but shoot formation was not observed.

The histological analysis showed that morphological changes occurred in different tissues between the sixth and tenth week. In the control treatment sprouting from pre-existing axillary buds without tissue dedifferentiation neither epidermis disintegration was observed (Fig. 2A). Tissues forming callus have either low or null morphogenic capacity. These tissues are undifferentiated, with a high number of parenchyma cells and epidermis disintegration (Fig. 2B). While most friable callus are characterized by the presence of cell clusters or meristemoids around these parenchymal cells (Fig. 2C). Vascular bundles were formed from these meristemoides (Fig. 2D). Finally, in few tissues drusen formation (group of crystals) (Fig. 2 E) occurred occasionally.

Additionally in our previous studies, using MS medium, signs of hyperhydricity, as translucent tissue, were observed in *C. officinalis*. Many studies for *Cinchona in vitro* culture reported the use of B5 medium (Koblitz et al. 1983b; Wijnsma et al. 1985; Allan and Scragg 1986; Khouri et al. 1986; Walton et al. 1987; Giroud et al. 1991; Geerlings et al. 1999). Although these studies give no explanation for the use of B5 medium, this has a lower mineral content than MS medium (Han et al. 2002). It is known that one of the factors that promote hyperhydricity is the presence of a high content of salts in the culture medium. Several attempts to reduce the hyperhydricity in different species have been made

by modifying medium composition and culture conditions (Ivanova and Van Staden 2009). Therefore, in this work to improve the health of the tissue, B5 medium was used.

In conclusion, we report that *Cinchona officinalis* germination is improved by the application of exogenous hydrogen peroxide in the seeds. For a direct shoot proliferation, nodal segments can be cultured in B5 medium supplemented with 5.0 mg l⁻¹ BAP in combination with 3.0 mg l⁻¹ IBA. The same combination can also be used for regeneration of indirect shoots. Due to the ability of *C. officinalis* tissue to regrow, the culture of nodal segments on a hormone-free medium might be another alternative for shoot proliferation. We highly recommend the culture on a hormone-free medium to get plants with a low degree of somaclonal variation. The obtained results improve the propagation of *Cinchona*, giving a good possibility for efficient repopulation of this species with genetically diverse germplasm starting from seed germination, in order to counteract the problems of reproduction and loss of genetic diversity.

Acknowledgements This study was part of the project “PROY_IECOLOGIA_ 0036” financed by the third internal call for projects of the Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). We also appreciate the support provided by Augusta Cueva, Pablo Ramón, Chris Brinegar and Máximo Moreira.

References

- Acosta M (1947) Cinchonas del Ecuador. Publicaciones científicas Mas, Quito, p 271
- Acosta M (1989) La *Cinchona* o Quina Planta Nacional del Ecuador. Rev Acad Colomb Cien 17 (65):305-311
- Allan EJ, Scragg AH (1986) Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 liter air-lift bioreactors. Biotechnology Letters 8(9):635-638
- Andersson L (1998) A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). Memories of the New York Botanical Garden 81:1–75

- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C.R Biologies* 331:806-814
- Baker K, Steadman K, Plummer J, Dixon K (2005) Seed dormancy and germination responses of nine Australian fire ephemerals. *Plant and Soil* 277(1-2):345-358
- Barton L (1947) Effect of different storage conditions on the germination of seeds of *Cinchona ledgeriana* Moens. *Contrib Boyce Thompson Inst* 15:1-10
- Blom T, Kreis W, van Iren F, Libbenga K (1992) A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* 11(3):146-149
- Dai W, Su Y, Castillo C (2011) Plant regeneration from in vitro leaf tissues of *Viburnum dentatum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104 (2):257-262
- Díaz M, Loján M (2004) Fenología y propagación en vivero de especies forestales nativas del bosque protector "El Bosque". Disertación (Ingeniero Forestal), Universidad Nacional de Loja, Loja, p 119
- Ellis R, Hong T, Roberts E (1985) Handbook of seed technology for genebanks. 2 Vols. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, p 715
- Espinosa C, Ríos G (2014) Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* *in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de medicina y Ciencias biológicas* Vol. 35 (1 y 2):73-82
- Gamborg O, Miller R, Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158
- Garmendia A (2005) El Árbol de la Quina (*Cinchona spp.*): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, 204 pp.
- Geerlings A, Hallard D, Martinez A, Lopes I, van der Heijden R, Verpoorte R (1999) Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* "Ledgeriana" hairy root culture

- containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 19:191-196
- Giroud C, van der Leer T, van der Heijden R, Verpoorte R, Heeremans C, Niessen W, van der Greef J (1991) Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures. Planta Med 57 (2):142-148
- Han Y-S, van der Heijden R, Verpoorte R (2002) Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. Biotechnology Letters 24(9):705-710
- Hay C, Anderson L, Phillipson J, Curless D, Brown T (1987) In vitro culture of Cinchona species. Part II Time-course studies on the uptake of radio-labelled alkaloid precursors and alkaloids by *C. ledgeriana* root suspension cultures. Plant Cell Reports 9(3):197-206
- Hay C, Anderson L, Phillipson J, Roberts M (1986) In vitro culture of Cinchona species. Precursor feeding of *C. ledgeriana* root suspension cultures with L-tryptophan. Plant Cell Reports 5(1):1-4
- Hoekstra S, Harkes P, Verpoorte R, Libbenga K (1990) Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. Plant Cell Reports 8(10):571-574
- Ivanova M, Van Staden J (2009) Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio influences shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured Aloe polyphylla. Plant Cell Tissue Organ Culture 99(2):167–174
- Jordán M (1975) Histologische und physiologische Untersuchungen zur Kapazität der Androgenese bei in vitro kultivierten Prunus-, Pyrus-, Ribes- und Nicotiana Antheren. Inaugural-Dissertation, Justus Liebig-Universität, Gießen, p 113

- Khouri H, Ibrahim R, Rideau M (1986) Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. Plant Cell Reports 5(6):423-426
- Koblitz H, Koblitz D, Schmauder H, Gröger D (1983a) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. Alkaloid production in cell suspension cultures. Plant Cell Reports 2(3):122-125
- Koblitz H, Koblitz D, Schmauder H, Gröger D (1983b) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. Plant Cell Reports 2(2):95-97
- Liu F, Huang L, Yang L, Reinhold P, Jongsma M, Wang C (2011) Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* 'Hyd1' and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:111-117
- Lu J, Li X, Yang Y, Jia L, You J, Wang W (2013) Effect of hydrogen peroxide on seedling growth and antioxidants in two wheat cultivars. Biologia Palntarum 57(3):487-494
- Madsen J (2002) Historia cultural de la cascarilla de Loja En: Aguirre Z, Madsen J, Cottas E, Balslev H (eds) Botánica Austroecuatorial: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Ediciones AbyaYala. Quito, pp 385-399
- McCalley D (2002) Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. Journal of Chromatography A 967(1): 1-19
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ramos-Valdivia A, van der Heijden R, Verpoorte R (1997) Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. Planta 203:155-161

- Rentería J (2002) Ecología y Manejo de la Cascarilla (*Cinchona pubescens* Vahl), en Santa Cruz, Galápagos, Disertación (Ingeniería Forestal), Universidad Nacional de Loja, Loja p 101
- Rosales M, González R (2003) Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques* 9(2):41-49
- Schmauder H, Groger D, Koblitz H, Koblitz D (1985) Shikimate pathway activity in shake and fermenter cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 4 (5):233-236
- Sharma M, Verma R, Singh A, Batra A (2014) Assessment of clonal fidelity of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill “in vitro” plantlets by ISSR molecular markers. *SpringerPlus* 3:400
- Siddique I, Anis M (2007) In vitro shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustifolia* (Vahl.): a medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(3):233-238
- Staba J, Chung A (1981) Quinine and quinidine production by *Cinchona* leaf, root and unorganized cultures. *Phytochemistry* Vol. 20(11):2495-2498
- Stevens L, Giround C, Pennings J, Verpoorte R (1993) Purification and characterization of strictosidine synthase from a suspension culture of *Cinchona robusta*. *Phytochemistry* Vol.33(1):99-106
- Thomas A (1946) *Cinchona* en Uganda. *Empire J Exp Agric* 14:75-84
- Ulloa C, Jorgensen P (1995) Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador, Ediciones Abya-Yala, Quito
- Verkhoturov V, Frantenko V (2008) Effect of hydrogen peroxide on anti- and prooxidant status of barley seeds during germination. *Russian Agricultural Sciences* 34(1):11-13
- Walton N, Parr A, Robins R, Rhodes M (1987) Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports* 6(2):118-121

- Warhurst D, Craing J, Adagu I, Meyer D, Lee S (2003) The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the *Cinchona* alkaloids. *Malaria Journal* 2:26
- Wijnsma R, Go J, van Weerden I, Harkes P, Verpoorte R, BaerheimSvendsen A (1985) Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona* spec. *Plant Cell Reports* 4(5):241-244
- Xuanyu L, Zhijun D, Hongyan Ch, Xinhua H, Songquan S (2011) Nitrite, sodium nitroprusside, potassium ferricyanide and hydrogen peroxide release dormancy of *Amaranthus retroflexus* seeds in a nitric oxide-dependent manner. *Plant Growth Regul* 64:155-161

Apéndices del capítulo 1

Apéndice 1. Proceso de extracción de fenoles según Jordán (1975) utilizado en la cuantificación de fenoles totales de las semillas.

1. De las especies de *C. officinalis* y *C. pubescens*, de tomaron 3 muestras de semillas sin embeber y semillas embebidas, cada muestra fue de 100 mg. A cada muestra se la añadió 5ml de etanol al 90%, ésta se mantuvo por 12 horas, para extraer los compuestos solubles e insolubles.
2. Luego de este periodo se filtró la muestra conteniendo el extracto líquido con fenoles. Para extraer totalmente el etanol se usó un evaporador c/vacío, evitando que suba más allá de 50°C.
3. Cada muestra que resultó se aforó hasta completar 1.5 ml con agua destilada.
4. En un recipiente se agregó a la muestra 0.5 ml del reactivo de *Folin* el cual se mantuvo en agitación por 3 min, exactamente, para permitir la digestión de los fenoles.
5. A la muestra anterior se agregó 1 ml de Na_2CO_3 (carbonato de sodio), para provocar la reacción colorimétrica. Ésta finalmente se aforó hasta completar 10 ml.
6. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia a 730 nm utilizando una curva estándar de ácido tánico.

Apéndice 2: Resultados adicionales en el cultivo de células en suspensión de *Cinchona officinalis*

Jara Félix, Armijos Rosa

Memorias del III Congreso peruano de Biotecnología y Bioingeniería (2006)

Segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* se cultivaron medio Gamborg (1968) suplementado con distintas combinaciones reguladores de crecimiento (tabla 1). A los 21 días comenzó el proceso de dediferenciación de los tejidos en todas las combinaciones de reguladores ensayadas. Los datos finales se registraron a los 45 días de cultivo.

Tabla 1: Porcentaje de callo formado a partir de segmentos nodales en medio B5 medio combinado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (45 días de cultivo).

Combinación de RCV mg l ⁻¹		Porcentaje de callo (%)
2,4 -D	BAP	
0.5	0.25	48.3 ± 6.7 c,d
1.0	0.5	56.7 ± 7.9 b,c
2.0	1.0	91.7 ± 3.9 a
3.0	2.0	70,00 ± 8.1 b
5.0	3.0	31.7 ± 5.7 d

Medias ± ES, seguido por diferentes letras son diferentes estadísticamente a 5% nivel, usando el test de *Dunncan*.

Los callos obtenidos presentaron una estructura esponjosa friable y con tonalidades distintas (Fig. 1). En presencia de 2.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l BAP (Fig. 1a) se obtuvo el más alto porcentaje de explantos que formaron callos, en el resto de combinaciones el porcentaje de explantos que se dediferenciación fue menor a medida que la concentración de auxinas-citoquininas disminuía. Sin embargo, en otros estudios se ha reportado la formación de callo para el inicio de cultivo de células en suspensión con la aplicación de 2,4-D pero en combinación con KIN (Koblitz et al. 1983b; Schmauder et al. 1985; Wijnsma et al. 1985;

Allan & Scragg 1986; Khouri et al. 1986; Hay et al. 1986; 1987; Giroud et al. 1989; Hoekstra et al. 1990; Blom et al. 1992; Ramos-Valdivia et al. 1997; Ying-Shan et al. 2002)

En el presente estudio también se señala que los tejidos expuestos a bajas cantidades de estas combinaciones presentan necrosis.

Figura 1 .Cultivo en suspensión de *C. officinalis*. **a.** Callo de color verde de característica friable **b.** Desagregación de células a partir de callos **c.** Agregados celulares. (Bar= 10μm).

Los callos provenientes de la combinación de 2.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de BAP fueron transferidos a un medio líquido con diferentes concentraciones de 2,4-D, estos cultivos fueron mantenidos en agitación a 100 rpm. Los callos se agitaron y se disgregaron gradualmente hasta establecer un cultivo de células en suspensión. De estos se evaluó el volumen y la viabilidad de las células.

El cultivo en suspensión de *C. officinalis* presentó células individuales y agregados celulares (Fig. 1 b, c) de diferentes tamaños. Las formas de las células variaron dependiendo de la etapa del cultivo, en la fase exponencial temprana las células presentaron una forma isodiamétrica que fue cambiando hasta mostrar a la fase estacionaria del cultivo una forma alargada.

Se observó un crecimiento sigmoideo en el cultivo en suspensión teniendo las siguientes fases: fase de adaptación de 4 días, fase exponencial de aproximadamente 8 días, y luego la fase estacionaria de 2 a 3 días y finalmente entra a la fase de mortalidad (Fig. 3). Datos similares fueron obtenidos por Khouri et al (1986) and Koblitz et al (1983) en *C. succirubra*. Sin embargo en *C. ledgeriana* el periodo de cultivo y la viabilidad celular se extendió, aproximadamente, de 28 a 31 días (Wijnsma et al. 1985; Allan and Scragg 1986).

Figura 3 Porcentaje del volumen de célula empaquetada (% PCV-Percentage packed cell volume) de *Cinchona officinalis* curva de crecimiento en un sistema cerrado a diferentes concentraciones de 2,4- D (barras verticales representan el SE), evaluada en un periodo de 16 días.

Las diferentes concentraciones de 2,4-D estimularon la proliferación de las células, sin embargo, existieron diferencias significativas entre éstas en el día 14, cuando el cultivo, presentó el más alto porcentaje de proliferación celular. Alcanzando un 43% en la concentración de 1.0 mg/l de 2,4-D, seguido por 1.5 mg/l con 38% y finalmente el crecimiento fue más lento en el control y en la concentración de 2 mg/l.

Es conocido que el 2,4-D es ampliamente utilizado en cultivo de tejidos sólo o en combinación con bajas concentraciones de BAP o Kinetina para la inducción de callos y establecimiento de células en suspensión. La concentración de 1 mg l^{-1} de 2,4-D ha sido usada

en otras especies de *Cinchona*, aumentando el peso seco de biomasa a lo largo del período de cultivo (Parr et al. 1984; Scahmauder et al. 1985; Hay et al. 1986; Hoekstra et al. 1990) debido a su efecto sobre la proliferación celular.

La viabilidad celular en *Cinchona* descendió desde el principio del cultivo, siendo necesario para subcultivar antes de los 12 días. Acorde a la tinción con azul de tripán el 71 ± 1 % de células fueron viables.

Referencias bibliográficas

- Allan EJ., Scragg AH. (1986) Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 liter air-lift bioreactors. *Biotechnology Letters* 8(9):635-638.
- Blom T., Kreis W., van Iren F., Libbenga K. (1992) A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* 11(3):146-149.
- Gamborg O., Miller R., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Giroud C., van der Leer T., van der Heijden R., Verpoorte R., Heeremans C., Niessen W., van der Greef J. (1991) Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures. *Planta Med* 57 (2):142-148.
- Hay C., Anderson L., Phillipson J., Curless D., Brown T. (1987) *In vitro* culture of *Cinchona* species. Part II Time-course studies on the uptake of radio-labelled alkaloid precursors and alkaloids by *C. ledgeriana* root suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9(3):197-206.
- Hay C., Anderson L., Phillipson J., Roberts M. (1986) *In vitro* culture of *Cinchona* species. Precursor feeding of *C. ledgeriana* root suspension cultures with L-tryptophan. *Plant Cell Reports* 5(1):1-4.

- Hoekstra S., Harkes P., Verpoorte R., Libbenga K. (1990) Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Reports* 8(10):571-574.
- Jordán M. (1975) Histologische und physiologische Untersuchungen zur Kapazität der Androgenese bei in vitro kultivierten Prunus-, Pyrus-, Ribes- und Nicotiana Antheren. (Inaugural-Dissertation), Justus Liebig-Universität, Gießen. 113 pp.
- Khoury H., Ibrahim R., Rideau M. (1986) Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 5(6):423-426.
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983a) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. Alkaloid production in cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 2(3):122-125.
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983b) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports* 2(2):95-97
- Parr A. Robins R., Rhodes M. (1984) Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulfoxide effects on alkaloids release and long-term membrana integrity. *Plant Cell Reports*. 3: 261-265.
- Ramos-Valdivia A., van der Heijden R., Verpoorte R. (1997) Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. *Planta* 203:155-161 .
- Schmauder H., Groger D., Koblitz H., Koblitz D. (1985) Shikimate pathway activity in shake and fermenter cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 4 (5):233-236.
- Wijnsma R., Go J., van Weerden I., Harkes P., Verpoorte R., BaerheimSvendsen A (1985) Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona* spec. *Plant Cell Reports* 4(5):241-244.

Ying-Shan H., van der Heijden R., Verpoorte R. (2002) Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona* Robusta by biosynthetic precursor and inhibitors. *Biotechnology Letters* 24:705-710.

CAPITULO 2

Evaluación de la estabilidad genética en explantes cultivados *in vitro* de *Cinchona officinalis*, mediante marcadores ISSR

RESUMEN

Cinchona officinalis, especie endémica del valle de Loja, se encuentra amenazada por diferentes factores. Ante esta realidad se han aplicado varias estrategias de manejo y conservación, tal es el caso de la propagación masiva por cultivo *in vitro*. La proliferación eficiente en varios sub-cultivos se desarrolló a través de dos vías: de forma directa e indirecta, mediante la inducción por diferentes combinaciones de reguladores hormonales de crecimiento. La fidelidad genética de los explantos provenientes del cultivo en medio suplementado con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y de tres sub-cultivos sucesivos de explantos de *C. officinalis* fueron evaluados a través del método de amplificación, mediante PCR, de las secuencias ubicadas entre microsatélites-ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Un alto índice de multiplicación de 11.5 se obtuvo en la combinación en medio Gamborg (B5) con 3.0 mg/l de AIB y 5.0 mg/l de BAP en los sub-cultivos evaluados. Un total de 13 marcadores ISSR fueron analizados, 6 de estos fueron polimórficos. Estos marcadores reflejaron el mayor porcentaje de variación somaclonal en los explantes cultivados en presencia de 2,4-D que se caracterizaron por la formación de callos; el mayor porcentaje de variación se obtuvo los explantes provenientes de la combinación de 1.0mg/l de 2,4-D con 0.2 mg/l de Kin con un 1.8% en el segundo sub-cultivo de regeneración, la cual aumento a 3.6% en el tercer sub-cultivo de regeneración. La fidelidad genética se mantuvo en los sistemas de propagación directa a partir de meristemas preformados en el explanto.

ABREVIATURAS

ISSR	Inter simple sequence repeat
B5	Gamborg et al. (1968)
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
BAP	6-bencilamino purina
AIB	Acido indol butírico
ANA	Acido naftalenacético
2,4-D	Acido 2,4-diclororofenoxiacético
Kin	Kinetina

PALABRAS CLAVE: *Cinchona officinalis*, ISSR, vías de regeneración, sub-cultivos

INTRODUCCIÓN

La Cascarilla (*Cinchona officinalis* Linneo), pertenece a la familia Rubiaceae, es una especie endémica del valle de Loja- Ecuador, propia de los bosques montanos (Andersson 1999; Garmendia 2005), esta especie ha tenido grandes amenazas a su conservación, desde la explotación desmedida de los árboles para la extracción de su corteza por la presencia de los alcaloides, empleados en la cura del paludismo, hasta la modificación de su hábitat a causa de la deforestación, desarrollo urbano, establecimiento de agricultura y ganadería. Estas razones han ocasionado la fragmentación del hábitat formando pequeñas y dispersas poblaciones de la especie, llegando a convertirla en vulnerable (Madsen 2002; Espinosa, datos no publicados). A esto se suma, que la especie en condiciones naturales presenta una deficiente regeneración por semillas y de forma vegetativa, debido a que requiere de condiciones específicas para su crecimiento y desarrollo (Acosta 1947; Garmendia 2005). Por lo tanto la aplicación de técnicas de manejo y conservación *ex situ* se hacen necesarias para permitir la recuperación de las poblaciones de esta especie. Se han realizado varios esfuerzos por aplicar estrategias para su recuperación y conservación (Madsen 2002; Garmendia 2005; Espinosa & Ríos, 2014). Una de estas es el cultivo *in vitro*, herramienta útil para aquellas especies que presentan algún tipo de dificultad de regeneración en condiciones naturales, siendo aplicada con éxito en muchas especies raras o amenazadas (Slazak et al., 2015; Upadhyay et al., 2015). Esta técnica permite producir y mantener stocks de plantas saludables de forma masiva (Agarwal et al., 2015) en periodos cortos de tiempo y en espacios reducidos. Las especies del género *Cinchona* no han sido la excepción, empleándose esta técnica en las décadas de los 80 y 90 con el objeto de incrementar la productividad de alcaloides a través del cultivo *in vitro* de diversos tejidos y de plántulas enteras, semillas, hojas, células en suspensión, segmentos de tallos y raíces (Satba & Chung, 1981; Koblitz et al., 1983; Koblitz et al., 1983; Parr et al 1984; Schmauder et al., 1985; Wijnsma et al., 1985; Allan & Scragg 1986; Khouri et al., 1986; Hay et al., 1986a; 1987b; Walton et al., 1987; Hoekstra et al., 1990; Geerlings et al., 1999; Han et al., 2002; entre otros). De estas técnicas la más exitosa ha sido el cultivo de células en suspensión previa la formación de callo. Estos trabajos desarrollados en cultivo *in vitro* en varias especies del género, no solo han servido para la producción de alcaloides sino

también han sido la base para el establecimiento de protocolos de propagación masiva con fines de reintroducción y reforzamiento de las poblaciones de *C. officinalis* en el hábitat natural (Armijos & Pérez en publicación). Este tipo de propagación masiva *in vitro* debe generar individuos genéticamente idénticos a la planta madre; sin embargo, en el proceso se corre el riesgo de inducir a un fenómeno frecuente que es la aparición de variación entre la línea celular parental y sus regenerantes (Larkin & Scowcroft, 1981). La ocurrencia de estas variaciones es conocida como variación somaclonal, ésta es espontánea y no controlada, limitando la utilidad del sistema de propagación masiva a causa de su naturaleza impredecible (Singh et al., 2011). Por ende, al igual que la propagación, es de importancia mantener la integridad genética derivada de las plantas propagadas bajo estas condiciones. La variación somaclonal puede originarse bajo ciertas situaciones de estrés que se producen durante el cultivo *in vitro*, los factores que la originan son diversos y han sido estudiados en algunas especies (Tabla 1) (Sharma et al., 2007 Chandrika et al., 2010; Rathore et al., 2011; Regalado et al., 2015).

Estos factores pueden promover condiciones de estrés en el cultivo de células y tejidos, los cuales pueden originar variaciones de tipo fenotípicas y genéticas dando lugar a variantes somaclonales (Kaeppler et al., 2000), los cambios más frecuentes son cambios genéticos como metilaciones del ADN, errores de transcripción, reordenamiento cromosómico, amplificación y mutación de genes (Philips et al., 1994; Keappler et al., 2000; Rani & Raina, 2000 Álvarez et al., 2010); y activación de retrotransposones (Hirochika, 1993). El detalle de algunas de las variaciones más importantes, con ejemplos de especies en las cuales se ha estudiado, se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1: Algunos ejemplos de especies donde se ha identificado variación somaclonal, el factor determinante de la variación y el método de detección utilizado.

Inductor de variación somaclonal	Factor	Medio de identificación	Especie (s) evaluada (s)	Referencia
Subcultivos	Sub-cultivos	Características morfológicas	<i>Musa spp</i>	Rodrigues et al., 1998
	Sub-cultivos	SPAR	<i>Nepenthes khasiana</i> H.	Devi et al., 2014

Capítulo 2: Evaluación de la estabilidad genética

Inductor de variación somaclonal	Factor	Medio de identificación	Especie (s) evaluada (s)	Referencia
Vía de regeneración	Diferentes sistemas	Análisis morfológico	Arroz	Lee et al, 1999
	Cultivos celulares	Análisis morfológico y citológico.	Cucumber	Ladyzynski et al., 2002
	Callos	Picado o manchas provocadas por <i>Pythium violae</i>	<i>Pythium violae</i>	Cooper et al., 2006
	Embriogénesis somática	ISSR	<i>Tylophora indica</i>	Sharma et al., 2007
	Brotación directa	ISSR	<i>Dictyospermum ovalifolium</i>	Chandrika et al., 2008
	Callos embriogénicos	RAPD	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Bhattachaya et al., 2008
	Brotación adventicia	ISSR	<i>Nothapodytes foetida</i>	Chandrika et al., 2010
	Brotación adventicia	RAPD, ISSR	<i>Aloe vera</i>	Rathore et al., 2011
	Brotación directa	ISSR	<i>Hydrangea macrophylla</i>	Liu et al., 2011
	Regeneración indirecta	RAPD	<i>Pogostemon patchouli</i>	Ravindra et al., 2012
	Brotación adventicia	ISSR, RAPD	<i>Lilium orientalis</i>	Liu & Yang, 2012
	Callos	RAPD	<i>Ungernia victoris</i>	Bublyk et al., 2012
	Callo	ISSR, RAPD	<i>Picrorhiza kurroa</i>	Rawat et al., 2013
	Brotación adventicia	ISSR	<i>Tylophora indica</i>	Sharma et al., 2014
	Embriogénesis somática	MSAP	<i>Eleuterococcus senticosus</i>	Chakrabarty et al., 2003
	Embriogénesis somática	AFPL, MSAP, SSAP, análisis citológicos, caracteres morfológicos	<i>Coffea arabica</i>	Landey et al., 2015
	Callos	Análisis citológico	<i>Asparagus officinalis</i>	Regalado et al., 2015

Capítulo 2: Evaluación de la estabilidad genética

Inductor de variación somaclonal	Factor	Medio de identificación	Especie (s) evaluada (s)	Referencia
Reguladores de crecimiento	Brotación adventicia	Análisis citológico	<i>Titanotrichum oldhamii</i>	Takagi et al., 2011
	Auxinas	Análisis citológico	<i>Curcuma aromatica</i>	Mohanty et al., 2008
	Citoquininas	RAPD, morfología	<i>Fragaria sp.</i>	Biswas et al., 2009
Combinación de factores	Genotipo, callos	RAPD, análisis citológico	<i>Allium sativum</i>	Al- Zahim et al., 1999
	Varios factores	RAPD, ISSR, AFLP	<i>Camellia sinensis</i> , <i>C. assamica ssp. assamica</i>	Devarumath et al., 2002
	Cultivos celulares y tiempo de cultivos	Características morfológicas	<i>Coffea arabica</i>	Etienne & Bertrand, 2003
	Sub-cultivos-callos	RAPD, ISSR	<i>Pisum sativum</i>	Kuznetsova et al., 2006
	Sub-cultivos; Brotación adventicia	Caracteres morfológicos	<i>Dieffenbachia</i>	Shen et al., 2007
	Callos	RAPD, ISSR	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Guo et al., 2007
	Sub-cultivos-distintos genotipos	RAPD	<i>Musa acuminata</i>	Sheidai et al., 2008
	Varios factores	RAPD	<i>Bulbophyllum auricomun</i>	Than, 2011
	Varios factores	RAPD, ISSR	<i>Spilanthes calva</i>	Razaq et al., 2013
	2,4-D, callos	ISSR	<i>Bletilla striata</i>	Wang & Tian, 2014
	Varios factores	ISSR	<i>Phyllanthus fraternus</i>	Upadhyay et al., 2015
	Sub-cultivos-Auxina	ISSR, SRAP	<i>Tetrastigma hemsleyanum</i>	Peng et al., 2015
	Organogénesis indirecta- ploidía	AFLP	<i>Viola uliginosa</i>	Slazak et al., 2015

Capítulo 2: Evaluación de la estabilidad genética

Inductor de variación somaclonal	Factor	Medio de identificación	Especie (s) evaluada (s)	Referencia
Genotipo	Nivel de ploidía	Análisis citológico	<i>Asparagus officinalis</i>	Limanton et al., 2000
	Diversos genotipos	AFPL	<i>Hordeum vulgare</i>	Bednarek et al., 2007
	Genotipo	MMR, SSR	<i>Sorghum bicolor</i>	Zhang et al., 2010
	Diversos genotipos		<i>Gentiana spp.</i>	Kunakh et al., 2005
Nutrientes	NaCl-genotipo	Caracteres morfológicos	<i>Oryza sativa</i>	Lutts et al, 1998
	Nutrientes		<i>Torenia fournieri</i>	Nhut et al., 2013
Otros factores	Irradiación	Isoenzimas, RAPD	<i>Ipomea batatas</i>	Wang et al., 2007
	Irradiación	ISSR	<i>Lilium longiflorum</i>	Xi et al., 2012

También se ha reportado que se pueden establecer conclusiones erróneas cuando se ignora la presencia de bacterias en los cultivos, lo cual puede inferir en el análisis de la variación somaclonal (Moreno-Vázquez et al., 2014). La evaluación de la variación somaclonal en etapas tempranas del cultivo, es necesaria para mantener la fidelidad de los tejidos obtenidos *in vitro* con respecto a su patrón o planta madre (Kumar et al., 2010; Phulwaria et al., 2014). La variación somaclonal o fidelidad genética puede ser analizada a diferentes niveles: morfológico, citológico, citoquímico, bioquímico y molecular (Chandrika et al., 2008; Ruffoni & Savona, 2013). Entre las moleculares, una de las técnicas más eficientes y usadas son los marcadores moleculares basados en el ADN (Tiwari et al., 2013), como los ISSR (Inter simple sequence repeats) que son un tipo de marcadores genéticos largos (100-3000 pb) que permiten conocer el grado de variación que ocurre en las regiones microsatélite, que se encuentran dispersas en el genoma y varían en el número de repeticiones (Bornet & Branchard, 2001; Sharma et al., 2014). Los marcadores moleculares ISSR son uno de los métodos más eficientes, rentables, sensibles, fáciles de usar y altamente polimórficos (Xi et al., 2012; Singh et al., 2013; Varsheney & Anis 2013; Kunakh et al., 2015). Requieren pequeñas cantidades de ADN y no requieren de información previa del material vegetal. Estos marcadores se han venido usando en muchos trabajos por su eficacia para evaluar la

fidelidad genética en plantas regeneradas *in vitro*, así como en estudios de diversidad genética (Singh et al., 2011; Devi et al., 2014).

El presente trabajo es el primero en evaluar la variación somaclonal en *Cinchona officinalis*, determinando la influencia de dos factores: la vía de regeneración o propagación y el número de subcultivos. Es común que en los explantes regenerados por vía directa, tales como cultivo de yemas, meristemas, segmentos nodales, embriogénesis somática, la variación somaclonal sea baja o nula (Yin et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2014; Phulwaria et al., 2014) y que se presente en valores elevados en los sistemas de regeneración por vía indirecta, como callogénesis, organogénesis indirecta, cultivos protoplastos y células en suspensión, etc. (Rathore et al., 2011; Xi et al., 2012).

Por su parte los sub-cultivos son otro factor que incrementa la posibilidad de variación somaclonal, cuando los cultivos son de periodos largos o son sub-cultivados por varias ocasiones, incrementando la posibilidad de someter a condiciones de estrés. (Rodrigues et al., 1998; Kuznetsova et al., 2006; Shen et al., 2007; Devi et al., 2014; Peng et al., 2015). Como objetivo del presente estudio se evaluará la variación que existe entre las plántulas regeneradas y sus patrones o plantas desde las cuales se partió el cultivo (plántulas germinadas *in vitro*), regeneradas por las vías directa e indirecta en tres sub-cultivos mediante marcadores ISSR. Basado en protocolos de propagación estandarizados para especies del género *Cinchona* (Koblitz & Hagen, 1962; Staba & Chung, 1981; Robins, 1994; Armijos & Pérez en publicación).

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

El cultivo se inició a partir de semillas provenientes del sector Aguarango-Vilcabamba (Loja-Ecuador), las mismas que fueron esterilizadas y puestas a germinar en medio Gamborg B5, según el protocolo descrito en el capítulo anterior (Armijos & Pérez en publicación). Las semillas iniciaron su germinación a los 20 días y tras 4 meses de crecimiento, cuando las plántulas alcanzaron de 6 - 8 cm de altura y presentaron varias yemas, éstas fueron usadas para el inicio del cultivo.

Inducción a proliferación *in vitro* de brotes

Cada plántula proveniente de una semilla fue considerada como planta madre. De estas se usaron los segmentos nodales de 1.0 - 1.5 cm, cada segmento con 2 a 3 yemas. Los segmentos nodales extraídos de cada planta madre fueron cultivados en medio B5 con la adición de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (tabla 2) para inducir a la proliferación de brotes por medio de dos vías:

Brotación directa: Inducción de la formación de brotes a partir de yemas preexistentes, para lo que se usaron combinaciones de 0.1 mg/l NAA + 0.5 BAP mg /l y 0.1mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP.

Brotación indirecta: Regeneración de brotes previa formación de callo. En este caso se usaron combinaciones de 3.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP; 1.0 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l Kin; 1.0 mg/l 2,4-D + 5.0 mg/l BAP; y 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BAP.

Tabla 2: Medio para inducir la proliferación de brotes con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas.

Vía de proliferación	Medio de inducción (mg/l)	Respuesta obtenida
Brotación directa	0.5 BAP + 0.1 NAA	Brotes
	1.0 BAP + 0.1 NAA	Brotes
Brotación indirecta	5.0 BAP + 3.0 AIB	Callos/brotes adventicios
	0.2 Kin + 1.0 2,4-D	Callos/brotes adventicios /raíces
	5.0 BAP + 1.0 2,4-D	Callos/brotes adventicios/ raíces
	1.0 BAP + 2.0 2,4-D	Callos/brotes adventicios /raíces
	Control	Brotes

Fuente: Armijos & Pérez en publicación

Sub-cultivos

De los explantos crecidos en las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, se realizaron sub-cultivos cada 3 meses (Fig.1), en un medio B5 sin reguladores de crecimiento durante 4 periodos, hasta completar los 12 meses de cultivo y teniendo cada sub-cultivo su respectivo control (Fig. 1). Todos los explantes de las distintas combinaciones y sub-cultivos

fueron expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad con lámparas fluorescentes de 40 Wats, a una temperatura promedio de 23 ± 2 °C y una humedad ambiental de $65 \pm 7\%$.

Figura 1: Esquema de la planificación experimental para analizar la variación somaclonal producida en función de los distintos genotipos, medios de cultivo y número de subcultivos.

Análisis de la variación somaclonal

De cada tratamiento y sub-cultivo se tomaron dos muestras al azar (hojas y secciones de callo), éstas fueron conservadas a -80°C en tubos *eppendorf* hasta el proceso de extracción de ADN. Para la extracción de ADN, cada muestra se introdujo en tubos y estos fueron sometidos a nitrógeno líquido de 3-5 minutos con el fin de facilitar la trituración en el homogeneizador (Restsch, MM 301). Una vez trituradas las muestras se realizó la extracción del ADN con el Kit de Qiagen. El ADN se cuantificó en el Nanodrop (Thermo Scientific

2000 C). Con el fin de verificar la integridad del ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa. Las muestras de ADN fueron mantenidas a -20 °C, hasta su uso.

Como control positivo de todos los ensayos se utilizó Actina, usando marcadores transferidos de *Arabidopsis thaliana*, ATU39449_Fw (GGC GAT GAA GCT CAA TCC AAA CG) ATU39449_RV (GGT CAC GAC CAG CAA GAT CAA GAC G). La PCR para el control positivo se realizó con una desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, anillamiento a 54°C por 40 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para el análisis con ISSR se evaluaron un total de 13 marcadores de The University British Columbia (UBC), de estos se seleccionaron seis marcadores (Tabla 2) considerando la amplificación de productos a través de bandas claramente distinguibles y reproducibles. Se determinó el número de bandas mono y polimórficas amplificadas por cada marcador. Se ensayaron varias temperaturas de alineamiento y se estandarizaron las condiciones para la PCR.

La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl, cada 1X PCR contenía 20ng de templado de ADN, 4µl de buffer con cloruro de Magnesio 5X, 0.5 µM de marcador, 0.2 mM de cada dNTP y 1U de Taq polimerasa (Promega). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94° C, seguido por 40 ciclos con 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineamiento a la temperatura de específica a cada marcador; 2 minutos de extensión a 72 °C y un ciclo de 10 minutos de extensión final a 72°C. El proceso fue realizado en el Termociclador Applied Biosystems. La amplificación de productos fue visualizada con marcador de ADN en gel de agarosa al 2% con TAE 1X, los geles fueron teñidos con Gel Red y corridos a 80 voltios/cm y visualizados bajo luz UV. Los productos (bandas) amplificados de las PCR que no fueron claras se repitieron y finalmente se tomaron en cuenta solo las bandas claras y reproducibles. El tamaño de los productos de amplificación fue estimado utilizando un marcador molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

Diseño experimental y análisis de datos

Todos los ensayos partieron de los explantos proveniente de las combinaciones que tuvieron entre 2 - 6 explantos madre, de cada uno de estos se obtuvieron de 3 - 5 explantos, para ser

cultivados en cada medio de cultivo. Teniendo un mínimo de 36 explantos por cada sub-cultivo con su correspondiente control. Al azar se tomaron 2 muestras por cada sub-cultivo y combinación para la extracción de ADN y análisis con ISSRs, se evaluaron un total de 84 explantos.

La matriz binaria se construyó con la frecuencia de variación en base a la presencia (1) o ausencia (0) de bandas amplificadas, observando las bandas en el programa *GelAnalyzer 2010a* (Lazar & Lazar, 2010). Las distancias genéticas entre los grupos se calcularon con el coeficiente de *Jaccard*. La relación entre las plantas madres y los explantos regenerados fue representada en un dendrograma, el cual fue construido basado en los datos de la matriz de distancia genética por aplicación del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). El polimorfismo se calculó como la proporción del número total de las bandas polimórficas para el total del número de bandas y expresado como porcentaje de cada individuo con respecto a cada madre. Los análisis fueron realizados en el programa *Lenguaje R* (Development Core Team, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se hizo el análisis de los explantes de *C. officinalis* cultivados *in vitro* según el protocolo de Armijos & Pérez (en publicación) para determinar la fidelidad genética con respecto a sus madres, evaluando la influencia de la vía de propagación y los sub-cultivos.

Inducción a proliferación *in vitro* de brotes

Los explantes estuvieron sometidos a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (tabla 1). Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la proliferación en cuatro sub-cultivos, se calculó el índice simple o relativo (De la Fuente, s.f.) para lo cual se obtuvo el porcentaje de proliferación de cada sub-cultivo y se dividió para el porcentaje de proliferación de la etapa inicial.

$$m_0^t = \frac{m_{it}}{m_{i0}}$$

m_{it} =porcentaje de brotación final

m_{i0} =porcentaje de brotación inicial

Tras 16 meses de cultivo (4 meses desde la germinación y 12 meses de sub-cultivos), los explantes cultivados en el medio B5 con 3mg/l AIB + 5mg/l de BAP, presentaron el mayor índice de proliferación (11.5), obteniéndose aproximadamente, 700 explantes a partir de un solo individuo (Fig. 2). Le siguen en efectividad los explantes cultivados en las combinaciones de 1.0 mg/l de 2,4-D + 0.2 mg/l Kin con un índice de 6.5 y la combinación de 0.1mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP con 4.3 (Fig. 2).

Figura 2. Índice de multiplicación evaluada en 4 sub-cultivos, para cada combinación de RCV.

*b.d: brotación directa

**b.i.: brotación indirecta

Las repuestas morfogénicas como los brotes, ocurren por la aplicación de citoquininas tanto solas (Francis & Sorell 2001; Razaq et al. 2013; Saha et al. 2014), o en combinación con auxinas (Upadhyay et al., 2015), teniendo un efecto sinérgico sobre las respuestas morfogénicas, lo cual ha sido reportado en especies medicinales como *Rhodiola rosea* (Dimitrov et al., 2003). En el presente estudio la combinación BAP-IBA fue la más eficiente para inducir a la brotación de tipo indirecta promoviendo la proliferación de brotes vigorosos en *C. officinalis* (Fig. 3B). Similares respuestas han sido observadas en otras especies de *Cinchona* como *C. ledgeriana* (Hunter 1979), así también en otras especies como *Tylophora indica* donde se obtuvo alto porcentaje de callo y regeneración de brotes en combinaciones de

BAP- IBA (Sharma et al., 2014) y en *Hydrangea macrophylla* ocurrió algo similar pero con un menor porcentaje de brotación (Liu et al., 2011).

El índice de proliferación en medio B5 con la adición de 1.0 mg/l de 2,4-D + 0.2 mg/l Kin también fue importante, debido al efecto principalmente de la Kin, sin embargo la combinación de BAP-IBA fue más efectiva en la proliferación de nuevos brotes ya reportado en varios trabajos (Varshney & Anis, 2013).

Figura 3. Proliferación de nuevos brotes. **A.** Brotación directa a partir de yemas axilares en medio B5 sin reguladores [control], **B.** Brotación indirecta a partir de callo, formación de estructuras globulares [B5 + 5.0 mg/l de BAP y 3.0 mg/l de AIB]. **C.** Formación de callo, regeneración de brotes y raíces [B5 + 0.2 mg/l de Kin y 1.0 mg/l de 2,4-D].

Es importante mencionar que en estas tres combinaciones donde el índice fue mayor, la proliferación se incrementa a lo largo de los 4 sub-cultivos, siendo necesaria únicamente la aplicación de RCV por una sola ocasión en la etapa inicial. El efecto de los reguladores en la etapa inicial y su efecto en los siguientes sub-cultivos se ha evaluado en varias especies de bromelias, dicho fenómeno se conoce como habituación a los reguladores de crecimiento (Pierik, 1990). Otro factor que pudo influir sobre la proliferación sin la aplicación o en una baja cantidad de RCV, es la eliminación del sistema radicular; lo cual estimula la activación del crecimiento de los brotes (Vysotskaya et al., 2010). Para cada sub-cultivo los nuevos explantes fueron individualizados eliminando raíces y hojas, por tanto este factor también pudo influir en el incremento de proliferación.

En resumen, la respuesta observada en la combinación [3mg/l de AIB + 5mg/l de BAP] sobre el incremento de la proliferación, al finalizar el cuarto sub-cultivo podría deberse a una habituación de los tejidos a los RCV aplicados en la etapa inicial; la cual ocurre como una respuesta de variación epigenética a causa de los cambios transitorios de la expresión génica

de la información a causa del estímulo inicial de los RCV; este tipo de cambios temporales no alteran el ADN, y se transmiten durante la mitosis y meiosis (Smulders & De Klerk, 2011; Landey et al., 2015); finalmente el otro factor que pudo influir sobre la proliferación es la eliminación del sistema radicular en cada sub-cultivo.

Variación somaclonal

Para realizar la reintroducción de individuos que han sido obtenidos por propagación masiva *in vitro*, a su hábitat natural uno de los requisitos es que se desarrolle un eficiente sistema de multiplicación de individuos élite con alta fidelidad genética (Rathore et al., 2011). Varios son los factores que influyen sobre la alteración genética bajo condiciones *in vitro*, básicamente por el estrés que se generan a los explantes. La inducción de variación genética o somaclonal es útil cuando se establecen programas de mejoramiento genético en especies cultivadas (Martín et al., 2002; Podwyszynska 2005; Martín & González-Benito 2009), pero debe ser controlada en programas de reintroducción.

En este estudio se aplicaron marcadores ISSR para analizar la estabilidad genética de 84 individuos (plantas madre y explantes regenerados). Inicialmente se evaluaron 13 marcadores ISSRs, de estos, se escogieron 6 marcadores que fueron reproducibles, con bandas intensas y bien diferenciadas. Se observó como producto de la amplificación de la PCR un total de 58 ISSRs, con un tamaño entre 200 a 2837 pb (pares de bases). Con los dinucleótidos AG y GA (tabla 3).

Tabla 3: Número y rangos de tamaño de fragmentos amplificados, a partir de 6 marcadores de ADN genómico de plantas regeneradas *in vitro* de *C. officinalis*.

Marcador	Secuencia 5'- 3'	Rango (pb)	Fragmentos amplificados	Fragmentos monomórficos	Fragmentos polimórficos	% de polimorfismo
UBC 807	(AG)8 T	233-1276	10	8	2	20
UBC 808	(AG)8 C	203-1517	13	8	5	39
UBC 809	(AG)8 G	200-1345	9	6	3	33
UBC 834	(AG)8 YT	256-2609	9	6	3	33
UBC 836	(AG)8 YA	233-1544	9	7	2	33
UBC 840	(GA)8 YT	231-2837	8	6	2	25
Total		200-2837	58	40	18	28.7%

La temperatura óptima de anillamiento de los marcadores varió entre 42-48° C. El número de bandas en cada marcador fue de 8 a 13 bandas, con un promedio de 10 bandas. Un mínimo de 8 bandas fue observado en el marcador UBC840 y un máximo de 13 bandas para el UBC808, la banda de menor tamaño fue de 200 bp para el marcador UBC809 y la de mayor tamaño 2837 bp para el marcador UBC840 (Tabla 3). El máximo porcentaje de polimorfismo (39%) fue observado para las amplificaciones del marcador UBC808; y éste fue seguido por los marcadores UBC809, UBC834, UBC836; el más bajo porcentaje de polimorfismo se observó en el marcador UBC807 con 20%. Un total de 4872 bandas fueron amplificadas.

Los explantos regenerados se compararon con la planta madre. Se utilizaron un total de 58 loci para revelar la afinidad genética que existió entre las plantas madre y los explantes regenerados. Según Nei (1978) se puede determinar variabilidad genética con un mínimo de 50 loci, por lo que el número de loci utilizados es adecuado.

Vía de proliferación

Los patrones que se obtuvieron de las madres fueron comparados con los de explantos regenerados, los cuales demostraron la presencia de polimorfismos en las muestras de ADN de *C. officinalis* por amplificación de ISSR.

El análisis del porcentaje de diferencia entre los explantes obtenidos se hizo por separado en cada una de las combinaciones, en la tabla presentada a continuación se incluye las repeticiones realizadas en cada caso (tabla 4).

Capítulo 2: Evaluación de la estabilidad genética

Tabla 4: Porcentaje de diferencia y rango de similitud calculado con el coeficiente de *Jaccard*; entre los explantes en los distintos medios más la adición de diferentes combinaciones de RCV y subcultivos.

Vía de regeneración	Sub-cultivos	Medio B5 + reguladores de crecimiento (mg/l)	Porcentaje de diferencia con respecto a la madre	Rango de similitud (coeficiente de <i>Jaccard</i>)
Proliferación directa	A	0.5 BAP- 0.1 NAA	0	1.00
	B	1.0 BAP - 0.1 NAA	0	1.00
	C	5.0 BAP - 3.0 AIB	0	1.00
	M (Planta madre)	B5		
	D1	B5 + 0.2 KIN - 1.0 2,4-D	0	1.00
	D2	B5	1.8	0.97-1.00
	D3	B5	3.6	0.91-1.00
	T1 (Control)	B5	0	1.00
	T2 (Control)	B5	0	1.00
	T3 (Control)	B5	0	1.00
	M (Planta madre)	B5		
	E1	B5 + 5.0 BAP -1.0 2,4-D	0	1.00
	E2	B5	0	1.00
	E3	B5	1.8	0.97-1.00
	T1 (Control)	B5	0	1.00
Proliferación indirecta	T2 (Control)	B5	0	1.00
	T3 (Control)	B5	0	1.00
	M (Planta madre)	B5		
	F1	B5 + 1.0 BAP - 2.0 2,4- D	0	1.00
	F2	B5	0	1.00
	F3	B5	1.8	0.98-1.00
	T1 (Control)	B5	0	1.00
	T2 (Control)	B5	0	1.00
	T3 (Control)	B5	0	1.00

Brotación directa

En las combinaciones [0.5mg/l de BAP- 0.1mg/l de NAA] y [1.0 mg/l de BAP - 0.1 mg/l de NAA], que indujeron brotación de forma directa a partir de yemas axilares preformadas, no se observó polimorfismo. Los marcadores de ISSR no mostraron variación genética, entre los tratamientos y sus controles. El coeficiente de similitud de *Jaccard* fue de 1.0 y no existieron agrupamientos, presentando fidelidad genética en los regenerantes (Tabla 4). Estas combinaciones se caracterizaron por inducir la proliferación de brotes por medio de regeneración directa a partir de yemas pre-existentes, ocurriendo el desarrollo de brotes a partir de meristemas organizados. En relación a otros trabajos se conoce que los cultivos organizados (Kumar et al., 2010), a través del cultivo de yemas mantienen la estabilidad genética y hay menor probabilidad de provocar variantes somaclonales (Agarwal et al., 2015). El método del desarrollo de los meristemas axilares basado en la supresión de la dominancia apical es el más utilizado de las técnicas de micropropagación vegetal (Varshney & Anis 2013). En la mayoría de reportes el tejido meristemático ha presentado tendencias bajas o nulas para la variación genética, como es el caso de *Gerbera jamesonii* (Bhatia et al., 2011).

Brotación indirecta

De los explantes cultivados en las cuatro combinaciones de reguladores de crecimiento que regeneraron brotes a partir de una fase previa de callo, los explantes provenientes de tres combinaciones dieron lugar a variación: [0.2 mg/l de Kin - 1.0 mg/l de 2,4-D]; [5.0 mg/l de BAP - 1.0 mg/l de 2,4-D] y [1.0 mg/l de BAP - 2.0 mg/l de 2,4-D] con un rango de coeficiente de variación entre 0.03- 0.09; a excepción de los explantes provenientes de la combinación 5.0 mg/l de BAP - 3.0 mg/l de AIB donde el coeficiente de variación fue de 0.

La variación detectada en los explantos regenerados en la combinación 0.2 mg/l de Kin - 1.0 mg/l de 2,4-D fue mayor, en estos se presentó a partir del segundo sub-cultivo y se incrementó en el tercer sub-cultivo, donde fue más significativa. La máxima distancia genética (0.05) se observó entre la madre y los explantes del tercer sub-cultivo. Los grupos formados en el clúster (Fig.4A) consistieron en dos subgrupos, el primero agrupó a M (madre), D1, T1, T2 y T3; y el segundo agrupó a D2 y D3.

Le sigue en orden de significancia la combinación los explantes regenerados en la combinación 5.0 mg/l de BAP- 1.0 mg/l de 2,4-D. La máxima distancia genética (0.04) se

observó en el tercer sub-cultivo. Mientras que los explantos regenerados presentaron una máxima distancia (0.04) entre el tercer sub-cultivo con respecto al resto. Los grupos formados en el clúster (Fig.4B) consistieron en dos subgrupos, el primero agrupó a M (madre), E1, E2, T1, T2 y T3.; y el segundo agrupó a E3.

Finalmente en los explantos regenerados en la combinación 1.0 mg/l BAP- 2.0 mg/l de 2,4-D la máxima distancia genética (0.02) con respecto a la planta madre, se observó en el tercer sub-cultivo. Mientras que los explantos regenerados presentaron una máxima distancia (0.02) entre el tercer sub-cultivo con respecto al resto de grupos. Los grupos formados en el clúster (Fig.4C) consistieron en dos subgrupos, el primero agrupó a M (madre), F1, F2, T1, T2 y T3; y el segundo a F3.

Figura 4: Dendrogramas resultado del análisis UPGMA basado en la matriz de distancia genética por el índice de *Jaccard*, obtenido de ISSR **A.** Explantos en los medios y subcultivos M: explante madre; D1: explantes en medio B5 + [0.2 mg/l de Kin - 1.0 mg/l de 2,4-D]; D2 segundo subcultivo en medio B5, D3: tercer Subcultivo en medio B5. TD1, TD2, TD3: explantes control cultivados del primero, segundo y tercer subcultivo en medio B5. **B.** Explantos en los medios y subcultivos M: explante madre; E1: explantes en medio B5 + [5.0 mg/l de BAP - 1.0 mg/l de 2,4-D]; E2 segundo subcultivo en medio B5, E3: tercer Subcultivo en medio B5. TE1, TE2, TE3: explantes control cultivados del primero, segundo y tercer subcultivo en medio B5. **C.** Explantos en los medios y subcultivos M: explante madre; F1: explantes en medio B5 + [1.0 mg/l de BAP - 2.0 mg/l de 2,4-D]; F2 segundo subcultivo en medio B5, F3: tercer Subcultivo en medio B5. TF1, TF2, TF3: explantes control cultivados del primero, segundo y tercer subcultivo en medio B5.

La combinación de 5.0 mg/l de BAP - 3.0 mg/l de AIB, fue la única donde los brotes se originaron a partir de callo y no se observaron variaciones. Es importante destacar que con posterioridad a la formación de callo se formaron estructuras verdes globulares compactas. Estas estructuras globulares compactas se han observado en explantos de *C. ledgeriana*, pero en combinaciones de RCV distintas, estas estructuras son meristemoides que posteriormente se diferencian en estructuras vasculares y demás tejidos (Robins et al 1986; Hoekstra et al., 1990). Aunque en la mayoría de reportes, incluido éste, la regeneración de explantos de manera indirecta, previa formación de callo, inducen variabilidad genética (Kuznetsova et al., 2006; Singh et al., 2011; Kunakh et al., 2015), en esta combinación no fue detectada. Similar respuesta se obtuvo en *Hydrangea macrophylla* cuando la misma combinación de reguladores no presentó riesgo de variación somaclonal en los explantos (Liu et al., 2011). En los

explantes de *Hedysarum theinum* también con regeneración adventicia no se afectó al genotipo (Erst et al., 2015) y en *Nothapodytes foetida*, tampoco se encontró variación en los regenerantes obtenidos de manera adventicia (Chandrika et al., 2010). En varios trabajos se ha reportado que son varios los factores que influyen en la variación genética entre ellos la vía regenerativa de manera indirecta, sin embargo no es regla el hecho que los cultivos de regeneración directa estables tienen menor riesgo de variación somaclonal y los que pasan por una fase de callo presentan mayor probabilidad de variación (Tang, 2001; Gao et al., 2010; Bairu et al., 2011). Esto se comprueba en este trabajo con los brotes regenerados en un medio conteniendo dicha combinación (Fig. 3B), donde se obtiene una alta proliferación y fidelidad genética en los regenerantes.

En los explantes cultivados con las combinaciones donde la presencia de 2,4-D fue el factor común se observó siempre variabilidad genética. Al igual que en *Aloe vera* (Rathore et al., 2011) y *Bletilla striata* (Wang et al., 2014) la presencia de 2,4-D fue uno de los factores inductores de variación somaclonal. La adición de 2,4-D se ha reportado como factor asociado a anormalidades genéticas, estimulando endopoliploidia, amitosis, mutaciones (Ladyzynski et al., 2002; Kunakh 2005; Mohanty et al., 2008) y la metilación del ADN que produce cambios en el genotipo (Chakrabarty et al., 2003; Regalado et al., 2015). A parte de la presencia de esta auxina, el factor que también influyó para la variabilidad fue el tipo de regeneración, a través de callo (Fig. 3C). El nivel de la variación somaclonal en la regeneración a partir de callos se puede deber a la heterogeneidad de las células del callo y a la acumulación de alteraciones genómicas (Kuznestsova et al., 2005) durante el cultivo a largo plazo (Bublyk et al., 2012).

Es importante también mencionar que en estas combinaciones la aparición de variabilidad no fue inmediata a la exposición a los reguladores de crecimiento, si no al tercer subcultivo, por lo tanto el efecto de los reguladores se asocia al tiempo de cultivo o al número sub-cultivos. Específicamente en presencia de 0.2 Kin - 1.0 2,4-D la variación se detectó en el segundo cultivo e incrementó en el tercero. En *Pisum sativum* la variación se observó en los explantes obtenidos de un primer subcultivo e incrementó en los explante del segundo subcultivo (Kuznetsova et al., 2006). Una respuesta similar se observó en *Musa acuminata* donde la variación incremento en los sub-cultivos a través de la perdida y aparición de nuevos alelos con respecto a la madre (Sheidai et al., 2008). Por lo general cuanto mayor es el número de

sub-cultivos, mayor es el riesgo de variaciones genéticas (Devi et al., 2014), esto puede ser a causa del aumento en la duración a la exposición a factores que causan estrés, tales como los reguladores de crecimiento. En *Tetrastigma hemsleyanum* la frecuencia de variación también tendió a aumentar con el tiempo de sub-cultivos, a causa de la acumulación de mutaciones (Peng et al., 2015).

En varios estudios sobre mutaciones que afectan a caracteres cualitativos se indican que las mutaciones se acumulan secuencialmente con el tiempo de cultivo, las plantas regeneradas a partir de tres meses de cultivo pueden contener un número pequeño de mutaciones y luego de varios subcultivos ocurrir la acumulación de mutaciones (Rodrigues et al., 1998; Kaeppler et al., 2000).

Estos resultados claramente indican que los subcultivos y el medio con reguladores de crecimiento producen porcentajes de variación durante el cultivo de explantos de *Cinchona officinalis*. Estos porcentajes estuvieron comprendidos entre el 0-3.6%; por lo tanto los explantos regenerados no fueron idénticos. Sin embargo, otros reportes donde se analizaron los explantes con marcadores ISSR con respecto al porcentaje de variación, se concluye lo siguiente: en los explantes cultivados de *Lilium orientalis* el porcentaje de variación obtenido fue de 8%, éste fue considerando como un bajo porcentaje de divergencia genética para la regeneración de brotes (Liu & Yang, 2012), al igual que en *Lilium* se consideraron a las plantas genética y morfológicamente estables con 0,73% de polimorfismo (Yin et al., 2013), otros trabajos reportaron similares conclusiones como *Dictyospermum ovalifolium* con una frecuencia de polimorfismo de 3.92% (Chandrika et al., 2008), y en *Balanites aegyptiaca* el polimorfismo fue un 1,8% (Varshney & Anis, 2013). A pesar del bajo porcentaje de variación genética obtenida en los explantes de *C. officinalis*, los resultados sugieren que la variación se debe al efecto sinérgico de la vía de regeneración, el efecto del 2,4-D y los sub-cultivos.

CONCLUSIONES

El presente estudio es el primero realizado sobre la estabilidad genética en el cultivo *in vitro* de *Cinchona officinalis* durante la proliferación de brotes mediante brotación directa y regeneración indirecta. La presencia de BAP-IBA produjo en nuestras condiciones de ensayo un alto índice de proliferación con alta fidelidad genética. Estos resultados también revelan que los explantes provenientes de yemas preformados fueron eficientes para mantener la

capacidad de respuesta morfogénica así como la estabilidad genética. La presencia de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo y el número de sub-cultivos influyeron sobre la estabilidad genética de los explantes provocando bajos porcentajes de variación somaclonal. Este trabajo sugiere que las vías de propagación de forma directa o indirecta sin la presencia de 2,4-D, pueden ser válidas para fines de conservación y reintroducción al medio natural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta M. (1947) Cinchonas del Ecuador. Quito: Publicaciones científicas Mas, 271 pp.
- Acosta M. (1989) La Cinchona o quina planta Nacional del Ecuador. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 17 (65): 305-311.
- Agarwal T., Gupta A., Patel A. Shekhawat N. (2015) Micropropagation and validation of genetic homogeneity of *Alhagi maurorum* using SCoT, ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 120: 313-323.
- Al- Zahim M., Ford B., Newbury H. (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports.* 18: 473-477.
- Allan EJ., Scragg AH. (1986) Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 liter air-lift bioreactors. *Biotechnology Letters.* 8(9):635-638.
- Alvarez M., Nota F., Cambiagno D. (2010) Epigenetic control of plant immunity. *Molecular Plant Pathology.* 11(4): 563-576.
- Andersson L (1998) A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 81: 1-75.
- Bairu M., Aremu A., Van Staden J. (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63:147-173.
- Bednarek P., Orłowska R., Koebner R., Jimmy J. (2007) Quantification of the tissue culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.) *BMC Plant Biology*, 7:10

- Bhatia R., Singh K., Sharma T., Jhang T. (2011) Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA- bases markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104: 131-135.
- Bornet B., Branchard M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 209-215
- Bublyk O., Andreev I., Spiridonova K., Kunakh V. (2012) Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris*. *Biología Plantarum* 56 (2) 395-400.
- Chakrabarty D., Yu K., Paek K. (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci* 165:61–68.
- Chandrika M., Ravishankar R., Thoyajaksha (2010) ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. *Biologia Plantarum*, 54 (3) 561-565.
- Chandrika M., Thoyajaksha V., Ravishankar R., Ramachandra K. (2008) Assessment of genetic stability of in vitro grown *Dictyospermum ovalifolium*. *Biología Plantarum*, 52 (4): 735-739.
- Cooper C., Crowther T., Smith B., Isaac S., Collin A. (2006) Assessment of the response of carrot somaclones to *Pythium violae* causal agent of cavity spot. *Plant Pathology.* 55: 427-432.
- De la Fuente S. () Estadística teórica I. Estadística descriptiva-Excel- SPSS. Universidad Autónoma de Madrid, 44 pp.
- Devarumath R., Nandy S., Rani V. (2002) RAPD, ISSR and AFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica ssp. assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Rep*, 21: 166-173.

- Devi S., Kumaria S., Rao S., Tandon P. (2014) Single primer amplification reaction (SPAR) methods reveal subsequent increase in genetic variations in micropropagated plants of *Nepenthes khasiana* Hook. f. maintained for three consecutive regenerations. *Gene* 538: 23-29.
- Dimitrov B., Tashera N., Zagorska, Evstatiera L. (2003) *In vitro* cultivation of *Rhodiola rosea* L. *Genet. Breed.* 32:3-6.
- Erst A., Zvyagina N., Novikova T., Dorogina O. (2015) Clonal Micropropagation of a Rare Species *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) and Assessment of the Genetic Stability of Regenerated Plants Using ISSR Markers. *Russian Journal of Genetics*. 52 (2) 158-162.
- Espinosa CI., Ríos G. (2014) Patrones de crecimiento de *Cinchona officinalis* *in vitro* y *ex vitro*; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 35 (1,2): 73-82
- Etienne H., Bertrand B. (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*. 23 419-426.
- Francis D., Sorrell D. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant growth regulation*. 33: 1-12.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158
- Gao X., Yang D., Cao D., Ao M., Sui X., Wang Q., Kimatu J., Wang L. (2010) *In Vitro* Micropropagation of *Freesia hybrida* and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets. *J Plant Growth Regul*, 29: 257-267.
- Garmendia A. (2005) El Árbol de la Quina (*Cinchona spp.*): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja. 204 pp.
- Geerlings A., Hallard D., Martinez A., Lopes I., van der Heijden R., Verpoorte R. (1999) Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* “Ledgeriana” hairy root culture

- containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 19: 191-196.
- Guo W., Wu R., Zhang Y., Liu X., Wang H., Gong L., Zhang Z., Liu B. (2007) Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. F. *Plant Cell Rep* 26: 1297-1307.
- Han Y-S., van der Heijden R., Vepoorte R. (2002) Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. *Biotechnology Letters* 24 (9): 705-710.
- Hay C., Anderson L., Phillipson J., Curless D., Brown T. (1987) *In vitro* culture of *Cinchona* species. Part II Time-course studies on the uptake of radio-labelled alkaloid precursors and alkaloids by *C. ledgeriana* root suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9 (3): 197-206.
- Hay C., Anderson L., Phillipson J., Roberts M. (1986) *In vitro* culture of *Cinchona* species. Precursor feeding of *C. ledgeriana* root suspension cultures with L-tryptophan. *Plant Cell Reports* 5(1): 1-4.
- Hirochika H. (1993) Activation of tobacco retransposons during tissue culture. *The EMBO Journal* 12 (6): 2521-2528.
- Hoekstra S., Harkes P., Verpoorte R., Libbenga K. (1990) Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Reports* 8 (10): 571-574.
- Kaeppler S., Kaeppler H., Rhee Y. (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant molecular biology*. 43: 179-188.
- Khoury H., Ibrahim R., Rideau M. (1986) Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 5 (6): 423-426.

- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983a) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. Alkaloid production in cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 2(3):122-125.
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983b) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports* 2(2):95-97.
- Kumar N., Modi A., Singh A., Gajera B., Patel A., Patel M., Subhash N. (2010) Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 16 (2): 207-213.
- Kunakh V. (2005) Biotechnology of medical plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Logos, Kyiv.
- Kunakh V., Mel'nyk V., Drobyk N., Andreev I., Spiridonova K., Twardovska M., Konvalyuk I., Adonin V. (2015) Chapter 9: Genetic Variation Induced by Tissue and Organ Culture in *Gentiana* Species. (pp.199-238). In Rybczynski et al. (Eds.) *The Gentianaceae Biotechnology and Applications*. Springer-Verlag, Berlin.
- Kuznetsova O., Ash O., Gostimsky S. (2006) The Effect of the Duration of Callus Culture on the Accumulation of Genetic Alterations in Pea *Pisum sativum* L. *Russian journal of Genetics*. 42 (5) 555-562.
- Ladyzynski M., Burza W., Malepszy S. (2002) Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* 125: 349-356.
- Landey R., Cenci A., Guyot R., Bertrand B., Georget F., Dechamp E., Herrera J., Aribi J., Lashermes P., Etienne H. (2015) Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell Tiss organ cult.* DOI 10.1007/s11240-015-0772-9
- Larkin P. Scowcroft W. (1981) Somaclonal Variation- a Novel source of Variability from Cell Cultures from Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.

- Lazar I., Lazar I (2010) Gel analyzer 2010a. Freeware 1D gel electrophoresis image software, 2010. Disponible en: <http://www.gelalyzer.com>
- Lee S., Shon Y., Kim Ch., Chun H., Cheong Y., Kim Z., Choe Z., Choi Y., Cho M. (1999) Variations in the morphology of rice plants regenerated from protoplasts using different culture procedures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57: 179-187.
- Leva A., Petruccelli R. (2012) Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biología Plantarum* 56 (2) 373-376
- Limanton A- Sotta B., Brown S., Jullien M. (2000) Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. *Plant Sci* 160: 15-26.
- Liu X. Yang G. (2012) Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 48: 172-179.
- Liu F., Huang L., Yang L., Reinhound P., Jongsma M. Wang C. (2011) Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* 'Hyd1' and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 104: 111-117.
- Lutts S. Kinet J., Bouharmont J. (1998) NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L). *Journal of Plant Physiology*. 152 (1) 92-103.
- Madsen J. (2002) Historia cultural de la cascarilla de Loja En: Aguirre Z., Madsen J., Cottas E., Balslev H (Eds.), Botánica Austroecuatorial: estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe (pp. 385-399). Ediciones AbyaYala, Quito:
- Martín C., González-Benito E. (2009) Cryopreservation and genetic stability of *Dendratherisma grandiflora* Tzvelev *in viro* cultures. *Agricultural and Food Science* Vol.18:129-135.

- Martín C., Uberhuaga E., Pérez C. (2002) Application of RAPD in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127:247-253.
- Mohanty S., Panda M., Subudhi E., Nayak S. (2008) Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatic* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biologia plantarum* 52 (4): 783-786.
- Moreno-Vázquez S., Larrañaga N., Uberhuaga E., Bolacel E., Pérez-Ruiz C. (2014) Bacterial contamination of *in vitro* plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Planta Cell Tiss Organ Cult*, 119:533-541.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* 89: 583-590.
- Nhut D., Hai N., Thu P., Thi N., Hien T., Tuan T., Nam N., Huy N., Chien H., Jain S. (2013). Protocol for Inducing Flower Color Somaclonal Variation in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.). *Methods in Molecular Biology* 994: 455-462.
- Peng X., Zhang T., Zhang J. (2015) Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell Tiss Organ* 122: 67-77.
- Phillips R. Kaeppler S. Olhoft P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 5222-5226.
- Phulwaria M., Patel A., Rathore J., Ram K., Shekhawat N. (2014) An improved micropropagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Salvadora oleoides* using RAPD and ISSR markers. *Acta Physiol Plant* 36: 1115-1122.
- Podwyszynska M. (2005) Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. *Journal of fruit and ornamental plant research* 13: 109-122.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- Ramakrishnan M., Ceasar A., Duraipandiyan V., Ignacimuthu S. (2014) Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 119: 183-196.
- Rani V., Raina S. (2000) Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagation plants: A critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 319- 330.
- Rathore M. Chikara J. Mastan S. Rahman H. Anand K. & Shekhawat N. (2011) Assessment of Genetic Stability and Instability of Tissue Culture-Propagated Plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR Markers. *Appl Biochem Biotechnol* 165:1356–1365.
- Ravindra N., Ramesh S., Gupta M., Jhang T., Shukla A., Darokar M., Kulkarni R. (2012) Evaluation of Somaclonal Variation for Genetic Improvement of Patchouli (*Pogostemon patchouli*), an Exclusively Vegetatively Propagated Aromatic Plant. *J. Crop Sci Biotech.* 15 (1): 33-39.
- Rawat J., Rawat B., Mehrotra S., Chandra A., Nautiyal S. (2013) ISSR and RAPD bases evaluation of genetic fidelity and active ingredient analysis of regenerated plants of *Picrorhiza kurroa*. *Acta Physiol Plant.* 35 1797-1805.
- Razaq M., Heikrujam M., Chetri S., Agrawal V. (2012) *In vitro* clonal propagation and genetic fidelity of the regenerants of *Spilanthes calva* DC. using RAPD and ISSR marker. *Physiol Mol Bio Plants* 19 (2): 251-260.
- Regalado J., Carmona E., Castro P., Moreno R., Gil J., Encina C. (2015) Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 122: 31-44.
- Robins R., Payne J., Rhodes M. (1986) Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*; I. Growth and quinolone alkaloid production. *Planta medica* 52 (3): 220-226.
- Rodrigues P. Tulmann A. Cassieri P. Mendes B. (1998) Influence of the number on subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). *Acta Hort* 490: 469-473.

- Ruffoni B., Savona M. (2013) Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. *Horticulture Environment and Biotechnology* 54 (3):191-205.
- Saha S., Roy., Sengupta Ch., Ghosp P. (2014) Micropropagation and analysis of genetic stability in regenerated plantlets of *Ocimum canum* Sims. *Ind J Plant Physiol* 19 (2) 174-183.
- Schmauder H, Groger D, Koblitz H, Koblitz D (1985) Shikimate pathway activity in shake and fermenter cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 4 (5): 233-236.
- Sharma M., Verma R., Singh A. Batra A. (2014) Assessment of clonal fidelity of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill “in vitro” plantlets by ISSR molecular markers. *SpringerPlus* 3:400
- Sheidai M., Aminpoor H., Noormohammadi Z., Farahani F. (2008) RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*. 52 (2):3007-311.
- Shen X., Chen J., Kane M., Henry R. (2007) Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 91: 21-27.
- Singh S., Dalal S., Singh R., Dhawan A., Kalia R. (2013) Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 49: 572-583.
- Slazaj B., Sliwinska E., Saluga M., Ronikier M., Bujak J., Slomaka A., Göransson U., Kuta E. (2015) Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 120: 179-190.
- Smulders M., De Klerk G. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*. 63 (2): 137-146.

- Staba J, Chung A (1981) Quinine and quinidine production by Cinchona leaf, root and unorganized cultures. *Phytochemistry* Vol. 20 (11): 2495-2498.
- Takagi H., Sugawara S., Saito T., Tasaki H., Yuanxue L., Kaiyum G., Han D., Godo T., Nakano M. (2011) Plant regeneration via direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in *Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Solereder. *Plant Biotechnol Rep.* 5: 187-195.
- Tang W. (2001) *In vitro* regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports.* 20: 163-168.
- Than M. Majumder A. Pal A. Jha S. (2011) Genomic variations among in vitro regenerated *Bulbophyllum auricomum* Lindl. plants. *Nucleus* 54 (1): 9-17.
- Tiwari J., Chandel P., Gupta S., Gopal J., Singh B., Bhardwaj W. (2013) Analysis of genetic stability of *in vitro* propagated potato microtubers using DNA markers. *Physiol Mol Biol Plants.* 19 (4): 587-595.
- Upadhyay R., Kashyap S., Tiwari K., Singh K., Singh M. (2015) Micropropagation of *Phyllanthus fraternus* Webster (Euphorbiaceae) from field-derived shoot tip explant and assessment of its genetic fidelity. *Braz. J. Bot.* DOI 10.1007/s40415-015-0171-9
- Varsheney A., Anis M. (2013) Evaluation of clonal integrity in desert date tree (*Balanites aegyptiaca* Del.) by inter-simple sequence repeat marker assay. *Acta Physiol Plant* 35: 2559-2565.
- Varsheney A., Anis M., Aref M. (2013) Potential role of cytokinin–auxin synergism, antioxidant enzymes activities and appraisal of genetic stability in *Dianthus caryophyllus* L.—an important cut flower crop. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 49: 166-174.
- Vysotskaya L., Aval'baev A., Yuldashew R., Shakirova F., Veselov S., Kudoyarova G. (2010) Regulation of cytokinin oxidase activity as a factor affecting the content of cytokinins. *Russian Journal of Plant physiology.* 57 (4): 494-500.

- Walton N, Parr A, Robins R, Rhodes M (1987) Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports*, 6 (2):118-121.
- Wang C., Tian M. (2014) Callus- median and direct protocorm-like body formation of *Bletilla striata* and assessment of clonal fidelity using ISSR markers. *Acta Physiol Plant*. 36:2321-2330.
- Wang Y., Wang F., Zhai H., Liu Q. (2007) Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Scientia Horticulturae*. 111:173-178.
- Wijnsma R, Go J, van Weerden I, Harkes P, Verpoorte R, BaerheimSvendsen A (1985) Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona spec*. *Plant Cell Reports* 4(5): 241-244.
- Xi M., Sun L., Qiu s., Liu J., Xu J., Shi J. (2012) *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep* 31: 1043-1051
- Yin Z., Zhao B., Bi W., Chen L., Wang Q. (2013) Direct shoot regeneration from basal leaf segments of Lilium and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. 49: 333-342.
- Zhang M. Wang H., Dong Z., Qi B., Xu K., Liu B. (2010) Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. *Plant Cell Rep*. 29: 51-59.

Apéndice del capítulo 2

Apéndice 1

Tablas: Índice de similitud de *Jaccard*. **D.** Explantos cultivados en medio B5 + [0.2 mg/l de Kin - 1.0 mg/l de 2,4-D]. **E.** Explantos cultivados en medio B5 + [5.0 mg/l de BAP - 1.0 mg/l de 2,4-D]. **F.** Explantos cultivados en medio B5 + [1.0 mg/l de BAP - 2.0 mg/l de 2,4-D]

D	D1	D2	D3	TD1	TD2	TD3
D	1	1.00	0.97	0.95	1.00	1.00
D1		1	0.97	0.95	1.00	1.00
D2			1	0.91	0.97	0.97
D3				1	0.95	0.95
TD1					1	1.00
TD2						1
TD3						

E	E1	E2	E3	TE1	TE2	TE3
E	1	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00
E1		1	1.00	0.97	1.00	1.00
E2			1	0.97	1.00	1.00
E3				1	0.97	0.97
TE1					1	1.00
TE2						1
TE3						

F	F1	F2	F3	TF1	TF2	TF3
F	1	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00
F1		1	1.00	0.98	1.00	1.00
F2			1	0.98	1.00	1.00
F3				1	0.98	0.98
TF1					1	1.00
TF2						1
TF3						

CAPITULO 3

**Conservación *in vitro* de *Cinchona officinalis*: crecimiento limitado y
crioconservación de segmentos nodales y yemas.**

RESUMEN

Segmentos nodales y yemas de plántulas de *Cinchona officinalis* cultivadas *in vitro*, fueron conservadas limitando su crecimiento y en nitrógeno líquido (crioconservadas). Para la conservación a través de la limitación el crecimiento se cultivaron segmentos nodales en medio MS y B5 en tres concentraciones (25, 50 y 100%) y en medio B5 suplementado con agentes osmóticos como el manitol, sorbitol y sacarosa en diferentes concentraciones (2, 4 y 8%). Los cultivos se mantuvieron por 12 meses sin subcultivos. Para la crioconservación se usaron yemas aplicando los métodos crioprotectores de encapsulación-deshidratación y vitrificación. En la conservación limitando el crecimiento (12 meses de almacenamiento), se logró un lento crecimiento y un mayor porcentaje de sobrevivencia en medio B5 más manitol. Aunque en menor porcentaje también se observaron dichas respuestas el medio MS al 100% siendo, también, efectivo para conservar los explantos. Tras la crioconservación en NL el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo en los explantos que no fueron tratados (control), seguido por el método de encapsulación-deshidratación.

ABREVIATURAS

MS	Medio Murashige and Skoog (1962)
B5	Medio Gamborg et al. (1968)
DMSO	Dimetil sulfóxido
CaCl ₂	Cloruro de calcio
PVS2	Plant vitrification solution 2 (Sakai et al. 1990)
NL	Nitrógeno líquido

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Cinchona* y, entre estas, *Cinchona officinalis* (Madsen 2002; Garmendia 2005) al igual que muchas otras especies de importancia medicinal (Krishnan et al. 2011; Mohanty et al. 2013) se están viendo afectadas por causas como el cambio climático y la modificación del ecosistema. Esto puede estar provocando erosión genética (Rivera et al. 2008) y disminución de las poblaciones naturales, haciendo que las que las especies se conviertan en vulnerables o amenazadas (Holobiuc et al. 2009; Krishnan et al. 2011),

peligro la permanencia en su hábitat natural. La conservación de las especies vegetales requiere de un enfoque integrado y complementario de las estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* (Holobiuc et al. 2009; Pence 2010). La conservación *in situ*, por sí sola puede no ser suficiente para mantener especies que se encuentran amenazadas (Sarasan 2010; Reed et al. 2011) y no siempre son aplicables o adecuadas para muchas especies debido a su naturaleza o estado de amenaza (Pence 2010). La conservación *in situ* requiere de grandes espacios naturales, mano de obra e implica la participación e interacción de varias disciplinas como la ecología, el manejo de recursos naturales, la genética, entre otras (Radhamani & Sivaraj 2013). La conservación *ex situ* tiene como fin preservar la diversidad genética (Sen-Rong & Ming-Hua 2012) manteniendo muestras de plantas en espacios fuera de su hábitat. Entre las formas más comunes de conservación *ex situ* están los jardines botánicos, bancos de semillas, bancos de ADN, crioconservación, cultivos de tejidos *in vitro* (Holobiuc et al. 2009; Paunescu 2009; Shahzad & Saeed 2013; Radhamani & Sivaraj 2013). Para conservar germoplasma *ex situ*, el método que usualmente se aplica es el almacenamiento de semillas (Cruz et al. 2013). Sin embargo este no es adaptable para algunos genotipos (Reed et al. 2011; Cruz et al. 2013; Rajasekharan & Sahijram 2015) que se propagan vegetativamente o por la rápida pérdida de viabilidad de las semillas durante el proceso de desecación (Levitus et al. 2011).

Una alternativa válida para las especies de las cuales no es posible conservar semillas son los bancos de cultivos *in vitro* (Hunter 1986; Cruz et al. 2013). Las ventajas de aplicar esta biotecnología con fines de conservación son, entre otras: i. Debido a la poca cantidad de material vegetal necesario producen un bajo impacto en las poblaciones naturales (Reed et al. 2013b), ii. En la mayoría de casos mantiene la estabilidad genética, iii. Pueden requerir de pocos recursos económicos (Bekheet 2002; Gopal et al. 2002; Paunescu 2009; Bekheet 2011; Reed et al. 2013a), y iv. Pueden desarrollarse, con base en el principio de regeneración, a partir de varios tejidos organizados o no organizados tales como: semillas, polen, yemas, meristemas, tejidos, células, embriones somáticos, callos entre otros (Paunescu 2009; Engelmann 2011; Reed et al. 2011).

Por tanto las técnicas de cultivo *in vitro* se han convertido en una alternativa útil para la conservación, siguiendo dos vías básicas:

- 1) Crecimiento limitado, éste se logra modificando las condiciones que influyen directamente sobre el crecimiento de los explantos y el número de subcultivos necesarios (Marino et al. 2010; Cruz et al. 2013; Rajasekharan & Sahijram 2015). El resultado de la modificación de cada factor, dependerá de la especie, del tipo de explanto y de su estado fisiológico (Panescu, 2009; Radhamani & Sivaraj 2013; Li et al. 2014). Entre las modificaciones utilizadas están: disminución o eliminación de los reguladores de crecimiento, modificación de la interacción de luz-temperatura, reducción de las fuentes de carbono o sales minerales, adición de compuestos osmóticos y aplicación de retardantes del crecimiento, entre otros (Reed et al. 2004; Sarkar et al. 2005; Engelmann 2011). Se reportan con mayor frecuencia: i. La disminución de temperatura (Gopal et al. 2002; Gonçalves & Romano, 2007; Catana et al. 2010; Marino et al. 2010; Capuana & Di Leonardo 2013; Gashi et al. 2015), ii. La modificación de los nutrientes del medio de cultivo (Taylor & Dukic 1993; Akdemir et al. 2013; Nogueira et al. 2014; Mendonça et al. 2015) y iii. La adición de agentes osmóticos (Marino et al. 1993; Oddo et al. 2002; Marino et al. 2010; Lata et al., 2010; Leva et al. 2013; Nogueira et al. 2014).

La reducción de las concentraciones de componentes del medio de cultivo como sales, vitaminas, y sacarosa favorece a la conservación de tejidos *in vitro* y las respuestas de las plantas frente a la modificación de los componentes del medio, puede variar debido a la diversidad genética de las plantas (Reed et al. 2013b). Las sales minerales proporcionan elementos esenciales que tienen influencia directa en el metabolismo de los tejidos participando en los procesos de activación enzimas, cumpliendo funciones estructurales, energéticas, etc. (Smeekens 2000; Leva et al. 2013). Al existir una disminución de la concentración de los componentes del medio se ocasiona una reducción del metabolismo (Catana et al. 2010; Gashi et al. 2015). Tradicionalmente una de las formulaciones más completas para el crecimiento de tejidos *in vitro* ha sido el medio Murashige and Skoog (1962), éste se caracteriza por la mezcla de sales y en especial por el elevado contenido de nitrógeno y sus complementos vitamínicos. Por otra parte, el medio Gamborg et al. (1968), que contiene una menor concentración de sales minerales que el medio MS, ha sido también utilizado en el cultivo de varias especies de *Cinchona* (Koblitz et al. 1983; Wijnsma et al. 1985; Allan and Scragg 1986; Khouri et al. 1986; Walton et al. 1987; Giroud et al. 1991; Geerlings et al. 1999; Armijos & Pérez en publicación).

Por su parte, la adición al medio de cultivo de agentes osmóticos u osmolitos como el manitol, sorbitol y sacarosa, usados solos o en combinación con bajas temperaturas, han demostrado ser también eficientes para prologar los cultivos y evitar los cambios a medios frescos (Marino et al. 2010; Nogueira et al. 2014). La aplicación en concentraciones de 3-9 w/v influyen directamente en el crecimiento y pueden tener un efecto sinérgico en el retraso del crecimiento al combinarlo con bajas temperaturas (Rajasekharan & Sahijram 2015). El manitol y el sorbitol, son alcoholes-azúcares y de acuerdo a su estructura química pertenecen al grupo de los monosacáridos hidrogenados (Billaux et al., 1991), los cuales son absorbidos lentamente y metabolizados en ocasiones por los tejidos de las plantas (Oddo et al. 2002; Matallebi-Azar et al. 2013). Estos han sido usados con frecuencia como agentes osmóticos para inducir estrés o inhibir el crecimiento de varias especies durante el cultivo *in vitro*, a través de la modificación del potencial hídrico. Estos agentes provocan un déficit o baja disponibilidad de agua, provocando una deficiente absorción de agua por los tejidos (Cha-um et al. 2009) y asimilación de elementos minerales, entre ellos el boro (George et al. 2008). Estos azúcares en muchas ocasiones también son utilizados como una alternativa de carbohidratos (García et al. 2002), siendo el aprovechamiento del manitol como fotoasimilado mejor que la sacarosa, debido a que es más altamente reducido, por los tejidos de las plantas que los producen (Pharr et al. 1995). Por su parte la sacarosa es un carbohidrato que actúa como fuente de carbono (Mendoza et al. 2015) y como regulador osmótico ya que reduce el potencial hídrico y actúa como retardante del crecimiento a causa del estrés osmótico (Agrawal et al. 2010; Silva & Scherwinski 2011). Por lo tanto la modificación de los componentes del medio y la adición de agentes osmóticos provocan una reducción en el metabolismo de los tejidos, esto limita el crecimiento durante el periodo de almacenamiento (Shao et al. 2008).

- 2) Crioconservación de tejidos cultivados *in vitro*, es la paralización del crecimiento por periodos indefinidos (Paunescu 2009; Khoddamzadeh et al. 2011; Ai et. 2011; Reed et al., 2011; Bekheet 2011; Sen-Rong & Ming-Hua 2012; Cruz et al. 2013). Permite mantener células, tejidos y órganos a bajas temperaturas, generalmente usando nitrógeno líquido (NL) (-196°C) o nitrógeno en estado de vapor (-140 °C) (Paunescu 2009). A diferencia de los métodos anteriormente mencionados, a estas temperaturas los tejidos detienen el

metabolismo, permitiendo ser conservados por largos periodos y a bajos costos (Bajaj 1988; Engelmann 2004; Krishnan et al. 2011). La crioconservación se ha venido aplicando de forma limitada a las especies con semillas recalcitrantes y de forma rutinaria en tratamiento de muestras biológicas (Engelmann 2011). En todos los procesos de crioconservación la eliminación del agua juega un papel fundamental en la prevención de la congelación, daños y mantenimiento de la viabilidad luego de descongelación del material vegetal (Cruz et al. 2013). Los protocolos de crioconservación difieren en los mecanismos físicos: Un grupo comprende aquellos donde se somete a los tejidos a deshidratación paralela a la congelación. En éstos, los protocolos clásicos o de deshidratación, se realiza la crioprotección celular mediante el uso soluciones crioprotectoras seguido de enfriamiento lento, para finalmente ser congelados en NL (Engelmann 2011).

El otro grupo corresponde a los procesos basados en vitrificación para permitir la transición del agua de las células o tejido a una fase amorfa impidiendo la formación de cristales de hielo (Rivera et al. 2008; Cruz et al. 2013). La vitrificación implica el tratamiento de las muestras con sustancias crioprotectoras concentradas como el PVS (Bekheet 2011; Sen-Rong & Ming-Hua 2012).

La combinación de los protocolos antes mencionados han originado nuevas técnicas como la encapsulación-deshidratación, que combinan procedimientos, la encapsulación de los explantes en cuentas de alginato, previamente cultivados *in vitro* y luego la deshidratación de los explantes por productos químicos o por corrientes de aire previo a la congelación en nitrógeno líquido (Engelmann 2004; Sakai & Engelmann 2007; Engelmann 2011).

Por tanto la aplicación de estas herramientas biotecnológicas con fines de conservación se justifican para proteger la diversidad genética de las especies (Mohanty et al. 2013; San José et al. 2014). En este trabajo se evaluará la efectividad de la modificación del medio de cultivo y la adición de agentes osmótico en la conservación *in vitro* para limitar el crecimiento y del nitrógeno líquido (NL) (-196°C) en la conservación a largo plazo de explantos de *C. officinalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la conservación de germoplasma de *Cinchona officinalis in vitro*, se partió de segmentos nodales y yemas de plántulas obtenidas de germinación de semillas, de 4 meses de edad, las semillas fueron procedentes del sector Aguarango (Vilcabamba). El protocolo para la introducción y germinación de las semillas es el descrito por Armijos & Pérez (en publicación).

Conservación *in vitro*

Crecimiento limitado: Con el propósito de reducir el crecimiento y mantener viables los explantos, se modificaron: i. condiciones nutritivas (sales minerales, fuente de carbono y vitaminas) y ii: condiciones osmóticas. En ambos casos se partió de segmentos nodales 0.7 - 2 cm.

- i. Condiciones nutritivas: Los segmentos nodales fueron cultivados en dos medios de cultivo: Medio Gamborg (B5) y medio Murashige and Skoog (MS), cada uno con tres diferentes concentraciones de sales, vitaminas y sacarosa: 25 %, 50% y 100%, dando un total de 6 medios de cultivo.
- ii. Condiciones osmóticas: Se cultivaron los explantes en medio B5 con vitaminas y suplementado con tres fuentes de carbono o agentes osmóticos: sacarosa, manitol y sorbitol en concentraciones de 2%, 4% y 8 %, dando un total de 9 medios de cultivo con los diferentes osmolitos.

Todos los medios de cultivo fueron solidificados con 0.7% de agar. El pH de los medios fue ajustado a 5.8 ± 0.02 , se autoclavaron a 121°C por 20 min. Todos los explantes fueron expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad con lámparas fluorescentes de 40 Wats, a una temperatura promedio de 23 ± 2 °C y una humedad ambiental de $65 \pm 7\%$.

Crioconservación: Yemas apicales y axilares de plántulas obtenidas de germinación de semillas *in vitro* de aproximadamente 0.3-0.6 cm fueron extraídas bajo un microscopio binocular y en condiciones asépticas, para ser puestas en diferentes soluciones crioprotectoras antes del congelamiento en nitrógeno líquido; evaluándose dos métodos: 1) vitrificación y 2)

encapsulación-deshidratación. Las soluciones para ambos casos fueron preparadas en medio MS líquido y semi-sólido, el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.02 .

- i. Vitricación: Las yemas extraídas fueron colocadas en papel filtro sumergido en medio líquido con 1% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) y mantenidas 2 días a temperatura ambiente previo al almacenamiento. Luego de este periodo se transfirieron a un medio semisólido con 1.2 M de sorbitol y se mantuvieron a temperatura ambiente por 1 día. Posteriormente las yemas se colocaron en crioviales con una solución de 60% de Plant Vitrication Solution 2 (PVS2) por 20 min. [La solución de PVS2 consiste en 30% w/v (3.26 M) de glicerol, 15% w/v (2.42 M) de etilenglicol, 15% w/v (1.9 M) de DMSO y 0.4 M de sacarosa en medio MS (Sakai et al. 1990)]. Luego se lavaron las yemas con una solución de medio de cultivo más 1.2 M de sacarosa (solución de descarga), para colocarlas nuevamente en una solución al 60% de PVS2 refrigerada. El proceso de lavado se realizó 3 veces más. Finalmente se introdujeron en crioviales para ser inmersas en nitrógeno líquido durante 24 horas.
- ii. Encapsulación y deshidratación: Las yemas fueron colocadas en una solución de medio de cultivo MS con 3% (v/v) DMSO más 0,75 M de sacarosa durante dos días. Para proceder a la encapsulación, se colocaron las yemas en una solución de medio de cultivo MS sin calcio más 3% (w/v) de alginato de sodio, en esta solución se mantuvieron por algunos minutos hasta que se sumergen y se empapan de la solución de alginato. Luego las yemas fueron transferidas a una solución de medio MS más 100 nM de CaCl_2 para permitir la solidificación de las cuentas o bolas de alginato; las cuentas luego fueron extraídas para su polimerización. Finalmente se pusieron a desecar en una cabina de flujo laminar durante 60 min. Se colocaron de 8-10 cuentas secas por criovial e inmediatamente se introdujeron en nitrógeno líquido durante 24 horas.

En ambos tratamientos, para cada paso se fueron tomando muestras para comprobar la viabilidad de los tejidos. Así mismo, en ambos tratamientos tras el proceso de crioconservación se procedió a la recuperación de los tejidos sacando los crioviales del nitrógeno líquido, extrayendo los tejidos. Se mantuvieron por unos minutos a temperatura ambiente y se pusieron a baño maría a 45°C por 15 minutos. Los explantos fueron sacados y lavados con la solución de descarga, inicialmente, las yemas se colocaron en medio líquido MS sobre papel filtro para evaluar su viabilidad.

Registro de datos y análisis estadístico

La evaluación del crecimiento limitado se hizo con los datos obtenidos a los 0, 3, 6, 9, 12 meses de cultivo. Se registraron datos para un total de 1125 explantes, de crecimiento del explante (cm), número de brotes, presencia/ausencia y porcentaje de raíces, mortalidad y estado de la planta en función a la coloración, relacionada con la deficiencia de nutrientes, apoyada en la carta de colores Munsell (tabla 1).

Tabla 1 Significancia de coloración según la paleta de colores Munsell (1998).

Código	Característica general	Estado de la planta	
5 GY 5/10	verde (característico de la planta)	Viva	0
5 GY 6/8	verde claro		
2,5 Y 6/8	amarillo		
5 R 5/6	rojo		
7,5 YR 4/4	café	Muerta (necrosis)	1
10 R 3/2	marrón		

Los datos de los explantes provenientes de crioconservación, se analizaron en la etapa de recuperación en función del crecimiento y porcentaje de explantes que sobrevivieron, durante un periodo de 45 días. Para un total de 100 explantes.

El análisis de datos se realizó con el programa *R* versión 3.1.3. (R Development Core Team 2004), usando un modelo lineal (*lm*) para los datos de crecimiento y brotación; y GLM (generalized linear model) usando familia binomial para los datos de ausencia presencia de raíces y sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento limitado

Para evaluar la efectividad de las técnicas de conservación *in vitro* de tejidos se analizó el crecimiento, la formación de brotes, raíces y la sobrevivencia (Marino et al. 2010; Leva et al. 2013; Nogueira et al. 2014); el mejor método será aquel que disminuya la tasa de crecimiento y brotación sin disminuir la sobrevivencia del explante.

Figura 1 Ejemplos del efecto de los diferentes tratamientos sobre el estado de los explantes a los doce meses de almacenamiento. Disminución de componentes en el medio de cultivo **a**. Explantes cultivados en medio B5 al 25%, la producción de nuevos brotes y crecimiento es baja, presencia de tejidos cloróticos en comparación a los explantes cultivados en **b**. Medio MS al 50% donde se observa mayor proliferación de brotes crecimiento en altura, pero con una mayor mortalidad. Medio de cultivo mas agentes osmóticos; **c**. Brotación, crecimiento y mortalidad en los explantes cultivados en medio B5 mas manitol al 2%; **d**. Baja producción de brotes y crecimiento en medio B5 mas sorbitol al 8% y **e**. Baja producción de brotes, mayor crecimiento medio B5 más sacarosa al 4%. 1cm= —

Crecimiento

Figura. 2 Representación de modelo lineal con respecto al crecimiento en las diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **a).** Agentes osmóticos: manitol, sorbitol y sacarosa al 8% **b).** Medios de cultivo MS y B5 al 50%, (Representación de los otros porcentajes se pueden observar los apéndices 1 y 2)

La reducción del crecimiento de los explantes ocurrió en todos los tratamientos, sin embargo el crecimiento fue menor en todas las concentraciones de agentes osmóticos en comparación con el medio de cultivo (Fig. 1). Estadísticamente en el grupo de los agentes osmóticos y concentraciones no existieron diferencias significativas (Tabla 2), sin embargo la influencia del manitol, favoreció la reducción del crecimiento (Fig. 2a).

Tabla 2. Resumen de análisis, usando distribución regresión lineal (lm), para el crecimiento de explantos como respuesta al tipo y concentración de medio de cultivo; y tiempo de cultivo; tipo y concentración de agente osmótico; y tiempo de cultivo.

Factor	Estimado	Error estándar	Pr (< t)
Agentes osmóticos			
Sacarosa	1.61	0.04	<2e-16 ***
Manitol	-0.74	0.03	<2e-16 ***
Sorbitol	-0.48	0.03	<2e-16 ***
Concentración	-0.05	0.03	<2e-16 ***
Tiempo	0.37	0.01	<2e-16 ***
Medio de cultivo			
Tiempo	0.63	0.02	<2e-16 ***
Medio B5	0.77	0.08	<2e-16 ***
Medio MS	0.11	0.05	0.0226 *
Concentración	0.00	0.00	0.4434

Los agentes osmóticos redujeron el crecimiento en los explantos, con una influencia leve del manitol, seguido por las diferentes concentraciones del medio MS. La presencia de osmolitos o agentes osmóticos como el manitol, sorbitol o sacarosa en altas concentraciones pueden reducir el crecimiento en tejidos por estrés osmótico tal como se ha descrito en papa, donde el manitol y la sacarosa usados de forma combinada redujeron el crecimiento (Gopal & Chauhan 2010).

Varias publicaciones mencionan que otro de los factores importantes para un lento crecimiento durante la conservación, es la reducción de los componentes del medio de cultivo, principalmente de las sales minerales, debido a la baja disponibilidad de nutrientes a los tejidos (Taylor & Dukic 1993; Akdemir et al. 2013; Nogueira et al. 2014). En caña de azúcar lograron controlar el crecimiento en medio MS a la mitad de su concentración con la adición de 3% de sorbitol (Nogueira et al. 2014). Por otra parte, *Lilium* cultivado en medio diluido hasta ¼ de su concentración (25%) más 9% de sacarosa se redujo el crecimiento de brotes y se pudieron conservar durante 28 meses (Bonnier & Van 1997).

El medio MS tiene un mayor contenido de sales que el medio B5, posiblemente este factor hizo que las altas concentraciones de sales contribuyan a incrementar el potencial osmótico en

el medio (George et al. 2008), provocando que los nutrientes y el agua estén menos disponibles a los tejidos.

Brotación

Figura 3 Representación de modelo lineal con respecto a la brotación de los explantes cultivados en las diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **A.** Agentes osmóticos manitol, sorbitol y sacarosa una concentración del 2% **B.** medios de cultivo MS y B5 a una concentración del 25% (Representación de los otros porcentajes en los apéndices 3 y 4).

La reducción de la formación de nuevos brotes estuvo influida por las diferentes concentraciones de agentes osmóticos (Tabla 3), siendo en el medio B5 más sacarosa donde se observó el menor número de brotes (Fig. 3a). Mientras que, el grupo de los medios de cultivo tuvo un menor efecto sobre la reducción de la brotación, en éste, el medio MS influyó levemente (Fig.3b; tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los análisis, usando distribución regresión lineal (lm), para la brotación de explantos como respuesta al tipo y concentración de medio de cultivo; y tiempo de cultivo; y tipo y concentración de agente osmótico; y tiempo de cultivo.

Factor	Estimado	Error estándar	Pr (< t)
Agentes osmóticos			
Sacarosa	0.97	0.14	1.15e-12 ***
Manitol	-1.60	0.10	<2e-16 ***
Sorbitol	-1.88	0.10	<2e-16 ***
Concentración	0.03	0.03	0.0982 .
Tiempo	1.24	0.02	<2e-16 ***
Medio de cultivo			
Tiempo	1.57	0.04	<2e-16 ***
Medio B5	-1.31	0.16	5.36e-15 ***
Medio MS	0.32	0.11	0.0031 **
Concentración	0.02	0.00	<2e-16 ***

En tejidos de olivo la sacarosa también redujo la proliferación y elongación de brotes, mientras que la mortalidad la incrementó, mientras que el manitol tuvo un efecto contrario (Leva et al. 2013), siendo un factor determinante en la sobrevivencia y crecimiento el tipo y concentración de osmotilo usado. En caña de azúcar, los explantes cultivados en medio con sacarosa produjeron el mayor número de brotes a diferencia del sorbitol y manitol (Nogueira et al. 2014).

Enraizamiento

Figura 4 Porcentaje de formación de raíces en los explantos cultivados en las diferentes concentraciones de agentes osmóticos manitol, sorbitol y sacarosa, evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses.

Otro de los parámetros evaluados fue la presencia de raíces en cada uno de los explantos. Por lo general estas se presentaron con mayor frecuencia en los últimos meses. Aunque estadísticamente no existieron diferencias significativas en las diversas concentraciones de los agentes osmóticos (Tabla 4), el más alto porcentaje de explantes enraizados ocurrió en las concentraciones de sacarosa, de forma casi constante, durante los últimos 8 meses de almacenamiento. Mientras que en presencia de sorbitol (8%) se observó el porcentaje más alto de explantes enraizados a los 12 meses de almacenamiento y, finalmente, en presencia de manitol al 8% dio lugar a bajos porcentajes de enraizamiento (Fig. 4). Según Gopal & Chauhan (2010) el estrés hídrico provocado por la presencia de manitol y sorbitol no estimula el desarrollo de raíces debido a la reducción de agua disponible. En *Prunus armeniaca*, aunque la reducción en el enraizamiento no estuvo influenciada por la osmolaridad del sorbitol, éste sí influyó sobre la longitud de las raíces (Marino et al. 1993). En especies como la papa, el desarrollo de raíces fue bajo cuando se incrementó el contenido de sacarosa (Gopal et al. 2002).

Tabla 4. Resumen de análisis, GLM con distribución binomial, para la presencia de raíces por explantos como respuesta al tipo y concentración de medio de cultivo; y tiempo de cultivo; y tipo y concentración de agente osmótico; y tiempo de cultivo.

Factor	Estimado	Error estándar	Pr (< t)
Agentes osmóticos			
Sacarosa	-4.26	0.32	<2e-16 ***
Manitol	-7.26	0.55	<2e-16 ***
Sorbitol	-4.14	0.25	<2e-16 ***
Concentración	0.29	0.04	9.63e-15 ***
Tiempo	1.22	0.08	<2e-16 ***
Medio de cultivo			
Medio B5	-3.15	0.29	<2e-16 ***
Medio MS	-1.09	0.18	2.99e-09 ***
Concentración	-0.01	0.00	2.99e-09 ***
Tiempo	0.33	0.29	<2e-16 ***

En el caso del grupo de medios de cultivo, hubo mayor proliferación de raíces en el medio B5. Aunque estadísticamente no existen diferencias significativas (tabla 4), levemente es mayor la presencia de raíces en este medio al 25% de concentración. En todas las concentraciones se incrementa con el tiempo y es mayor cuando el porcentaje de nutrientes disminuye (Fig.5). Como mecanismo de sobrevivencia ante el déficit de agua y nutrientes las plantas desarrollan el sistema radical para mejorar la habilidad de la planta en la búsqueda y captura de estos elementos, permitiendo que las plantas se adapten a las condiciones de estrés. Esto se señaló en plantas crecidas de *Triticum aestivum*, en donde la presencia de raíces se muestra en los últimos meses, cuando el déficit de agua es mayor (Volgger et al. 2009).

Figura. 5 Porcentaje de los explantos que forman raíces en las diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluado en 4 tiempos a lo largo de 12 meses.

Sobrevivencia

Finalmente, otro de los parámetros evaluados fue el porcentaje de mortalidad. Ésta se registró en función del estado de la planta de acuerdo a la coloración que los tejidos presentaban (tabla1). Los explantes de color verde, verde claro, amarillo y rojo fueron considerados como explantes vivos o con posibilidades de recuperación, mientras que los tejidos de color café y marrón oscuro se consideraron como explantes muertos.

Figura 6 Porcentaje de explantes muertos debido a las diferentes concentraciones agentes osmóticos: manitol, sorbitol, y sacarosa, evaluado en 4 tiempos a lo largo de 12 meses.

El efecto de los agentes osmóticos sobre el porcentaje de mortalidad de los explantes, fue menor que aquellos cultivados en el medio B5 suplementado con 8% de manitol (Fig. 6) y el porcentaje más alto de mortalidad (60%) se obtuvo en los explantes cultivados en el medio B5 con 2% de sorbitol. Así también el análisis estadístico reflejó que los factores que influyeron en la sobrevivencia de los explantes fueron la concentración de los agentes y presencia de manitol (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de análisis, GLM con distribución binomial, para mortalidad de los explantos como respuesta al tipo y concentración de medio de cultivo; tipo y concentración de agente osmótico; y tiempo de cultivo.

Factor	Estimado	Error estándar	Pr (< t)
Agentes osmóticos			
Sacarosa	-6.16	0.37	<2e-16 ***
Manitol	-0.66	0.20	0.001050 **
Sorbitol	0.63	0.17	0.000147 ***
Concentración	0.05	0.03	0.058014 .
Tiempo	1.03	0.07	<2e-16 ***
Medio de cultivo			
Medio B5	-7.08	0.62	<2e-16 ***
Medio MS	-0.55	0.21	0.00845 **
Concentración	-0.00	0.00	0.03883 *
Tiempo	0.60	0.05	<2e-16 ***

Mientras que el efecto de las distintas concentraciones de medios de cultivo sobre la mortalidad de los explantes, se observó en un menor porcentaje (26%) en aquellos cultivados en medio MS al 100% y el más alto porcentaje de mortalidad (46%) en los cultivados en medio B5 al 50% (Fig.7). Estadísticamente el factor que influyó en la sobrevivencia fue la concentración del medio de cultivo, seguido por el medio MS (Tabla 5).

Figura: 7 Porcentaje de los explantes muertos, cultivados en las diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses.

Por lo tanto, los mayores porcentajes de sobrevivencia a los 12 meses de cultivo, sin subcultivos, se observaron en medio B5 más 8% de manitol, la adición de este osmolito fue eficiente para la inhibición del crecimiento afectando en un bajo porcentaje a la viabilidad de los explantes. Los resultados de otros trabajos demuestran la efectividad del manitol como agente osmótico, sin embargo éstos difieren al presente trabajo con respecto a la concentración y tiempo de almacenamiento registrado para cada especie. En varias especies de Zingiberaceae el periodo máximo de conservación sin subcultivos fue de 12 meses, en medio de cultivo MS a la mitad de su concentración más la adición de bencil adenina y 30 g/l de sacarosa y 20g/l de manitol (Mohanty et al. 2013). En *Drosophyllum lusitanicum* se alcanzó el 100% de sobrevivencia a los 8 meses de cultivo en medio con la adición de 20 g dm^{-3} de manitol y 60 g dm^{-3} de sacarosa (Gonçalves & Romano 2007). Con bajas cantidades de manitol también se incrementó la sobrevivencia y viabilidad de las plantas de *Dioscorea alata* (Borges et al. 2004). El manitol en concentraciones moderadas como un agente osmótico provocó la reducción de crecimiento y mantenimiento de la regeneración de *Dianthus spiculifollus* y *D. glacialis* (Holobiuc et al. 2009). En cultivos de *Olea europaea* resultaron adecuadas concentraciones de hasta 9% de manitol y sacarosa (Rejšková et al.

2007). Mientras que en *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum*, la adición de manitol produjo sobrevivencia entre el 0-50 % de la sobrevivencia de brotes (Silva & Scherwinski 2011).

Por su parte la los explantos cultivados con la adición de las diferentes concentraciones de sacarosa presentaron valores intermedios de mortalidad; por el contrario según Gonçalves & Romano (2007) en *Drosophyllum lusitanicum* el incremento en la concentración de sacarosa permitió la sobrevivencia de los cultivos después de 8 meses de almacenamiento. Así también, la adición de 30g/l de sacarosa como única fuente de carbono permitió entre el 91.3-100% de sobrevivencia de explantes de pistacho (Akdemir et al. 2013).

Mientras que los explantes cultivados en medio más sorbitol presentaron los porcentajes más altos porcentajes de mortalidad; sin embargo en varios trabajos se ha reportado su efecto positivo para la conservación, como en *Podophyllum peltatum*, con adición 2% sorbitol y manitol y una temperatura de 10°C los tejidos presentaron altos porcentaje de sobrevivencia durante 8 meses sin subcultivos (Lata et al. 2010). En *Phoenix dactylifera* el sorbitol a una concentración de 40 g dm⁻³ mantuvo los tejidos conservados durante 6 meses (Bekheet et al. 2002), y en cultivos de palma 40g/l de sorbitol permitió el almacenamiento por un periodo de 6 meses (Bekheet 2011).

La variabilidad de respuestas mencionadas en las distintas especies con respecto al manitol y sorbitol, se pueden deber a que estos compuestos cumplen dos roles uno como agentes osmóticos, limitando la disponibilidad de agua y nutrientes lo cual resulta en un lento crecimiento (Gollagunta et al. 2005; Rejšková et al. 2007; Gopal & Chayhan 2010; Lata et al. 2010; Nogueira et al. 2014) o la muerte de los tejidos (Cordeiro et al. 2014); y en otras especies que producen naturalmente manitol puede resultar que al inicio actúe como un agente osmótico con un efecto menor y luego como una fuente de carbono y energía debido a que se absorben lentamente y se metaboliza con facilidad, por tanto su función en estas especies como agente osmótico es a corto plazo (George et al. 2008). Esto ha sido observado en el cultivo de *Olea europea* con un significativo incremento del crecimiento y proliferación de brotes (García et al. 2002; Conde et al. 2011). Así también, el tipo de agente osmótico y fuente de carbono usado influirá sobre la recuperación posterior de los explantos ya que tendrá un efecto evidente en la tasa de crecimiento (Gollagunta et al. 2005).

Por su parte la modificación de la concentración de los componentes del medio de cultivo también influyó en la sobrevivencia y otras respuestas de *C. officinalis*, en este caso fue el medio MS. Resultados similares ocurrieron en explantos de *Piper aduncum* y *P. hispidinervum* cultivados en medio MS al 100% con la adición de sacarosa entre 1 a 3%, pero durante un periodo de conservación de 4 meses (Silva & Scherwinski 2011). Mientras que en caña de azúcar el porcentaje de sobrevivencia fue mayor en medio MS diluido a la mitad de su concentración de sales y menor porcentaje de sobrevivencia en MS al 100% de su concentración (Nogueira et al. 2014).

La reducción de las sales minerales del medio de cultivo a $\frac{1}{4}$ y a $\frac{1}{10}$ permitió la conservación de explantos de *Gypsophilla petraea* y *Dianthus callizanus* respectivamente, durante 12 meses sin necesidad de repicados (Catana et al. 2010).

Durante el proceso de conservación, los explantes que sobrevivieron a la adición de agentes osmóticos y a la reducción de componentes en los medio de cultivo presentaron diversas coloraciones, que fueron caracterizadas (Tabla 1). Se observaron colores rojizos y colores amarillentos con signos de clorosis, posiblemente a causa de la deficiencia de nutrientes, que dejaron de observarse a los 12 meses de pasar los explantes a un medio fresco. En *Podophyllum peltatum* con la adición de 2% sorbitol y manitol en se generaron brotes débiles con signos de clorosis los cuales se recuperaron tras finalizar proceso de conservación (Lata et al. 2010). La presencia de coloración, ya sea verde o amarillenta (clorótica), por lo general demuestra que existen signos de actividad metabólica evidenciada por la presencia de clorofila (García et al. 2002). El contenido del pigmento clorofila ha sido utilizado como un indicador de actividad metabólica en *Castanea sativa* durante el proceso de conservación (Capuana & Di Lonardo 2013), siendo un indicador asociado a la vitalidad de los tejidos.

Por el contrario los explantes muertos se caracterizaron por la presencia de hojas color cafés oscuras, marrón, con presencia de necrosis, esto debido a la deficiencia de nutrientes en el medio B5 en bajas concentraciones, afectando principalmente a las hojas; similares síntomas se presentaron en la evaluación de la deficiencia de nutrientes en varios genotipos de pera (Reed et al., 2013b).

En resumen, la sobrevivencia, crecimiento y producción de los explantos fue alta en los tres primeros meses en todos los medios de cultivo, debido al efecto del medio fresco, eliminación de la dominancia apical y sistema radicular. Así ocurrió en *Cinchona ledgeriana* que durante los primeros 45 días de cultivo, el número de yemas axilares incrementó debido a la presencia de manitol (Hunter 1986). Para los siguientes meses la producción sigue incrementando pero en menor medida debido a la reducción de nutrientes y presencia de agentes osmóticos. Los agentes osmóticos lograron reducir en mayor medida que el efecto de la dilución de los medios de cultivo y con mejores porcentajes de sobrevivencia y recuperación, efectos similares a los observados en *Mandevilla moricandiana* (Cordeiro et al. 2014). Mientras que la producción de raíces fue más alta en los últimos meses principalmente en presencia de sacarosa.

Crioconservación:

Yemas axilares y apicales fueron utilizadas para establecer un protocolo de crioconservación utilizando los métodos de vitrificación y encapsulación-deshidratación como procesos previos a la crioconservación. Estos procesos previos o de crioprotección son necesarios para prevenir los daños asociados a la congelación y, así mejorar los porcentajes de sobrevivencia tras la crioconservación (Bajaj 1998). Los datos de crecimiento y sobrevivencia se presentan a continuación:

Figura 8: Crecimiento (medias y desviación estándar) de los explantes en el proceso de recuperación evaluado en un periodo de 45 días, tras ser introducidos en NL durante 24 horas.

De acuerdo al análisis existieron diferencias significativas en el proceso de recuperación en la exposición a ambos tratamientos (Tabla 6). Para el proceso de encapsulación–deshidratación se registró el menor crecimiento de los explantes tras ser crioconservados, seguido de las yemas provenientes del tratamiento de vitrificación (Fig.8).

Tabla 6. Resumen de análisis, usando distribución regresión lineal (lm), para crecimiento y mortalidad de explantos tratados con los procesos de encapsulación-deshidratación y vitrificación, tras la recuperación de la congelación en NL.

Factor	Estimado	Error estándar	Pr (< t)
Crecimiento			
Encapsulación-deshidratación	0.05	0.02	0.0478 *
Vitrificación	-0.12	0.03	6.55e-06 ***
Tiempo	0.04	0.00	9.63e-15 ***
Control	0.38	0.02	<2e-16 ***
Mortalidad			
Encapsulación-deshidratación	9.5	3.34	0.004690 **
Vitrificación	32.5	3.34	<2e-16 ***
Tiempo	0.63	0.08	4.1e-14 ***
Control	-11.2	2.99	0.000201 ***

Con respecto a la mortalidad de los explantos tras la congelación en NL, la recuperación se evaluó en un periodo de 45 días. Aquellos que no estuvieron tratados con crioprotectores tuvieron un menor porcentaje de mortalidad (4%), seguido por aquellos que estuvieron sometidos a encapsulación-deshidratación presentando un porcentaje de mortalidad un 24%, finalmente, aquellos explantes que estuvieron tratados con el método de vitrificación tuvieron un 58% de mortalidad (Fig. 9). Resultando ser más efectivo no tratar a los explantos con crioprotectores previo la congelación, esta respuesta puede deberse a que los explantes estuvieron cultivados durante su crecimiento en medio suplementado con sacarosa al 2%. La sacarosa en varios estudios ha resultado ser un efectivo crioprotector (Bajaj 1988; Bekheet 2011). Se puede considerar también la encapsulación-deshidratación de los tejidos con el uso de DMSO y sacarosa, con lo cual se logra que los explantes sobrevivan en mayor porcentaje a la crioconservación; efectos similares a los obtenidos en *Rabdosia rubescens* (Ai et al. 2012). A diferencia de la vitrificación, la encapsulación-deshidratación protege a los materiales intracelulares de los daños provocados por la cristalización del agua al congelarse. Para lograr la deshidratación de los tejidos y asegurar un alto porcentaje de sobrevivencia en la encapsulación-deshidratación es importante que previo a la encapsulación el medio contenga una alta concentración de un azúcar, como la sacarosa (Gonzalez et al. 2008), ya que ésta es

acumulada en la célula y es parcialmente metabolizada (Barraco et al. 2014). También es importante asegurar el mantener un contenido de agua entre el 10-20% para la posterior recuperación (Gonzalez et al. 2008).

Figura 9. Porcentaje de explantes (medias y desviación estándar) muertos en el proceso de recuperación en un periodo de 45 días, tras ser introducidos en NL durante 24 horas.

Por tanto, el no tratar a los tejidos y la técnica de encapsulación-deshidratación resultaron ser efectivas cuando se adicionó una fuente de carbono en el proceso previo a la congelación, tal como ocurrió en *Morus alba* donde la adición de sacarosa resultó eficiente para promover el rebrote de los explantos tras la congelación, sin embargo, también un buen porcentaje de sobrevivencia y rebrote se obtuvo con el proceso de vitrificación (Arias et al. 2012). En otras especies la encapsulación-deshidratación también ha resultado ser eficiente. En *Citrus* este mismo método ha permitido la recuperación de los tejidos entre 75-95% (Gonzalez et al. 2008), en *Rabdosia rubescens*, se recuperaron el 85% de meristemas crioconservados (Ai et al. 2012) y en *Phalaenopsis bellina* se alcanzó un máximo de sobrevivencia de 47% con un 30 % de rebrote luego de la descongelación utilizando la encapsulación-deshidratación como método crioprotector (Khoddamzadeh et al. 2011). En variedades de pistacho tuvieron en

entre el 5-18% de recuperación (Adkemir et al. 2013) y en ápices de manzana lograron un 57% de recuperación con un 100% de rebrote (Li et al. 2014).

Otro aspecto que se debe considerar es el tipo y tamaño del explante utilizado lo cual influye considerablemente en la recuperación. En este estudio fueron yemas apicales y axilares que contenía en su interior al meristemas protegidos por los primordios, tal resultado con respecto al tamaño del explanto también fue observado en manzana (Li et al., 2014).

Por su parte, la vitrificación no fue efectiva como sistema crioprotector en explantos de *C. officinalis*, obteniendo un bajo porcentaje de explantes vivos, algo parecido ocurrió en callos de *Cinchona ledgeriana* que fueron pre-cultivados por 3 días en medio con 5% PVP y luego tratados con crioprotectantes y finalmente sumergidos en nitrógeno líquido, no sobrevivieron luego del descongelamiento (Hunter 1986). La vitrificación provoca viscosidad del contenido intracelular e inhibe el reordenamiento molecular del agua (Gonzalez et al. 2008). Ha sido aplicado a meristemas y embriones somáticos (Sen-Rong & Ming-Hua 2012; Le Bras et al. 2013). La exposición directa de los tejidos a los crioprotectores durante la vitrificación es crítica, ya que pueden resultar tóxicos, a causa de sus altas concentraciones y tiempo de exposición (Gonzalez et al. 2008; Le Bras et al. 2013). La exposición a PVS2 en el proceso de vitrificación permitió la sobrevivencia de alrededor del 63.8% de callos embriogénicos de *Anemarrhena asphodeliodes* tras la congelación; sin embargo estos presentaron bajos porcentajes de rebrote (Sen-Rong & Ming-Hua 2012). Según el estudio realizado por Le Bras et al. (2013) la inmersión en PVS2 usando gota-vitrificación resultó más efectiva en la recuperación (86%) de yemas axilares de *Rosa chinensis*, que la encapsulación deshidratación (60% de recuperación). Así también ápices de brotes de *Teucrium polium* pudieron recuperarse en mayor porcentaje cuando eran crioprotegidas a través de vitrificación y un menor porcentaje de recuperación con la encapsulación-deshidratación (Rabba`a et al. 2012).

En resumen el tratamiento control seguido por la encapsulación-deshidratación permitieron un mayor porcentaje de sobrevivencia a la crioconservación de los explantes, y el crecimiento fue similar en los tres grupos. La aplicación de los diferentes métodos de crioprotección dependería de la especie y el tipo de explanto que se use, preliminarmente se concluye que el uso de yemas favoreció la recuperación y sobrevivencia.

CONCLUSIONES

Los explantos de *C. officinalis* pueden ser conservados *in vitro* en medios con manitol en concentraciones que vayan del 2-8%. Este agente osmótico resultó ser efectivo para reducir el crecimiento y la brotación, manteniendo altos porcentajes de sobrevivencia tras un periodo de 12 meses de almacenamiento. Tras el periodo de almacenamiento los tejidos pueden recuperarse formando nuevos brotes morfológicamente similares a las plantas de origen. Por su parte, el porcentaje de recuperación tras la crioconservación en NL fue alto cuando los explantes no fueron tratados con crioprotectores, seguido por el método de encapsulación–deshidratación como método crioprotector y el proceso de crioconservación en todos los casos no afectó al crecimiento de los tejidos de *C. officinalis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrawal A., Sanayaima R., Tandon R., Tyagi R. (2010) Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). *Acta Physiol Plant* 32: 703-711.
- Ai P., Lu L., Song J. (2012) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 108:381-387.
- Akdemir H., Süzerer V., Tilkat E., Yildirim H., Onay A., Ozden Y. (2013) *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. *J Plant Biochem. Biotechnol.* 22 (1):43-51.
- Allan EJ, Scragg AH (1986) Comparison of the growth of *Cinchona ledgeriana* Moens suspension cultures in shake flasks and 7 liter air-lift bioreactors. *Biotechnology Letters* 8(9):635-638.
- Arias M., Frattarelli A., Sgueglia A., Condello E., Damiano C., Caboni E. (2012) Cryopreservation of White mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 108: 167-172.

- Bajaj Y. (1988) Cryopreservation and the Retention of Biosynthetic Potential in Cell Cultures of Medicinal and Alkaloid-Producing Plants. In: Bajaj Y. (Ed.). Biotechnology in agriculture and Forestry Vol 4 Medicinal and Aromatic Plants. (pp.168-187). Springer-Verlag, Berlin:
- Barraco G., Sylvestre I., Collin M., escoute J., Lartaud M., Verdeil J., Engelmann F. (2014) Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Protoplasma* 251 77-189.
- Bekheet S. (2011) Chapter 17: *In vitro* Conservation of date palm germplasm. In Jain S., Al-Khayri J., Johnson D. (Eds.) Date Palm Biotechnology (pp.337-360). Springer Science + Business Media B.V.
- Bekheet S., Taha H., Saker M. (2002) *In vitro* long-term storage of date palm. *Biologia Plantarum*. 45 (1) 121-124.
- Billaux M., Flourie B., Jacquemin C., Messing B. (1991) Sugar alcohols. In Marie S., Piggott J. (Eds.) Handbook of sweeteners, (pp. 72-103). Springer Science+Business Media. New York.
- Bonnier F., Van J. (1997) Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant cell tissue organ culture*. 49: 81-87.
- Borges M., Ceiro W., Meneses S., Aguilera N., Vázquez J., Infante Z., Fonseca M. (2004) Regeneration and multiplication of *Discorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 76:87-90.
- Capuana M., Di Lonardo S. (2013) *In vitro* conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 49: 605-610.
- Catana R., Mitoi E., Helepciuc F., Holobiuc I. (2010) *In vitro* conservation under slow growth conditions of two rare plant species from Caryophyllaceae family. *Electronic Journal of Biology*. 6 (4): 86-91.

- Cha-um S., Thadavong S., Kirdmanee Ch. (2009) Effects of mannitol induced osmotic stress on proline accumulation, pigment degradation, photosynthetic abilities and growth characters in C3 rice and C4 sorghum. *Front Agric. China* 3(3): 266-273.
- Conde A., Silva P., Agasse A., Conde C., Gerós H. (2011) Mannitol transport and manitol dehydrogenase activities are coordinated in *Olea europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant Cell Physiol.* 52 (10): 1766-1775.
- Cordeiro S., Simas N., Henriques A., Sato A. (2014) In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation-dehydration of nodal segments. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 50: 326-336.
- Cruz C., González M., Engelmann F. (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2:73-95.
- Engelmann F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro cell.Dev. Biol.-Plant.* 40:427-433.
- Engelmann F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant.* 47:5-16.
- Gamborg O., Miller R., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- García J., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A. (2002) Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 69:95-100.
- Garmendia A. (2005) El Árbol de la Quina (*Cinchona spp.*): Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. Universidad Técnica Particular de Loja, 204 pp.
- Gashi B., Abdullai K., Sota V., Kongjika E. (2015) Micropropagation and *in vitro* conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Physiol Mol Biol Plants.* 21(1):123-136.

- Geerlings A, Hallard D, Martinez A, Lopes I., van der Heijden R, Verpoorte R (1999) Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* “Ledgeriana” hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* 19: 191-196.
- George E., Hall M., De Klerk G. (2008) The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In George E. Hall M., De Klerk G. (Eds.) *Plant propagation by tissue culture* 3rd edn, (pp 115-173). Springer, Netherlands.
- Giroud C, van der Leer T, van der Heijden R, Verpoorte R, Heeremans C, Niessen W, van der Greef J (1991) Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS) analysis of the alkaloids from *Cinchona in vitro* cultures. *Planta Med* 57 (2): 142-148.
- Gollagunta V., Adelberg W., Riek J., Rajapakse N. (2005) Sucrosa in storage media and cultivar effects post-storage regrowth of *in vitro* Hosta propagules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80: 191-199
- Gonçalves S. Romano A. (2007) *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. *Biologia plantarum*. 51 (4): 795-798
- Gonzalez-Arnan M., Panta A., Roca W., Escobar R., Engelmann F. (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant cell Organ Cult.* 92:1-13.
- Gopal J., Chamail A., Sarkar D. (2002) Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. *Potato Research* 45: 23-213.
- Gopal J., Chauhan N. (2010) Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. *Potato Research*. 53:141-149.
- Holobiuc M., Blindu R., Motoi M., Helepciuc F., Cristea V. (2009) The establishment of an *in vitro* gene bank in *Dianthus spiculifolius* Schur and *D. glacialis ssp. gelidus* (Schott

- Nym. et Kotschy) Tutin: I. The initiation of a tissue collection and the characterization of the cultures in minimal growth conditions. *Ann. For. Res.* 52: 117-128.
- Hunter C. (1986) *In vitro* propagation and germplasm storage of *Cinchona*. In Withers L., Alderson P. (Eds.) Plant tissue culture and its agricultural applications. (pp. 291-301) *Butterworths*.
- Kameswara R. (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3 (2): 136-145.
- Khoddamzadeh A., Sinniah U., Lynch P., Kadir M., Kadzimin S., Mahmood M. (2011) Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaeopsis bellina* (Rchb.f) Christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 107:471-481.
- Khouri H, Ibrahim R, Rideau M. (1986) Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Reports* 5 (6): 423-426
- Koblitz H., Koblitz D., Schmauder H., Gröger D. (1983) Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* L. *In vitro* mass propagation through meristem-derived plants. *Plant Cell Reports* 2(2):95-97.
- Krishnan P., Decruse S. Radha R. (2011) Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 47: 110-122.
- Lata H., Moraes R., Bertoni B., Pereira A. (2010) *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum petatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 46:22-27.
- Le Bras C., Le Besnerais P., Hamama L., Grapin A. (2013) Cryopreservation of *ex-vitro*-grown *Rosa chinensis* Old Blush buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* DOI 10.1007/s11240-013-0400-5

- Leva A., Sadeghi H., Petruccelli R. (2013) Carbohydrates Modulate the *in vitro* growth of olive microshoots. I. The analysis of shoot growth and branching patterns. *J Plant Growth Regul* 32: 53-60.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. (2011) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA, Argentina 648pp.
- Li B., Feng Ch., Hu L., Wang M., Chen L., Wang Q. (2014) Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation-dehydration. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. DOI 10.1007/s11627-014-9616-2
- Madsen J. (2002) Historia cultural de la cascarilla de Loja En: Aguirre Z., Madsen J., Cottas E., Balslev H (Eds.), Botánica Austroecuatorial: estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe (pp. 385-399). Ediciones AbyaYala, Quito.
- Marino G., Bertazza G., Magnanini E., Doro A. (1993) Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Planta Cell, Tissue and Organ Culture*. 34: 235-244.
- Marino G., Negri P., Cellini A., Masia A. (2010) Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. *Scientia Horticulturae* 126: 434-440.
- Martín C., Senula A., González I., Acosta A., Joachim E., González M. (2012) Genetic identity of three mint accessions stored by different conservation procedures: field collection, *in vitro* and cryopreservation. *Genet Resour Crop Evol*. 60: 243-249.
- Mendoça D., Luna S., Bettencourt S., Lopes M., Monteiro L., Neves J., Monjardino P., Machado A. (2015) *In vitro* propagation of *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. (Oleaceae) an Azorean endangered endemic plant species. *Acta Physiol Plant* 37:37.
- Mohanty S., Parida R., Sahoo S. Nayak S. (2013). *In Vitro* conservation of nine medicinally and economically important species of Zingiberaceae from Eastern India Proc. Natl. Acad. Sci. DOI 10.1007/s40011-013-0251-1

- Motallebi-Azar A., Kazemiani S., Yarmohamadi F. (2013) Effect of sugar/osmotica Levels on in vitro Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Russian Agricultural Sciences* 39 (2): 112-116.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nogueira G., Pio L., Pasqual M., Amaral A., Scherwinki-Pereira J. (2014) An approach on the in vitro maintenance of sugarcane with views for conservation and monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. DOI 10.1007/s11627-014-9660-y
- Oddo E., Saiano F., Alonzo G., Bellini E. (2002) An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the Oleacea growing in northern Sicily. *Annals of Botany* 90: 239-243.
- Paunescu A. (2009) Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol 14: 4095-4103
- Pence V. (2010) The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin*. 65: 539-547.
- Pharr D., Stoop J., Williamson J., Feusi M., Massel M., Conkling M. (1995) The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in Celery. *Hort Science* 30 (6):1182-1188.
- Rabba`a M., Shibli R., Shatnawi M. (2012) Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 110:371-382.
- Radhamani J., Sivaray N. (2013) Chapter 24: Conservation strategies and management of *Jatropha* germplasm. In Bahadur B., Sujatha M., Carels N. (Eds.) *Jatropha, Challenges for a new energy crop: Vol 2: Genetic Improvement and Biotechnology* (pp.479-500). New York: Springer Science + Business Media.

- Rajasekharan P., Sahijram L. (2015) *In vitro* conservation of plant germplasm. In: Bir Bahadur et al. (Eds.) Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, (pp.417-443). Springer, India.
- Reed B., Engelmann F., Dullo M., Engels J., (2004) Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Vol 7. Handbooks for Genebanks, IPGRI-Roma, 116 pp.
- Reed B., Gupta S., Uchendu E. (2013b) Chapter 5: *In vitro* genebanks for preserving tropical biodiversity. In Normah M., Chin H., Reed B. (Eds.) Conservation of tropical plant species (pp.77-106). Springer Science+ Business Media, New York.
- Reed B., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V. (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 47:1-4.
- Reed B., Wada S., DeNoma J., Niedz R. (2013a) Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant.* 49:343-355.
- Rejšková A., Patková L., Stodulková E., Lipavská H. (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europea* L.) under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Physiology.* 164: 174-184.
- Rivera A., Valbuena R., Hidalgo R., Moreno J. (2008) Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. andigena mediante desecado de tejidos. *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 9(2): 37-44.
- Sakai A. Kobayashi S., Oiyama I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. brasiliensis Tanaka) cooled to -196°C. *J Plant Physiol.* 137: 465-470.
- Sakai A., Engelmann F. (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *CryoLetters* 28 (3) 151-172.
- San José M., Janeiro L., Corredoira E. (2014) Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Germplasm. *Trees.* DOI 10.1007/s00468-014-1133-8

- Sarasan V. (2010) Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bulletin*. 65: 549-554
- Sarkar D., Pandey S., Chanemougasoundhram A., Sud K. (2005) The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 81: 221-227.
- Sen-Rong H., Ming- Hua Y. (2012) A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 109:287-296.
- Shahzad A., Saeed T. (2013) Chapter 12: *In vitro* conservation protocols for some rare medicinal plant species. In Shahid M., Shahzad A., Malik A., Sahai A. (Eds.) Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants (pp. 263-291) Springer Science+Business Media, Dordrecht.
- Shao H., Chu L., Jaleel Ch., Zhao Ch. (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biologics* 331: 215-225.
- Silva T., Scherwinski E. (2011) *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesq. Agropec. bras., Brasilia*. 46 (4): 384-389.
- Smeekens S. (2000) Sugar-induces signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.
- Taylor P., Dukic S. (1993) Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum spp.* hybrid germplasm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 34 217-222.
- Volgger M., Lang I., Oveeka M., Lichtscheidl I. (2010) Plasmolysis and cell wall deposition in wheat root hairs under osmotic stress. *Protoplasma* 243: 51-62.
- Walton N., Parr A., Robins R., Rhodes M. (1987) Toxicity of quinoline alkaloids to cultured *Cinchona ledgeriana* cells. *Plant Cell Reports* 6 (2): 118-121.

Wijnsma R., Go J., van Weerden I., Harkes P., Verpoorte R., BaerheimSvendsen A. (1985)
Anthraquinones as phytoalexins in cell and tissue cultures of *Cinchona* spec. *Plant Cell Reports* 4(5): 241-244.

Apéndices del capítulo 3

Apéndice 1

Figura 1: Representación de modelo lineal con respecto al crecimiento de los explantes medio suplementado con diferentes concentraciones de agentes osmóticos evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **A.** Agentes osmóticos manitol, sorbitol y sacarosa una concentración del 2% **B.** manitol, sorbitol y sacarosa a 4% **C.** manitol, sorbitol y sacarosa a 8%

Figura 2: Representación de modelo lineal con respecto al crecimiento de los explantes en las diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **A.** medios de cultivo MS y B5 a una concentración del 25% **B.** MS y B5 a 50% **C.** MS y B5 a 100%

Figura 3: Representación de modelo lineal con respecto a la brotación de los explantes en diferentes concentraciones de agentes osmóticos evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **A.** Agentes osmóticos manitol, sorbitol y sacarosa una concentración del 2% **B.** Manitol, sorbitol y sacarosa a 4% **C.** Manitol, sorbitol y sacarosa a 8%

Figura 4: Representación de modelo lineal con respecto a la brotación de los explantes en diferentes concentraciones de medio de cultivo B5 y MS evaluados en 4 tiempos a lo largo de 12 meses. **A.** medios de cultivo MS y B5 a una concentración del 25% **B.** MS y B5 a 50% **C.** MS y B5 a 100%

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente trabajo han permitido establecer metodologías para la propagación, determinación de variación somaclonal y conservación *in vitro* de *C. officinalis* dirigidas al manejo y conservación de esta especie amenazada, de interés científico y económico.

- El porcentaje de germinación de las semillas de *C. officinalis* incrementa mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno o lavados con agua.
- Se produce proliferación de brotes de manera directa a partir de segmentos nodales, en medio B5 suplementado con 5.0 mg l⁻¹ BAP en combinación con 3.0 mg l⁻¹ IBA. La misma combinación también se puede utilizar para la regeneración de brotes por vía indirecta.
- Los explantes provenientes de plántulas, puede formar brotes también en un medio libre de hormonas. Que puede ser otra alternativa para la proliferación que reduzca el riesgo de aparición de variación somaclonal en los cultivos.
- Los resultados obtenidos mejoran la propagación de explantos de *Cinchona*, dando una buena alternativa de repoblación eficiente de esta especie con germoplasma genéticamente diverso a partir de la germinación de semillas, con el fin de contrarrestar los problemas de la reproducción y la pérdida de diversidad genética.
- Los resultados presentados sobre la estabilidad genética *in vitro* de *C. officinalis* regenerada mediante brotación directa e indirecta son los primeros reportados en esta especie.
- Considerando la importancia de mantener la estabilidad genética en plantas obtenidas con fines de conservación, el presente trabajo, con el uso de marcadores moleculares ISSR, pudo determinar cuál de los métodos usados para la multiplicación *in vitro* fueron eficientes para permitir la propagación de material vegetal y mantener baja o nula variación genética
- La presencia de la auxina 2,4-D y el número de subcultivos influyeron negativamente sobre la estabilidad genética de los explantes, sin embargo los porcentajes de variación somaclonal fueron bajos.

- Este trabajo sugiere la propagación *in vitro* de *C. officinalis* mediante formas directa o indirecta, pero sin la presencia de 2,4-D, para fines de conservación y reintroducción al medio natural.
- Los explantos de *C. officinalis* pueden ser conservados limitando el crecimiento en medio B5 con manitol en concentraciones que vayan de 2-8%. Este agente osmótico resultó ser efectivo para reducir el crecimiento y brotación, manteniendo elevados porcentajes de sobrevivencia tras un periodo de 12 meses de almacenamiento.
- Los tejidos tras el periodo de almacenamiento pueden recuperarse formando nuevos brotes morfológicamente similares a las plantas de origen.
- Para la crioconservación, el cultivar los explantes en un medio suplementado con sacarosa previo a la congelación resulta ser efectivo para incrementar el porcentaje de sobrevivencia tras el almacenamiento en nitrógeno líquido permitiendo además el crecimiento de los explantos.
- El método de encapsulación–deshidratación también puede ser una alternativa para incrementar el porcentaje de recuperación de los tejidos.
- Por tanto la técnica de cultivo *in vitro* puede ser usada como una alternativa de propagación y conservación de propágulos de *Cinchona officinalis*, siempre y cuando se asegure la estabilidad genética del germoplasma a ser usado con este fin.