

Inducción de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L

Induction of callogenic structures in *in vitro* and *ex vitro* explants of *Cinchona officinalis* L

Andrés Armijos-Montaña^{1,2} 

Marcia Manchay-Loaiza^{1,2*} 

Magaly Yaguana-Arévalo² 

1. Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

2. Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja,
Loja Ecuador

*Autor para correspondencia: marcia.manchay@unl.edu.ec

RECIBIDO: 24/10/2025

ACEPTADO: 18/12/2025

PUBLICADO: 05/01/2026

■ RESUMEN

Cinchona officinalis L., especie emblemática del sur del Ecuador sobreexplotada históricamente y con baja capacidad de regeneración natural, fue objeto del presente estudio en donde se evaluó la desinfección de material vegetal *ex vitro* (invernadero) y, la interacción de auxinas y citoquininas para inducir estructuras callogénicas con material *in vitro* y *ex vitro*. En ambos casos se aplicó un diseño completamente al azar. En la primera fase se probó cuatro concentraciones de NaClO (10-15-20-25 % por 10 minutos), los resultados de mayor control de contaminación fueron con el T3 y T4 con 93 % y 80 % de eficiencia respectivamente, la fenolización del T3 fue del 80 %. En la segunda fase se evaluaron cinco tratamientos de ANA/KIN (0-10 mg L⁻¹ ANA + 0-0.5 mg L⁻¹ KIN) para la obtención de estructuras callogénicas, se inoculó explantes de 1 cm de nervadura central/hojas, se incubaron en oscuridad total por 90 días; los resultados mostraron ser superiores en T1-T4 (76-100 %) con relación al 13-33 % obtenido a partir de material *ex vitro*, la contaminación fue nula (excepto 7 % en T3) en *in vitro*, frente al 60-80 % en *ex vitro*, la rizogénesis en T3-T4 (46-70 raíces/callos *in vitro* vs. 28-33 *ex vitro*). La fenolización elevada (72 % *in vitro*, 92 % *ex vitro*), identificándose como barrera crítica. Se demostró que la combinación de NaClO al 20 %, antioxidantes y balance ANA/KIN (5-10 + 0,5 mg L⁻¹) en *vitroplantas* es eficiente para estimular la callogénesis y micropropagación de cinchona.

Palabras clave: *Cinchona officinalis*, desinfección, callogénesis, micropropagación.

■ ABSTRACT

Cinchona officinalis L., an emblematic species of southern Ecuador that has been historically overexploited and has a low capacity for natural regeneration, was the subject of this study. The study evaluated the disinfection of plant material *ex vitro* (greenhouse) and the interaction of auxins and cytokinins to induce callus-forming structures using both *in vitro* (laboratory) and *ex vitro* material. A completely randomized design was used in both cases. The first phase tested four concentrations of NaClO (10, 15, 20, and 25

% for 10 minutes). The greatest contamination control results were obtained with T3 and T4, with 93 % and 80 % efficiency, respectively. The phenolization rate of T3 was 80 %. In the second phase, five NAA/KIN treatments (0-10 mg L⁻¹ NAA + 0-0.5 mg L⁻¹ KIN) were evaluated for obtaining callus-forming structures. Explants with 1 cm midribs/leaves were inoculated and incubated in total darkness for 90 days. The results showed superiority in T1-T4 (76-100 %) compared to the 13-33 % obtained from *ex vitro* material. Contamination was negligible (except for 7 % in T3) *in vitro*, versus 60-80 % *ex vitro*. Rhizogenesis was higher in T3-T4 (46-70 roots/callus *in vitro* vs. 28-33 *ex vitro*). High phenolic content (72 % *in vitro*, 92 % *ex vitro*) was identified as a critical barrier. The combination of 20 % NaClO, antioxidants, and a balanced NAA/KIN ratio (5–10 ± 0.5 mg L⁻¹) *in vitro* plantlets was shown to be effective in stimulating callus formation and micropropagation of cinchona.

Keywords: *Cinchona officinalis*, disinfection, callus formation, micropropagation.

■ INTRODUCCIÓN

Cinchona officinalis L., especie es una representativa de los valles de Loja, distribuida entre zonas tropicales y ecuatoriales (700 y 2900 m s.n.m.) (Garmendia, 2005). Conocida como cascarilla o quina, posee un valor histórico por sus alcaloides presentes en su corteza y raíz (quinidina y quinina), compuestos químicos utilizados históricamente en el tratamiento de la malaria y el paludismo (Arbizu et al., 2021; Medina y Catari, 2022; Parveen et al., 2024). La intensa explotación a la que fue sometida ocasionó impactos severos sobre sus poblaciones naturales, que actualmente presentan bajas tasas de regeneración natural (Eras-Guamán et al., 2020), y se restringen a relictos boscosos dispersos (Caraguay et al., 2016; González et al., 2018), generalmente ubicados en lugares irregulares con acceso limitado y suelos degradados (López, 2016; Romero, 2015). A pesar de su capacidad de producir semillas, sus bajos niveles de germinación mediante métodos de propagación tradicionales han mostrado ser ineficientes para la producción masiva (Serrano et al., 2019; Sánchez et al., 2023).

Ante ello, la biotecnología mediante el cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa clave para restablecer la funcionalidad ecológica y conservación de especies amenazadas como la cascarilla (López, 2019; Oran et al., 2022). La obtención de plántulas en menor tiempo, libres de patógenos representa una estrategia fundamental (Duque, 2010; Levitus et al., 2010). No obstante, en

la organogénesis indirecta es necesario establecer protocolos que minimicen la variación somaclonal y aseguren una adecuada formación de las estructuras callogénicas (Armijos-González et al., 2021). Además, el éxito de estas técnicas depende del establecimiento de condiciones asépticas rigurosas especialmente cuando el material vegetal ha estado expuesto o almacenado por periodos prolongados, incrementando la carga endofítica y la oxidación fenólica, dificultando la viabilidad del explante (Gu et al., 2022).

En este contexto, el presente estudio evaluó la implantación de explantes y el efecto de diferentes balances auxina/citoquinina sobre la inducción de estructuras callogénicas comparando explantes *ex vitro* (vernadero) e *in vitro* bajo condiciones de oscuridad. La investigación propone como hipótesis que el establecimiento aséptico de *C. officinalis* requiere un protocolo específico de desinfección y protección antioxidante capaz de mitigar la fenolización; y que los explantes *in vitro* presentan mejor desarrollo morfogénico frente a los *ex vitro*, cuya respuesta estaría limitada por el estrés oxidativo y la carga endofítica.

■ MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador, y comprendió dos fases independientes basadas en el uso de material vegetal de *Cinchona officinalis* L.

En la primera fase, se evaluó la desinfección e implantación de material de invernadero (explantes *ex vitro*). El diseño de esta etapa se planteó a partir de los resultados previos reportados por Eras-Guamán et al. (2020), buscando optimizar los protocolos de asepsia para este tipo de tejido. Por su parte, la segunda fase se centró en la formación de estructuras callogénicas, fundamentada en los hallazgos de Camacho (2023). En esta etapa se utilizaron explantes tanto de origen *ex vitro* como *in vitro* (laboratorio) para comparar su competencia morfogénica bajo condiciones controladas.

Las fases 1 y 2 o compartieron frascos ni material biológico reutilizado; se trabajó con lotes distintos y objetivos específicos (asepsia/ implantación vs. callogénesis). Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) en ambas fases. La unidad experimental fue el frasco con dos explantes, con asignación aleatoria a tratamientos y condiciones de incubación idénticas. Esta estructura garantiza la independencia estadística y la atribución inequívoca de los efectos a los tratamientos (NaClO o ANA-KIN) y, cuando corresponde, al origen.

Preparación de medio de cultivo

Para la fase 1, se elaboró un medio de cultivo basal de Murashige y Skoog MS (1962) suplementado con vitaminas: tiamina 1,0 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹, piridoxina 1,0 mg L⁻¹, ácido nicotínico 2,0 mg L⁻¹; sacarosa 20 g L⁻¹; agar 6 g L⁻¹; y los antioxidantes ácido ascórbico 200 mg L⁻¹ y ácido cítrico 250 mg L⁻¹. El pH se ajustó a 5,8 ± 0,2. Por el contrario, en la fase 2 al medio de cultivo basal se emplearon dos reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) (C12H10O2) y kinetina (KIN) (C10H9N5O) en diferentes concentraciones. En ambos casos se distribuyeron 20 mL por frasco y se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 psi, 20 min), conjuntamente con los materiales de disección.

Fase de desinfección e implantación

Se recolectaron hojas de *C. officinalis* en estado juvenil, provenientes de plántulas del invernadero adjunto al Laboratorio, tratadas previo al corte con solución fungicida (Benomil 2,0 g L⁻¹) y bactericida (Kasumin 1,0 g L⁻¹) por un lapso de 2 meses con intervalos de aplicación de 8 días. Los explantes *ex vitro* ingresados al laboratorio fueron desinfectados en cámara de flujo laminar: inmersión en alcohol al 70 % por 1 minuto, enjuague con agua destilada estéril, luego se aplicaron las concentraciones de solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio (NaClO) según correspondió a su tratamiento, por un lapso de 10 minutos (Tabla 1); finalmente, se eliminó la solución desinfectante con 3 enjuagues de agua destilada estéril más antioxidantes (250 mg L⁻¹ de ácido ascórbico más 200 mg L⁻¹ de ácido cítrico).

Tabla 1. Tratamientos de NaClO para la desinfección de explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* (Fase 1).

Tratamientos	Concentración del desinfectante NaClO (%)	Tiempo de inmersión (minutos)
T1	10	10
T2	15	10
T3	20	10
T4	25	10

Cada tratamiento incluyó 30 explantes (15 frascos por tratamiento), alcanzando un total de 60 frascos y 120 explantes en la Fase 1. Los explantes se inocularon en condiciones asépticas y se llevaron al cuarto de incubación en condiciones de oscuridad total a 23 °C durante 45 días. Las variables evaluadas fueron: número de explantes contaminados y con oxidación fenólica, y número de días a la contaminación y oxidación.

Fase de inducción de estructuras callogénicas

Se inocularon explantes consistentes en segmento de la nervadura central de la hoja (1 cm²) de plántulas *ex vitro* (*invernadero*) y *vitroplantas* (*in*

vitro). Las plántulas *ex vitro* se sometieron al mismo protocolo de desinfección descrito anteriormente. Ambos grupos de plantas donantes se originaron a partir de semillas, con características fisiológicas homogéneas: 4 meses de edad (estado juvenil) y crecimiento activo. En este caso se siguió el mismo esquema experimental, modificando la composición del medio de cultivo para incorporar reguladores de crecimiento en diferentes dosis. Se evaluaron 5 tratamientos $\times$ 3 repeticiones (Tabla 2); la unidad experimental fue un frasco con 2 explantes. Cada tratamiento reunió 15 frascos (30 explantes), para un total de 75 frascos dando un total de 150 explantes de origen *ex vitro* e *in vitro* respectivamente.

Tabla 2. Tratamientos hormonales (ANA/KIN) para la inducción *in vitro* de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* (Fase 2).

Tratamientos	Regulador de crecimiento	
	ANA (mg L-1)	KINETINA (mg L-1)
T0 (control)	0	0,0
T1	5	0,0
T2	10	0,0
T3	5	0,5
T4	10	0,5

Los explantes de origen *ex vitro* e *in vitro* se inocularon en condiciones asépticas y se llevaron a incubación en condiciones de oscuridad total a 23 °C durante 90 días. Las variables evaluadas fueron: número de explantes contaminados y fenolizados, y número de días a la contaminación y fenolización, número de explantes con callo y de días a la formación del callo, color y friabilidad, número de raíces y/o brotes por callo.

Análisis estadístico

Para las variables binarias de la Fase 1 (contaminación y fenolización) y Fase 2 (formación de callo), se ajustaron Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) con distribución binomial y función de enlace logit.

Se incluyó la ‘Repetición’ como efecto aleatorio para controlar la variabilidad experimental por bloques. En la Fase 2, debido a la presencia de separación completa de datos (tratamientos con 0 % o 100 % de respuesta en callogénesis), se aplicaron modelos Beta-binomiales para gestionar la sobredispersión y obtener estimaciones robustas de los errores estándar. El análisis de los tiempos hasta el evento (días a la contaminación y fenolización) se realizó mediante curvas de Kaplan-Meier y modelos de Riesgos Proporcionales de Cox, verificando el supuesto de proporcionalidad mediante residuos de Schoenfeld.

Para el conteo de raíces por callo (Fase 2), se descartó el modelo de Poisson tras detectar sobredispersión significativa (varianza superior a la media). En su lugar, se ajustó un Modelo de Regresión Binomial Negativa, validando su bondad de ajuste mediante la reducción del Criterio de Información de Akaike (AIC). Las medias marginales estimadas (EMMs) se calcularon sobre los modelos ajustados y las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Los análisis se realizaron en el software R (R Core Team), usando survival (Kaplan-Meier y Cox “45 días”), MASS (binomial negativo, glm.nb), glmmTMB (beta-binomial) y emmeans (medias marginales y comparaciones con Tukey).

Cabe mencionar que, las principales limitaciones de esta investigación radicarón en la alta carga endofítica y la severa sensibilidad a la oxidación fenólica inherentes al material *ex vitro*, factores que redujeron el tamaño muestral efectivo en ciertos tratamientos de la fase de inducción. Si bien esta pérdida de unidades experimentales restringe la potencia estadística para algunas comparaciones específicas en el material de campo, los patrones observados fueron consistentes y validan la necesidad crítica de una fase previa de saneamiento y estabilización *in vitro* para garantizar la viabilidad en la micropropagación de especies leñosas recalcitrantes como *C. officinalis*.

■ RESULTADOS

Fase de desinfección e implantación (explantes *ex vitro*)

Sobrevivencia de explantes

Luego de 45 días de evaluación, el tratamiento 3 (20 % NaClO) presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia, con 10 explantes vivos (33,33 %). Por su parte, en el tratamiento 4 (25,00 % NaClO) se evidenció un total de 5 explantes sobrevivientes (16,77 %); mientras que, los tratamientos 1 (10,00 % NaClO) y 2 (15,00 % NaClO) mostraron, los valores más bajos con un total de 3 explantes vivos (10,00 %) en cada caso.

Contaminación

El análisis logístico mostró que la probabilidad de contaminación difirió según el tratamiento de NaClO. El tratamiento T1 (10 % NaClO) presentó la mayor proporción de frascos contaminados (67 %), mientras que T3 (20 % NaClO) y T4 (25 % NaClO) redujeron drásticamente este riesgo (7 % y 20 %, respectivamente). En comparación con T3, los frascos tratados con T1 tuvieron 28 veces más probabilidad de contaminarse ($p = 0,023$). Aunque T4 también mostró una tendencia a menor contaminación, la diferencia frente a T1 no alcanzó significancia estadística ($p = 0,067$). Estos resultados sugieren que T3 representa la concentración más efectiva de NaClO para reducir la contaminación de explantes *ex vitro* a condiciones *in vitro* (Figura 1).

Las curvas de Kaplan–Meier (Figura 2) mostraron diferencias significativas entre tratamientos (log-rank test, $p < 0,0001$). El tratamiento T1 presentó la mayor proporción de contaminación temprana, Tabla 3. Riesgo de contaminación por tratamiento (modelo de Cox; referencia T1).

Tratamiento	Mediana de días libres de contaminación	HR (vs, T1)	IC95 % HR		p-valor
T1	12 días (contaminación temprana)	1,00 (ref)	—	—	Mayor contaminación temprana
T2	14 días	0,37	0,17 – 0,80	0,011 **	63 % menos riesgo de contaminarse

mientras que T3 mantuvo el 93 % de los explantes libres hasta el día 45. Según el modelo de Cox, los tratamientos T2 (HR = 0,37; IC95 %: 0,17–0,80), T3 (HR = 0,064; IC95 %: 0,015–0,27) y T4 (HR = 0,23; IC95 %: 0,094–0,59) redujeron significativamente el riesgo de contaminación en comparación con T1 (Tabla 3).

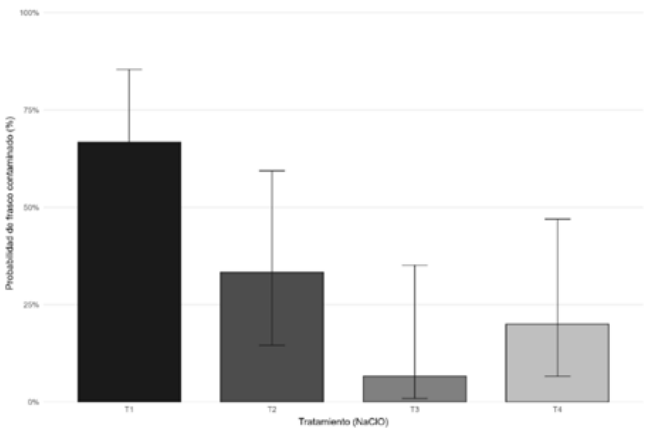


Figura 1. Probabilidad de frasco contaminado por tratamiento (NaClO). Medias marginales (emmeans) del modelo logístico a nivel de frasco con IC95 %. T1 ≈ 67 %, T2 ≈ 35 %, T3 ≈ 7 %, T4 ≈ 20 %; T1 vs. T3, $p = 0,023$.

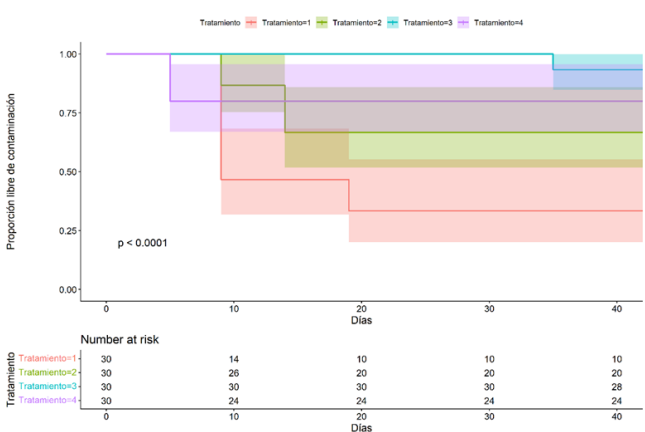


Figura 2. Curvas de Kaplan–Meier de contaminación por tratamiento (NaClO, Fase 1).

Tratamiento	Mediana de días libres de contaminación	HR (vs, T1)	IC95 % HR		p-valor
T3	>45 días (solo 2 explantes contaminados)	0,064	0,015 – 0,27	< 0,001 ***	94 % menos riesgo de contaminarse
T4	20 días	0,23	0,094 – 0,59	0,002 **	77 % menos riesgo de contaminarse

Fenolización

El análisis logístico indicó diferencias en la probabilidad de fenolización según el tratamiento de NaClO. Los tratamientos T2 (15 % NaClO) y T3 (20 % NaClO) mostraron las mayores probabilidades de fenolización (80 %), seguidos de T4 (25 % NaClO) con 73 %, mientras que T1 (10 % NaClO) presentó la menor incidencia (40 %). Aunque las comparaciones múltiples no resultaron estadísticamente significativas después del ajuste, la tendencia general muestra que concentraciones intermedias-altas de NaClO (T2 y T3) incrementan la probabilidad de oxidación fenólica en los explantes. (Figura 3). Las curvas de Kaplan–Meier (Figura 4) mostraron diferencias significativas en el tiempo de fenolización entre tratamientos (log-rank, $p = 0,0053$). El tratamiento T1 mantuvo la mayor proporción de explantes libres de fenolización, mientras que T2, T3 y T4 presentaron una aceleración en el inicio del proceso. Según el modelo de Cox, el riesgo de fenolización fue 3,28 veces mayor en T2 (IC95 %: 1,43–7,51), 3,84 veces mayor en T3 (IC95 %: 1,69–8,74) y 3,09 veces mayor en T4 (IC95 %: 1,35–7,07), en comparación con T1. (Tabla 4).

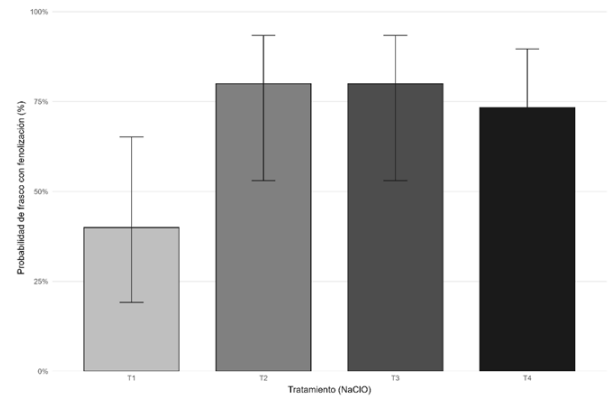


Figura 3. Probabilidad de fenolización por tratamiento (NaClO, Ensayo 1). Medias marginales (emmeans) del modelo logístico a nivel de frasco con IC95 %. T2–T3 ≈ 80 %, T4 ≈ 73 %, T1 ≈ 40 %. Diferencias no significativas en comparaciones múltiples (Tukey, $\alpha = 0,05$).

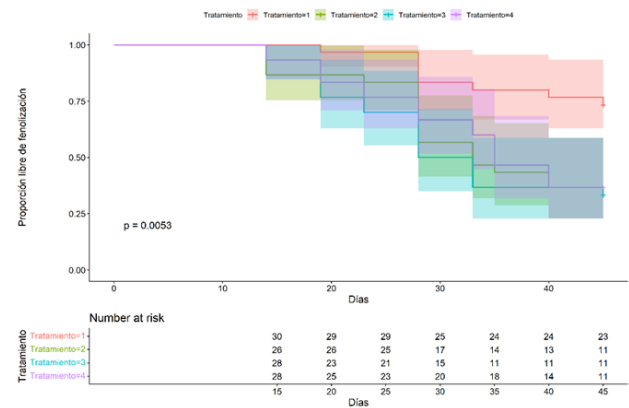


Figura 4. Curvas de Kaplan–Meier de fenolización por tratamiento (NaClO, Fase 1).

Tabla 4. Riesgo de fenolización por tratamiento (modelo de Cox; referencia T1).

Tratamiento	Mediana de días libres de fenolización	HR (vs. T1)	IC95% HR		p-valor
T1	>45 días (muchos explantes sin fenolizar)	1,00 (ref)	—	—	Menor fenolización
T2	28 días	3,28	1,43 – 7,51	0,0049 **	3× más riesgo de fenolizar
T3	23 días	3,84	1,69 – 8,74	0,0013 **	4× más riesgo de fenolizar
T4	25 días	3,09	1,35 – 7,07	0,0075 **	3× más riesgo de fenolizar

Fase de inducción de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* y *ex vitro*

Contaminación

El análisis mostró que en la condición *in vitro* no se registró contaminación en ninguno de los tratamientos, salvo un evento aislado (7 %) en el tratamiento T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹. Mientras que, en explantes de origen *ex vitro* la probabilidad de contaminación fue alta en todos los tratamientos, alcanzando entre 60 % y 80 % de los frascos evaluados. Estas diferencias resultaron estadísticamente evidentes al comparar el origen de los explantes obtenidos, aunque no se observaron diferencias claras entre tratamientos dentro de cada condición (Figura 5).

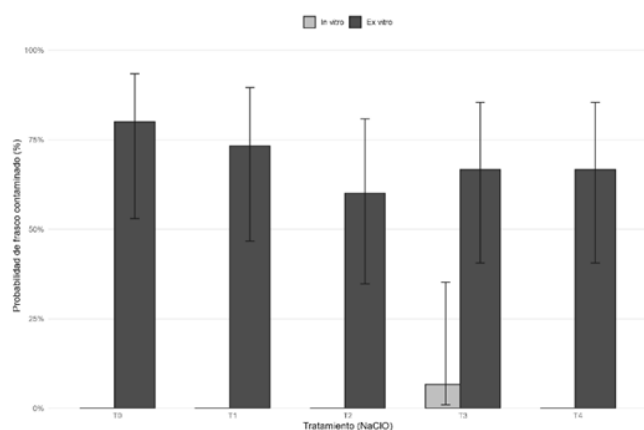


Figura 5. Probabilidad de contaminación por tratamiento y condición (Fase 2). Medias marginales (emmeans) del modelo logístico (puntos) con IC95 % (líneas). *In vitro*: sin contaminación en T0, T1, T2, T4 y un evento aislado en T3 (≈ 7 %). *Ex vitro*: probabilidades altas y similares (60–80 %) en todos los tratamientos.

Fenolización

La fenolización de los explantes fue elevada en todos los tratamientos, tanto en explantes de origen *in vitro* como *ex vitro*. En explantes *in vitro* se observaron probabilidades ajustadas de 73 % en T1 (5,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹, 80 % en T2 (10,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ y 53 % en T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ – T4 (10,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹, mientras que en el tratamiento testigo (0,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ la fenolización alcanzó

el 100 %. Por otra parte, en explantes *ex vitro* la incidencia fue aún más alta, con valores de 93 % en T0, T1 y T4, 80 % en T2 (10,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ y 100 % en T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ (Figura 6).

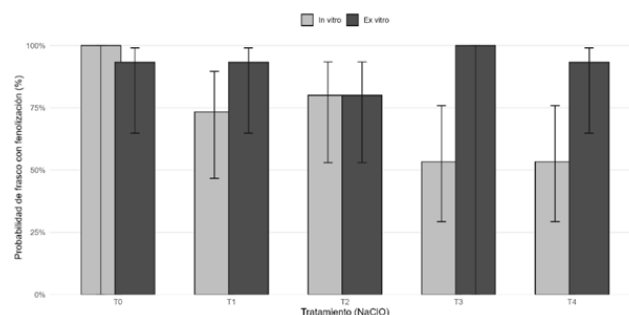


Figura 6. Probabilidad de fenolización por tratamiento y condición (Fase 2). Medias marginales (emmeans) del modelo logístico con IC95 %. *In vitro*: T0 = 100 %; T1 ≈ 73 %, T2 ≈ 80 %, T3–T4 ≈ 53 %. *Ex vitro*: incidencia mayor y homogénea (T0, T1, T4 ≈ 93 %; T2 ≈ 80 %; T3 = 100 %).

Formación de callos

La formación de callos mostró un contraste marcado entre el origen de los explantes. En explantes *in vitro*, la callogénesis fue muy alta en todos los tratamientos que incluyeron reguladores (T1–T4), los cuales abarcaron dosis de 5,0–10,0 ANA + 0,0–0,5 KIN mg L⁻¹, alcanzando porcentajes de respuesta del 80 % al 100 %. Por el contrario, el control T0 (0,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ no mostró respuesta alguna (0 %). El modelo binomial presentó separación completa (0/100 %), por lo que se ajustó un modelo beta-binomial para obtener estimaciones estables. Las probabilidades ajustadas confirmaron el patrón y las comparaciones múltiples no detectaron diferencias entre T1–T4 (Tukey, $p > 0,05$).

En cuanto a explantes de origen *ex vitro*, la probabilidad de formación de callo fue baja y homogénea (0–33 %), con T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ como la tendencia más alta y T0 = 0 %. Debido al ajuste singular del modelo binomial, se aplicó un modelo beta-binomial, el cual ratificó el resultado ($\phi = 0,523$), sin diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p > 0,05$). En conjunto, la Figura 7 muestra que los reguladores auxina–

citoquinina inducen callogénesis de forma consistente *in vitro*, mientras que *ex vitro* la callogénesis es escasa y sin efecto diferencial de los tratamientos.

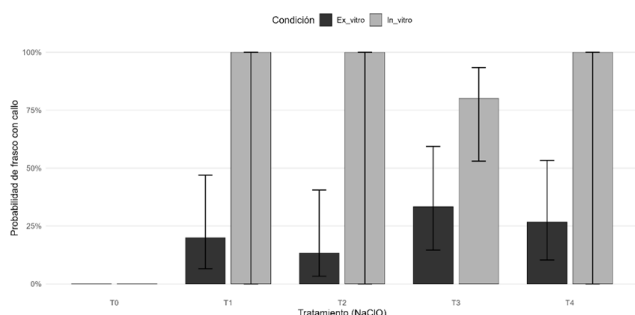


Figura 7. Probabilidad de formación de callo por tratamiento y condición. Puntos/barras = medias marginales (emmeans) a nivel de frasco con IC95 %. *In vitro*: T1–T4 ≈ 80–100 %; T0 = 0 % (separación; estimado con beta-binomial). *Ex vitro*: 0–33 %, con T3 como tendencia más alta; sin diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Raíces por callo

El modelo binomial negativo confirmó sobredispersión en los conteos (*ex vitro*: $\theta \approx 0,534$; *in vitro*: ajuste adecuado), por lo que se estimaron medias marginales ajustadas (EMMs) por tratamiento. En explantes *in vitro*, T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ y T4 (10,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ fueron altamente efectivos, con promedios de ≈46 y ≈70 raíces por callo, respectivamente; T1 (5,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ mostró un enraizamiento limitado (≈6 raíces), mientras que T0 (Control) y T2 (10,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ no presentaron respuesta.

Por su parte, en explantes *ex vitro*, los tratamientos T0 y T1 no indujeron enraizamiento (≈0). El tratamiento T2 (10,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ mostró una respuesta incipiente y muy variable (≈2,7 raíces; IC95%: 0,5–15), mientras que T3 y T4 (5,0–10,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹ evidenciaron inducción marcada (≈33; IC95 %: 7–159 y ≈28; IC95 %: 6–134, respectivamente). Las comparaciones múltiples no alcanzaron significancia estadística ($p > 0,05$), afectadas por la variabilidad y el tamaño muestral, y algunos contrastes con T0/T1 fueron no informativos por ceros estructurales; aun así,

el patrón biológico es consistente y claro: T3 y T4 son los únicos tratamientos con enraizamiento robusto en ambas condiciones, T1 y T2 muestran respuestas marginales o nulas según el ambiente, y T0 actúa como control sin respuesta.

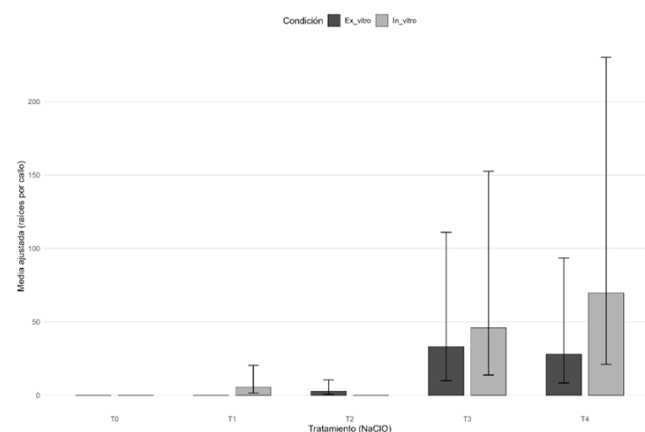


Figura 8. Efecto del tratamiento sobre el número de raíces por callo en explantes *in vitro* y *ex vitro* (EMMs, modelo binomial negativo). Barras = medias marginales ajustadas; barras de error = IC95% mostradas solo cuando la media > 2 y los IC son finitos; gris oscuro = *ex vitro*, gris claro = *in vitro*.

■ DISCUSIÓN

Dentro de los desafíos inherentes en la desinfección e implantación de explantes *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L., la contaminación representa una barrera principal para la micropropagación, con un promedio global del 31,67 % debido a la presencia de hongos (*Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp.) y bacterias endófitas, pese a las concentraciones de NaClO evaluadas (10-25 % por 10 minutos). Este comportamiento es consistente con lo reportado por Eras-Guamán et al. (2020), quienes al trabajar con explantes de invernadero de la misma especie, registraron tasas de contaminación superiores al 40 %, incluso utilizando concentraciones de NaClO mucho más altas (50 % y 75 %).

Sin embargo, se detectaron diferencias significativas tanto en la probabilidad de contaminación por frasco ($\chi^2=12,4$, $p < 0,001$) como en el tiempo hasta la aparición de contaminación entre tratamientos (log-rank test, $p = \times 10^{-6}$). A diferencia de Eras-Guamán et al. (2020)3, quienes requirieron altas dosis de

desinfectante para reducir la contaminación al 40 %, nuestro tratamiento T3 (20 % NaClO) logró una eficiencia superior con solo un 6,67 % de frascos contaminados (OR=28 vs. T1; $p = 0,023$). Este resultado sugiere que la estrategia de pretratamiento fitosanitario en invernadero (Benomil + Kasumin), alineada con las recomendaciones de García et al. (2015), permitió optimizar el protocolo utilizando concentraciones intermedias de NaClO, logrando un mejor equilibrio entre capacidad desinfectante y menor daño tisular.

El efecto del T3 prolongó significativamente el tiempo libre de contaminación (HR=0,064 vs. T1; IC 95 %: 0,015-0,274; $p < 0,001$). Por el contrario, el tratamiento T4 (25 % NaClO) mostró una contaminación temprana y mayor incidencia final (20 %), comportamiento que podría atribuirse a la fitotoxicidad del desinfectante, la cual induce la liberación de exudados que favorecen la proliferación bacteriana residual, un fenómeno de estrés tisular también observado en otros estudios de la especie.

Esta sensibilidad específica contrasta con reportes en otras especies de la familia Rubiaceae. Por ejemplo, Martínez et al. (2007) redujeron la contaminación al 8 % en explantes de campo de *Borojoa patinoi* Cuatr. utilizando NaClO al 3 % por 25 minutos; mientras que, Rodríguez-Layza et al. (2021) destacan la importancia del tiempo de inmersión prolongado (30 minutos con NaClO al 1,3 % + Tween 20), controlando la contaminación en café (*Coffea arabica*) var. Caturra roja. Estos antecedentes ponen en evidencia la variabilidad interespecífica y la necesidad de optimizar protocolos, tal como se propone en la estrategia de doble desinfección descrita por Sharry et al. (2015): inmersión inicial en etanol al 70 % (20-60 segundos) seguida de NaClO (3-30 minutos), adaptándola al tipo de explante y especie.

La oxidación fenólica alcanzó un promedio del 55 % entre los días 14 y 45, reflejando la sensibilidad de *C. officinalis* a este tipo de estrés. Los resultados observados en el tratamiento con 20 % de NaClO T3 (66,67 %) son comparables al 60 % reportado por Eras-Guamán et al. (2020) en la misma

especie en explantes de invernadero sometidos a desinfección con H₂O₂, (peróxido de hidrógeno) y NaClO, respectivamente. Sin embargo, este tipo de resultados también puede responder a factores como tipo de explante, concentraciones de desinfectantes y la exposición lumínica postinoculación (Eras-Guamán et al., 2019). Dado que la liberación de compuestos fenólicos, intensificada por la producción de alcaloides, complica notablemente el establecimiento *in vitro* de explantes *ex vitro* (Azofeifa, 2009).

Por otro lado, la incorporación al medio MS de antioxidantes (ácido ascórbico 200 mg L⁻¹, ácido cítrico 250 mg L⁻¹ y cisteína 50 mg L⁻¹) buscó atenuar la oxidación, actuando teóricamente como quelantes de las especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibiendo la polimerización de quinonas (López et al., 2015). No obstante, se registró un efecto marginal (15–20 % NaClO [T2 y T3] vs. 10 % [T1]; $p = 0,032$), las comparaciones post-hoc no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$ Tukey), lo que sugiere que el NaClO induce respuestas enzimáticas (peroxidasa, polifenol oxidasa) independientemente de la dosis, patrón frecuente en especies de la familia Rubiaceae. Finalmente, el análisis Kaplan-Meier mostró que la menor concentración de NaClO (T1, 10 %) retrasó la fenolización en explantes de *C. officinalis* (26,7 % de eventos a 45 días), minimizando el daño celular inicial. En cambio, T2 y T3 aceleraron el proceso (63,3-66,7 % de eventos), triplicando el riesgo de fenolización temprana y necrosis por quinonas tóxicas de hasta 3,84 veces mayor en T3 (IC 95 %: 1,689-8,744, $p = 0,001$).

Estos hallazgos destacan la elevada vulnerabilidad de material *ex vitro* de *C. officinalis* y proponen optimizar concentraciones intermedias de NaClO (15-20 %) combinadas con antioxidantes más potentes (cisteína, carbón activado) para mitigar pérdidas y facilitar callogénesis. La inclusión de carbón activado (3 g L⁻¹) ha permitido controlar la oxidación en *Handroanthus heptaphyllus* (Díaz et al., 2020), y podrían integrarse para absorber fenoles y mejorar la viabilidad, elevando la supervivencia más allá del 25 % observada en T3 (10 explantes vivos).

Estos resultados sentaron las bases para la Fase 2, en la que se comparó cómo el origen de los explantes (*ex vitro* vs. *in vitro*) bajo diferentes balances hormonales indujeron la generación de callos y raíces bajo balances hormonales en periodos de oscuridad. La contaminación presentó diferencias significativas según el origen ($p < 0,001$). En explantes *in vitro* no hubo contaminación en los tratamientos T0, T1, T2 y T4 (0,0–10,0 ANA + 0,0–0,5 KIN mg L⁻¹), registrándose únicamente un 6,7 % en el tratamiento T3 (5,0 ANA + 0,5 KIN) mg L⁻¹, resultado que coincide con lo reportado por Camacho (2023), quien al trabajar con *vitroplantas* de *C. officinalis* logró tasas de sobrevivencia superiores al 87 % sin incidencias significativas de patógenos.

Por el contrario, en explantes *ex vitro*, la contaminación osciló entre 60 % y 80 %, siendo el control (0,0 ANA + 0,0 KIN) mg L⁻¹ el tratamiento con mayor incidencia (80 %, IC 95 %: 53,0-93,4 %; $p = 0,033$ vs. T3 *in vitro*), incluso tras la aplicación de los mejores protocolos de desinfección definidos en la Fase 1 (T3, 20 % NaClO). Estos resultados se alinean con los resultados presentados por Eras-Guamán et al. (2020), quienes reportaron pérdidas superiores al 40 % en material de invernadero debido a la carga microbiana endógena, resistente incluso a dosis elevadas de desinfectantes.

En cuanto a la fenolización, la incidencia fue elevada en todos los tratamientos, tanto en los ensayos *in vitro* como *ex vitro*, sin diferencias significativas ($p > 0,48$ post-hoc Tukey). Sin embargo, la oxidación se intensificó notablemente según el origen del material, siendo la media global en explantes *in vitro* (72 %), y en explantes *ex vitro* (92 %); por ejemplo, en el tratamiento T3, pasó de 53 % en *in vitro* a 100 % en *ex vitro*. Destacando una susceptibilidad oxidativa mucho mayor en esta especie comparada con otras leñosas como *Grevillea robusta*, cuyas tasas suelen ser inferiores al 17 % (Bogado et al., 2016).

Esta diferencia según el origen coincide con lo señalado por Liu et al. (2024), quienes indican que los tejidos jóvenes, con menor contenido de fenoles y menor actividad de polifenol oxidasa (PPO), son menos susceptibles al pardeamiento

enzimático. Adicionalmente, la alta intensidad del pardeamiento puede explicarse por la naturaleza del proceso; según Camacho (2023) y Hernández y González (2010), la fenolización es un fenómeno fisiológico fotoactivo exacerbado por la presencia de luz y oxígeno. Esto sugiere que las condiciones de incubación lumínica pudieron potenciar la liberación de fenoles, afectando la viabilidad de los tejidos, especialmente en los tratamientos con solo auxinas (T1 y T2) que mostraron mayor afectación en la fase *in vitro*.

Durante la Fase 2 sobre la inducción de estructuras callogénicas, es importante resaltar la variación de rasgos morfológicos presentada por los callos observados consistentes con la respuesta hormonal; en la que, la variación cromática que en callos de material *in vitro* mostró predominio de color crema (58,6 %), en el tratamiento T1 (5,0 mg L⁻¹ ANA) y T2 (10,0 mg L⁻¹ ANA), seguido de color café (37,4 %, 37/99; 53-58 % en T3 (5,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN) y T4 (10,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN) y café claro (4 %, 4/99; solo en T1), obtenida con balances ANA/KIN en oscuridad total, donde T3-T4 favorecieron tonos oscuros por PPO activada. Probablemente debido a una mayor oxidación enzimática activada por el balance hormonal.

En *ex vitro*, la coloración crema (55,6 % en T1 y 100 % en T4) y café (100 % en T2, 50 % en T3) equilibraron en T3/T4, resultados similares a los reportados por Camacho (2023) con > 60 % crema en fotoperiodo/oscuridad en *C. officinalis*. Rodríguez et al. (2014) indican que el color refleja respuesta organogénica/embriogénica, influida por luz, explante y balance A/C (Espinosa et al., 2012); mientras que, Eras et al. (2019) reportaron 78 % crema + 22 % carmelita con 1 mg L⁻¹ ANA, con una alta viabilidad en callos inducidos con auxinas, alineándose con la respuesta observada en los tratamientos con ANA.

De igual forma, la friabilidad esencial para la división celular, fue superior en explantes *in vitro* (66,7 %) (50-90 % en T1-T4, máximo 90 % en T4) vs. 12,5 % explantes *ex vitro* (3,33-20 % en T1-T4), mejorada por oscuridad pese a estrés residual (fenolización 72 % vs. 92 %). Este bajo desempeño

en los explantes *ex vitro* sugiere que la oscuridad actuó como un factor ambivalente: si bien era necesaria para inducir la friabilidad morfológica, simultáneamente exacerbó la actividad de la PPO en los tejidos estresados, resultando en una alta tasa de fenolización (92 %) que terminó inhibiendo la división celular.

Estudios como el de Martínez et al. (2007) hallaron una friabilidad similar (~16 callos) en borojó con 2,4-D en oscuridad/luz, sin diferencias; por otro lado, Eras-Guamán et al. (2020) logró 100 % friables en explantes *ex vitro* de *C. officinalis* con 0-3 mg L⁻¹ 2,4-D + 0-0,5 mg L⁻¹ KIN, sugiriendo auxinas sintéticas para mitigar la no friabilidad en el T2 (10,0 mg L⁻¹ ANA) (10 %). Esta baja respuesta indicaría que el ANA fue insuficiente para inducir plasticidad en tejidos lignificados, coincidiendo con Setiawan et al. (2020), quienes requirieron 2,4-D para lograr un 100 % de callos friables en *Coffea arabica*. El 2,4-D no solo aumenta la plasticidad celular, sino que también retrasa la síntesis de polifenoles, lo que respalda su uso para superar la oxidación en material de campo (Armijos-González y Pérez-Ruiz, 2016).

La callogénesis alcanzó el 76 % global en *vitroplantas* a 90 días (80-100 %) en T1 (5,0 mg L⁻¹ ANA), T2 (10,0 mg L⁻¹ ANA) y T4 (10,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN). Este desempeño en material *in vitro* es consistente con lo reportado por Camacho (2023), quien obtuvo un desarrollo de estructuras callogénicas del 86,5 % en explantes de *vitroplantas* bajo oscuridad total utilizando una combinación similar de ANA (2,0 mg L⁻¹ y KIN 0,5 mg L⁻¹), superando significativamente a los tratamientos bajo fotoperiodo (69 %). Permitiendo que el tejido juvenil en condiciones asépticas (*in vitro*) posee la competencia fisiológica necesaria para responder eficientemente a auxinas como el ANA.

Por el contrario, la respuesta en explantes *ex vitro* fue marginal (18,7 % global), esto contrasta con el 93,3 % de Eras et al. (2019) usando 1 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP en nodales, o el 100 % de Sánchez-Calvo et al. (2015) con 2,4-D + AIB en *Uncaria tomentosa*, pero se alinea con el 73,3 % de Eras-Guamán et al. (2020) en explantes *ex*

vitro de *C. officinalis* con 3 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ KIN, sugiriendo que auxinas sintéticas como 2,4-D podrían potenciar respuestas en tejidos *ex vitro* al superar inhibiciones por fenoles residuales. Estos resultados difieren de la ruta de regeneración reportada por Armijos-González y Pérez-Ruiz (2016), quienes lograron inducir brotes indirectos (vía callo) y proliferación de brotes utilizando una combinación diferente de 5.0 mg L⁻¹ BAP y 3.0 mg L⁻¹ IBA en medio Gamborg B5, lo que sugiere que *C. officinalis* posee plasticidad morfogenética frente a distintos balances de auxina/citoquinina.

Finalmente, en el proceso de inducción de rizogénesis el balance hormonal ANA/KIN indujo diferencias descriptivas en el número de raíces por callo, con el material *in vitro* exhibiendo tasas globales superiores (media ajustada 24,2 raíces/callos, IC 95 %: 9,1-66,7 en T3/T4) comparado con material *ex vitro* (13,9 raíces/callos, IC 95 %: 6,3-33,3). Este comportamiento se alinea con lo observado por Camacho (2023) en la misma especie, quien reportó que, si bien la rizogénesis puede iniciarse en fotoperiodo, las raíces desarrolladas bajo condiciones de oscuridad presentan mayor vitalidad y robustez, características críticas para la viabilidad del callo. En explantes *ex vitro*, los tratamientos T3 (5,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN) y T4 (10,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN) generaron 33,3 (IC 95%: 10,0-111) y 28,0 (IC 95 %: 8,4-94) raíces por callo, respectivamente, superando al T2 (2,7, IC 95 %: 0,7-11) y T0/T1 (0), sugiriendo que dominancias auxínicas intermedias (5-10 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ KIN) contrarrestan parcialmente la fenolización elevada de fase 1 (92 % global *ex vitro*).

Por su parte, en explantes *in vitro*, el tratamiento T4 mostró la mayor respuesta (69,7 raíces/callos, IC 95 %: 21,1-230), seguido de T3 (46,0, IC 95 %: 13,9-153) y T1 (5,7, IC 95 %: 1,6-20), mientras que en T0 y T2 no se observó formación radicular, alineándose con el trade-off hormonal donde citoquininas bajas promueven rizogénesis en *vitroplantas* preestériles. El modelo unificado no detectó efectos significativos, pero las medias ajustadas confirman superioridad descriptiva del material *in vitro* (OR >5 implícito para raíces >10 en T3/T4 vs. *ex vitro*), validando la propagación

secuencial para escalar enraizamiento. La variabilidad en longitudes radiculares (predominio corto <2 cm en explantes *ex vitro*, 47 %) indica viabilidad para aclimatación, influida por hormonas y origen (Rodríguez et al., 2014), similar a Eras-Guamán et al. (2020), aunque la oscuridad favorece raíces compactas y fáciles de separar (66,7. % *in vitro* vs. 12,5 % *ex vitro*), limitando tasas de supervivencia postrasplante a ~70 % en el tratamiento T4 en explantes *in vitro*.

■ CONCLUSIONES

El tratamiento con NaClO al 20 % durante 10 minutos proporcionó el mejor balance entre eficacia de desinfección y viabilidad de los explantes de *Cinchona officinalis* L. Sin embargo, el origen *ex vitro* favoreció tanto la fenolización como la pérdida de tejido viable, lo que evidencia la inviabilidad de la inducción directa en material de campo y ratifica la necesidad de una fase previa de establecimiento *in vitro* para garantizar la competencia morfogénica.

Los balances hormonales con 5–10 mg L⁻¹ de ANA combinado con 0,5 mg L⁻¹ KIN promovieron una callogénesis elevada (entre 80 y 100 % en explantes *in vitro*) y una rizogénesis significativa (máximo de hasta 70 raíces por callo en T4), asociada a la formación de callos claros y texturas friables, indicadores de alta viabilidad morfogénica y potencial para la regeneración de tejidos en fases posteriores de organogénesis o embriogénesis somática.

En conjunto, los resultados demuestran que el material procedente de *vitroplantas* presenta un desempeño superior frente al *ex vitro*, y destacan que la interacción entre la intensidad de la desinfección con NaClO, el manejo de antioxidantes y el balance hormonal ANA/KIN constituye el eje clave para el desarrollo de protocolos de micropropagación eficientes y replicables en especies leñosas como *C. officinalis*.

El protocolo propuesto constituye una base técnica preliminar para la micropropagación y conservación *ex situ* de *C. officinalis* L., con potencial aplicación en programas de restauración,

mejoramiento genético y aprovechamiento sostenible de metabolitos quinolínicos. Además, los resultados evidencian una alta sensibilidad oxidativa y dependencia hormonal en los tejidos de la especie, abriendo nuevas líneas de investigación sobre mecanismos redox, metabolismo fenólico y procesos de diferenciación celular en especies leñosas tropicales.

■ CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

A, A: Conceptualización, Análisis formal, Curación de datos, Escritura – Revisión y edición, Visualización;

M. M.: Metodología, Investigación, Curación de datos, Escritura – Borrador original;

M.Y.: Conceptualización, Metodología, Escritura – Borrador original.

■ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbizu, C., Ferro-Mauricio, R., Chávez-Galarza, J., Guerrero-Abad, J., Vásquez, H., & Maicelo, J. L. (2021). The complete chloroplast genome of the national tree of Peru, quina (*Cinchona officinalis* L., Rubiaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 6(9), 2781-2783. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1969697>
- Armijos-González R, Pérez-Ruiz C (2016) *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). *J Forestry Res* 27(6):1229–1236. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>
- Armijos-González, R., Ramón, P. & Cueva-Agila, A. *Cinchona officinalis* L. *ex situ* conservation by *in vitro* slow growth and cryopreservation techniques. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 158, 6 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02784-8>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bogado, F. A., Vera Bravo, C., Ayala, P. G., Sansberro, P. A., & Luna, C. V. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Ciencias Agronómicas*, 16(27), 11–16. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/25301>

- Armijos-Montaño, A., Manchay-Loaiza, M., Yaguana-Arévalo, M. (2026). Inducción de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 16(1), 99-113. <https://doi.org/10.54753/blc.v16i1.2633>
- Camacho, J. (2023). Formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de *vitroplantas* de *Cinchona officinalis* L., en condiciones de fotoperíodo y oscuridad. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/26058>
- Caraguay, K., Eras, V., González, D., et al. (2016). Potencial reproductivo y análisis de calidad de semillas de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos en la Provincia de Loja – Ecuador. *Rev. Investig. Altoandín*. Vol. 18 Nro. 3: 271- 280. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5645611>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Investigadora, Unidad de Biotecnología. <https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Cupueran, F., Barragán, O., Insuasti, J., Barrigas, D., y Soto, C. (2021). Producción de plantas *in vitro* de quina (*Cinchona officinalis*): una revisión de plantas *in vitro* de quina (*Cinchona officinalis*): una revisión. *Revista Biorrefinería* Vol., 4 (4). <https://cebaecuador.org/wp-content/uploads/2022/01/13.pdf>
- Díaz, G. (2012). Procesos morfogénicos *in vitro* de Cedro (*Cedrela montana* Mortiz ex Turcz.) Inducidos a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. [Tesis pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital - Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5343>
- Díaz Lezcano, M. I., Rodas Ramírez, J. M., González Segnana, L. R., & Vera de Ortiz, M. (2020). Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. *Biotechnología Vegetal*, 20(3), 203-210. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472020000300203&lng=es&nrm=iso
- Duque, J. P. (2010). Biotecnología. Netbiblo. <https://bit.ly/3S1PWYG>
- Eras-Guamán, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., y Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 58-68. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/586>
- Eras-Guamán, V. H., Moreno-Serrano, J., Méndez-Montaño, K., Yaguana-Arévalo, M., y Angamarca, R. A. P. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 20-28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/682>
- Eras-Guamán, V. H., Moreno-Serrano, J., Yaguana-Arévalo, M., Poma Angamarca, R., y Guartanza-Loja, J. A. (2020). Inducción *in vitro* de estructuras callogénicas en *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 10(1), 14–28. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/714>
- Eras Guamán, V. H., Moreno Serrano, J. A., Yaguana Arévalo, M., Poma Angamarca, R. A., y Cueva Coronel, C. M. (2021). Inducción *in vitro* de raíces de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas. *Bosques Latitud Cero*, 11(2), 43–52. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/1006>
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo Masapanta, L., y Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-416. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006&lng=es&nrm=iso
- García, D., Ocampo, M., y Mesa, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>
- Garmendia, A. (2005). El árbol de la quina (*Cinchona* spp.): distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura. 187. bit.ly/3NNKohS
- González Valdiviezo, K., Eras Guamán, V. H., Moreno Serrano, J., Minchala Patiño, J., Yaguana Arévalo, M., y Valarezo Ortega, C. (2018). Procesos biotecnológicos para la inducción de callos a partir de *vitroplantas* de *Cinchona officinalis* L., a nivel de laboratorio en la provincia de Loja, Ecuador. *Tzhoecon*, 10(2), 299-312. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8152310>
- Gu, M., Li, Y., Jiang, H., Zhang, S., Que, Q., Chen, X., & Zhou, W. (2022). Efficient *In Vitro* Sterilization and Propagation from Stem Segment Explants of *Cnidioscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnston, a Multipurpose Woody Plant. *Plants*, 11(15), 1937. <https://doi.org/10.3390/plants11151937>
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias (INCA)*, 31, 88–100. <https://doi.org/0258-5936>

- Armijos-Montaño, A., Manchay-Loaiza, M., Yaguana-Arévalo, M. (2026). Inducción de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 16(1), 99-113. <https://doi.org/10.54753/blc.v16i1.2633>
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, 258.
- Liu et al. (2024) Liu, C., Fan, H., Zhang, J., Wu, J., Zhou, M., Cao, F., Tao, G., & Zhou, X. (2024). Combating browning: mechanisms and management strategies *in vitro* culture of economic woody plants. *Forestry Research*, 4, e032. <https://doi.org/10.48130/forres-0024-0026>
- López Correa, J. E., y Botero, L. R. (2015). Cultivo *in vitro* de la especie forestal amenazada *Peltogyne purpurea* Pittier. Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/58549>
- López, N. (2016). Evaluación del paisaje y recursos escénicos después de 350 años de explotación de la “cascarilla” o “quina” *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae) en el sector Cajanuma-Rumishitana, Ecuador. *Arnaldia*, 23(2). <https://doi.org/10.22497/668>
- Martínez, M., Hernández, C., y Restrepo, L. (2007). Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. *Revista Colombiana de Biotecnología*. ISSN: 0123-3475. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77690205.pdf>
- Medina, J., y Catarí, E. (2022). Caracterización química de la corteza del árbol de la Quina (*Cinchona officinalis*) para su consideración como materia prima lignocelulósica. *Ciencia en Revolución*, 8(23), 36-59. <https://cienciaenrevolucion.com.ve/index.php/cienciaenrevolucion/article/view/60>
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Oran, S., Althaher, A., & Mubarak, M. (2022). *Cinchona officinalis* (cinchona Tree) and *Corylus avellana* (common hazel). In *Herbs, Shrubs, and Trees of Potential Medicinal Benefits* (pp. 377-394). CRC Press. DOI:10.1201/9781003205067-19
- Parveen, S., Maurya, N., Meena, A. y Luqman, S. (2024). Cinconina: un agente farmacológico versátil derivado de alcaloides naturales de la quina. *Temas actuales en química medicinal*, 24 (4), 343-363. 10.2174/0115680266270796231109171808
- Ramírez, L., Granados, J., y Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro*. *Dialnet*. 5(1), 1-15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5344976>
- Regalado, A., Paccha, E., Álvarez, O., y Montaño, T. (2020). Comportamiento de las concentraciones de PM10 en la ciudad de Loja-Ecuador y su relación con variables meteorológicas. *Journal of Science and Research*, 5(1), 137-148. <https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/755>
- Rodríguez-Layza, J., Gonzales-Arteaga, J. J., Romero-Rivas, L. C., y Párraga-Quintanilla, A. (2021). Establecimiento *in vitro* de café var. caturra roja a partir de microesquejes. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(5), 8132-8148. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i5.894
- Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Romero, J. (2015). Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae) en el sur del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1-2), 27-35. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6369414>
- Sánchez-Calvo, L., y Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lng=en&nrm=iso
- Sánchez, R. y Luberli, J. (2023). Efecto de tres dosis y dos reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae)-Cajamarca. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/6217>
- Sánchez-Santillan, T., Meléndez-Mori, JB, Morales-Rojas, E., Chichipe-Puscan, AK, Oliva-Cruz, SM y Huaman-Vela, MH (2021). Multiplicación clonal del árbol de quina (*Cinchona officinalis* L.): una alternativa para conservar el árbol nacional del Perú. 33(3) 215-222. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8135617>
- Serrano, J. A. M., Ruíz, C. P., Fierro, I. M., & Fierro, J. M. (2019). Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 51(1), 55-68. <https://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFA/article/view/2337>

Armijos-Montaña, A., Manchay-Loaiza, M., Yaguana-Arévalo, M. (2026). Inducción de estructuras callogénicas en explantes *in vitro* y *ex vitro* de *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 16(1), 99-113. <https://doi.org/10.54753/blc.v16i1.2633>

Setiawan et al. (2020) Setiawan, R. B., Rahmah, M., Trisnia, H., Chaniago, I., Syukriani, L., Yunita, R., & Jamsari, J. (2020). Embryogenic callus induction of coffee [*Coffea arabica* L.] on several plant growth regulator concentration and incubation temperature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 497, 012012. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/497/1/012012>

Sharry, S. (2015). Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). ISBN: 978-950-34-1254-1 <https://doi.org/10.35537/10915/46738>