

Estudios de fructificación y germinación; y de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Cinchona officinalis*, una especie medicinal

Studies on fruiting and germination, and on in vitro multiplication and rooting of Cinchona officinalis, a medicinal species

Máximo Moreira¹, Oscar Vivanco², Nicole Jara³

¹ Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0002-1833-2674>

² Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0001-7799-6297>

³ Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0009-0002-7591-7924>

Autor de correspondencia: momoreira@utpl.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.63804/CIBEN.25.bbf.s.e11>

Resumen

Cinchona officinalis, es una planta medicinal cuyos alcaloides curan la malaria. En 2020 se creyó erróneamente que controlaría el virus del COVID, y se hicieron colectas de esta especie que presenta relictos de pocos individuos. Dado que produce semillas durante todo el año se evaluó su germinación en función del mes de colecta, y posteriormente se evaluó el enraizamiento de las plántulas obtenidas. Se colectaron cápsulas con semillas durante 12 meses. Las semillas se desinfectaron, embebieron y sembraron en medio Murashige. Con las plántulas se indujo multiplicación con giberelinas; se aislaron brotes y en un biorreactor SIT-RITA se aplicó PBZ y AIB por 1 y 2 minutos cada 6 horas para evaluar enraizamiento. Existen variaciones del tamaño de las semillas según el mes de colecta y también de la germinación. También se observaron diferencias del enraizamiento. Se mejoró la adaptación *ex vitro* pensando en futuros proyectos de conservación y reforestación.

Palabras clave: *Cinchona officinalis*; Enraizamiento; Cultivo *in vitro*; Semillas.

Abstract

Cinchona officinalis is a medicinal plant whose alkaloids are used to treat malaria. In 2020, it was mistakenly believed to be effective against the COVID-19 virus, leading to the collection of individuals from its already scarce relict populations. Since the species produces seeds throughout the year, germination was evaluated according to the month of collection, and

subsequently, the rooting of the obtained seedlings was assessed. Seed capsules were collected monthly for 12 months. The seeds were disinfected, soaked, and sown in Murashige medium. Seedlings were induced to multiply using gibberellins; shoots were isolated, and in a SIT-RITA bioreactor, PBZ and IBA were applied for 1 and 2 minutes every 6 hours to evaluate rooting. Variations in seed size were observed depending on the collection month, as well as differences in germination and rooting. *Ex vitro* adaptation was improved, considering future conservation and reforestation projects.

Keywords: *Cinchona officinalis*; Rooting; *in vitro* culture; Seeds.

Introducción

El género *Cinchona*, originario de los valles Andinos y bosques montanos de Sudamérica cuenta con 23 especies distribuidas entre los 1500 a 3100 m s.n.m. La corteza de *C. officinalis* contiene alcaloides con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas (Peña, 2020), que la han convertido en una reconocida planta medicinal contra el paludismo. Además, erróneamente se creyó que podría combatir el SARS-CoV2 en 2019 (Pucha et al., 2020, Carrión, 2022), lo cual provocó nuevas colectas de la especie causando más alteraciones en sus pocos relictos (Eras et al., 2019; Romero, 2015). También, su regeneración natural es baja y el desarrollo de las plantas es lento, y la reintroducción de plantas obtenidas en vivero es poco exitosa (Cué et al., 2020). Todo esto sucede a pesar de que su floración y fructificación se produce continuamente a lo largo de todo el año (Díaz & Loján, 2004; Villar et al., 2018).

No se han encontrado reportes sobre el tamaño de las cápsulas y el número de semillas, pero se ha observado que son variables. Dada su constante producción anual, su germinación podría ser influenciada por factores meteorológicos como horas de brillo solar, humedad relativa, temperatura y precipitación. Además, la variabilidad de sus semillas, las dinámicas de germinación y el desarrollo de plántulas, podrían estar siendo influenciados por la temporalidad de producción de semillas. Otro factor que podría influir es el tamaño de las cápsulas y la cantidad de semillas que contienen. Por ello nos hemos planteado tres hipótesis: existe una influencia del mes de colecta sobre el tamaño de las cápsulas, existe influencia del tamaño de las cápsulas sobre el tamaño de las semillas, y; el tamaño de las semillas influye sobre la germinación. Conocer los ciclos de vida de una especie permiten manejarla y conservarla, y todo esto será de gran aporte al conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y ambientales, y la biología reproductiva de esta especie. Además, aportará al desarrollo de estrategias de propagación, manejo y conservación de *C. officinalis* y, de otros recursos vegetales.

Metodología

El relicto de *C. officinalis* se encuentra en la hacienda El Cristal, sector Tres Leguas-Rumishitana, provincia de Loja. La especie se encuentra en un rango altitudinal de 1800 a 2000 m s.n.m., en donde la temperatura promedio es de 14 °C y su precipitación anual oscila entre 1000 a 1500 mm (Ochoa, 2016).

Se colectaron cápsulas de *C. officinalis* desde diciembre del 2022 hasta diciembre del 2023. Las colectas se hicieron a mediados de cada mes en horas de la mañana, por periodos de alrededor de 40 minutos. Se colectaron cápsulas cerradas y maduras (color marrón chocolate) e inmediatamente fueron transportadas en fundas ziploc. Posteriormente, se tomaron medidas de largo, ancho, grosor (en mm) y peso (en g) de cada cápsula, con estos datos se calculó el volumen de las cápsulas aplicando la fórmula de la elipse: $4/3 \times \pi \times \text{Largo} \times \text{Ancho} \times \text{Grosor}$. Las cápsulas se pusieron a secar a temperatura ambiente bajo sombra hasta su apertura. Luego se contó el número total de semillas por cápsula, y se clasificaron como buenas, inmaduras, vanas y depredadas por insectos u hongos. Para calcular el peso de las semillas se tomaron 100 semillas buenas al azar y se pesaron (en g), haciendo 10 repeticiones. Para calcular su tamaño se tomó un bloque de 100 semillas buenas al azar, y se midió el largo y ancho (en mm) sin considerar sus alas.

De cada colecta mensual se tomaron 50 semillas buenas para evaluar su germinación. Se hicieron tres repeticiones. Previo a la siembra, se desinfectaron las semillas con 1 min de alcohol al 70% , y 10 min de cloro al 1%. Posteriormente, se embebieron en agua destilada estéril por 24 h. Finalmente, se sembraron cinco semillas por frasco en medio MS (Murashige & Skoog, 1962). De cada semilla sembrada se tomaron datos de contaminación, germinación (aparecimiento de la radícula), formación de hojas cotiledonares, formación de hojas verdaderas y presencia o ausencia de raíces. Se tomaron datos durante 60 días. Se seleccionaron plántulas de 5 cm, vigorosas, es decir con hojas verdes, tallos erguidos y sin deficiencias. Se realizó la medición inicial de la longitud de las plántulas y raíces de 10 plántulas al azar. Se utilizaron 25 plantas *in vitro* en cada biorreactor.

En la fase de multiplicación se utilizó el sistema de inmersión temporal RITA. Los medios de cultivo utilizados se encontraban compuestos por: 1/2 MS 50% (2,16g/L), sacarosa (30g/L), y vitaminas Gamborg (10ml/L). Se evaluaron dos tiempos de inmersión (1 y 2 min), con una frecuencia de inmersión cada 6 horas y el efecto por separado de PBZ (0,5 y 1 mg/L) y de AIB (1 mg/L). Se realizó un recambio de medio cada 15 días. Cada uno de los recipientes contuvo 250ml de medio líquido. Todo el ensayo se mantuvo a 22°C, con fotoperíodos de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Transcurridos los 45 días, se evaluó la longitud de plántulas,

hiperhidricidad, longitud y número de raíces, tasa de multiplicación, total de plántulas, contaminación y oxidación.

La normalidad de los datos se evaluó con el test de Shapiro Wilk y la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene. Luego se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para cada variable de respuesta. Para datos con distribución normal se usó el test de Tukey ($p < 0,05$) y para datos que no presentaron normalidad se usó Kruskal Wallis. En los datos morfológicos de cápsulas se aplicó el test de correlación de Pearson. En cada caso se estableció el nivel de correlación fuerte, moderada, débil o nula (Hernández et al 2018). En semillas y en plántulas se compararon las medias con la prueba de Tukey o de Kruskal-Wallis para establecer las diferencias.

Resultados y discusión

En los bloques de cápsulas colectadas mensualmente durante 13 meses se observaron variaciones en el largo, ancho, grosor y peso, sin tener un patrón muy claro. Las cápsulas entre agosto y noviembre presentan el mayor largo, lo cual podría relacionarse con la mayor irradiación solar en esos meses (Gosgot et al 2024; Fischer 2009), la variación de los datos es mucho mayor que la encontrada en otro estudio (Romero, 2015).

El número de semillas por cápsula fue muy variable. En abril se observó el mayor número promedio de semillas por cápsula. También se denotó la variabilidad en el número de semillas presentes en cada cápsula, la cual varió de 0 a 73, y al parecer es común (Eras et al., 2021; Moreno-Serrano et al., 2018). Toda esta variabilidad también se corrobora con los valores de correlación entre los datos morfológicos y el número de semillas. La correlación más alta de las cápsulas y el número de semillas que contenían fue entre el volumen con el ancho (0,87) y con grosor (0,79), y del grosor con el ancho (0,81). Al correlacionar las variables medidas (largo, ancho, grosor, volumen) según el mes de colecta de las cápsulas y el número de semillas, la mayoría presentan un nivel de correlación entre fuerte, moderada y débil; y unos pocos nula.

La calidad de semillas fue mejor en junio (84,3%), en enero menor presencia de vanas (2,7%) y mayor presencia de inmaduras (74%); y, las más depredadas por hongos en diciembre (26,7%) y en abril por insectos (10,7%). A pesar de que se habla de la influencia de las condiciones ambientales sobre la madurez de los frutos (Quiroz et al., 2009) Orjuela et al 2024, en *C. officinales* no se aprecia este fenómeno lo cual también ha sido reportado con otras especies forestales (Revilla et al 2021). A pesar de colectar únicamente frutos maduros se observaron altos porcentajes de semillas inmaduras. Al comparar los datos de diciembre del 2022 y 2023 podemos darnos cuenta de la variación interanual presente en esta especie.

Las semillas más largas se encontraron en agosto (2,48mm), las más anchas en enero (1,67mm) y las de mayor peso en diciembre23 (81,93mg/100semillas). Se observaron diferencias significativas del largo y ancho en función de los meses en que fueron colectados. En los meses de enero, febrero y agosto, que presentaban semillas de mayor volumen, se encontraron correlaciones positivas entre el volumen de las semillas y el ataque por hongos o insectos, es decir que, a mayor volumen mayor depredación. El mayor peso de cápsulas correspondió a febrero y de semillas a diciembre23, esto se contrapone con lo mencionado por Eras, et al., (2019) que indican que el peso de las semillas está directamente relacionado con el tamaño y el número de semillas por fruto.

Se presentó germinación en todos los meses, siendo mayor en febrero (66%), seguido de las de septiembre (62%) y marzo (61%). Es interesante mencionar que, las semillas de febrero son anchas (1,64mm) y proceden de las cápsulas con mayor peso (321mg), ya que podrían ser factores que influyen sobre su germinación. La germinación inició a los 7 días y el mayor pico fue entre los 20 y 27 días. Luego de dos días de germinadas inició la formación de hojas cotiledonarias siendo más frecuente entre los 6 y 10 días. La formación de hojas cotiledonarias fue más rápida en las semillas provenientes del mes de abril, febrero, marzo y mayo, mientras que las semillas de diciembre y enero fueron las que más tardaron y con menor presencia. Así mismo, las semillas provenientes del mes de febrero, marzo y abril presentaron más raíces.

El mayor número de raíces en el sistema de inmersión temporal RITA fue con el tratamiento de 1mg/L AIB y con inmersión de 1 minuto, además presentó las raíces de mayor largo (2,65 a 2 cm). En este tratamiento se observó un total de 29 plántulas con una tasa de multiplicación de 1,16. En *Cinchona officinalis*, el uso de 0,5 mg/L de AIB generó raíces (Eras-Guamán et al., 2021) y también 2 mg/L (Eras-Guamán et al., 2019). También 3 mg/L de AIB más 5 mg/L de BAP ayudan al crecimiento de esta especie (Armijos-González & Pérez-Ruiz, 2016).

El conocimiento de las cápsulas y su relación con la calidad de las semillas, y por otra parte conocer procesos de multiplicación y enraizamiento de plántulas; son factores determinantes para pensar en proyectos de conservación y de aprovechamiento de esta especie.

Conclusiones

La media de semillas por cápsula fluctúa entre 30 y 40 y la variación del tamaño de las semillas según el mes de colecta es alta

La germinación es mayor en los meses de febrero, marzo y septiembre y podría estar relacionada con el ancho de las semillas o el peso de las cápsulas.

El AIB es un regulador que permite alta multiplicación y crecimiento generando plántulas con buenas raíces para su adaptación.

Referencias bibliográficas

Armijos-González, R., & Pérez-Ruiz, C. (2016). In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research*, 27(6), 1229-1236.

Eras-Guamán, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., & 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).

Eras-Guamán, V., Serrano, J. A. M., Arévalo, M. Y., Angamarca, R. A. P., & Coronel, C. M. C. (2021). Inducción *in vitro* de raíces de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas. *Bosques Latitud Cero*, 11(2), Article 2.