Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Morfología floral y número cromosómico de tres especies del género *Cinchona*: *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* (Rubiaceae) para el Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica

AUTOR

Whinny Wensly VICUÑA ZEVALLOS

ASESORES

Dra. Joaquina Adelaida ALBÁN CASTILLO

Dra. Mónica ARAKAKI MAKISHI (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vicuña, W. (2023). *Morfología floral y número cromosómico de tres especies del género Cinchona: C. capuli, C. krauseana y C. lancifolia (Rubiaceae) para el Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Whinny Wensly Vicuña Zevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74612656
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3145-7295
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Joaquina Adelaida Albán Castillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08555549
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4104-2912
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Mónica Arakaki Makishi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08136445
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1081-2507
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mónica Arakaki Makishi
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08136445
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Alberto Ernesto López Sotomayor
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10472260
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Claudia Fiorella Barletta Carrillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40846770

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.1.2. Biodiversidad y Ecología de Ecosistemas Terrestres
Grupo de investigación	Estudio de las Poblaciones Amenazadas de la Flora
Agencia de financiamiento	Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, GI-FLORAM. B2010009m-PMULTI Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. B19100064-PTPGRADO
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Piura Provincia: Ayabaca Longitud: -79.7149100 Latitud: -4.6398300 País: Perú Departamento: Piura Provincia: Huacabamba Longitud: -79.4505600 Latitud: -5.2386100 País: Perú Departamento: Amazonas Provincia: Chachapoyas Longitud: -77.87217 Latitud: -6.2293
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencias de las plantas, Botánica http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.10

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA CON MENCIÓN EN BOTÁNICA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 11:17 horas del 31 de agosto de 2023, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica** de **WHINNY WENSLY VICUÑA ZEVALLOS.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **UNMSM-20220101631**, la titulando expuso su tesis: **MORFOLOGÍA FLORAL Y NÚMERO CROMOSÓMICO DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Cinchona*: *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* (Rubiaceae) PARA EL PERÚ,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18,calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica** a **WHINNY WENSLY VICUÑA ZEVALLOS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 12:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 31 de agosto de 2023.

Dra. MONICA ARAKAKI MAKISHI
(PRESIDENTA)

Dra. JOAQUINA ADELAIDA ALBAN CASTILLO
(ASESORA)

Mg. CLAUDIA FIORELLA BARLETTA CARRILLO
(MIEMBRO)

Blgo. ALBERTO ERNESTO LOPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **Eliana del Pilar Quispitupac Quispitupac** en mi condición de Miembro Operador del Programa Informático de Similitudes de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas de la tesis/monografía/cuyo título es "**Morfología floral y número cromosómico de tres especies del género *Cinchona*: *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* (Rubiaceae) para el Perú"** presentado por el bachiller/magíster/egresado/licenciado/estudiante **Whinny Wensly Vicuña Zevallos** para optar el grado/titulo/especialidad de …Biólogo……..Mención:……Botánica……

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de .**12**…% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del profesor responsable (Turnitin)



DNI: 07622835

Nombres y apellidos …Eliana del Pilar Quispitupac Quispitupac….

Firma del director (a) EPCB:

UNMSM Firmado digitalmente por AGUILAR LUNA Silvia Ysabel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 23.08.2023 15:53:25 -05:00

A mis padres, por su amor y ser mi soporte incondicional en los momentos más difíciles de mi vida y a mis hermanos, por crecer juntos y compartir experiencias diarias a lo largo de estos años.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se desarrolló en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi alma mater, este lugar me permitió conocer increíbles personas, desarrollar aptitudes académicas y fortalecer mis convicciones sobre la investigación científica y la protección de nuestra diversidad vegetal y cultural en el Perú.

Agradezco a Dios por estar presente en mi vida. A mi papá y mi mamá, por su ejemplo de perseverancia, fortaleza y paciencia, además por todo lo brindado desde muy pequeña y ser una motivación diaria para mí; a mis hermanos Jennifer y Bryan por estar a mi lado en esta etapa universitaria y ser mis mejores amigos en los momentos malos y buenos; y a mis abuelitos por todo su amor e historias de vida.

Agradezco a la Dra. Joaquina Albán, por permitirme ser participe del laboratorio de Etnobotánica y Botánica Económica desde el inicio de mi orientación en la botánica y enseñarme la importancia de la ciencia para la valoración de nuestra flora y cultura. Asimismo, por asesorarme en este trabajo de investigación, compartirme sus conocimientos y experiencias en campo y laboratorio a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Mónica Arakaki, por brindarme su orientación y apoyo en este trabajo de investigación en el laboratorio de Sistemática y Diversidad Vegetal, y compartir su afecto por los procesos evolutivos de la diversidad vegetal y su importancia para su entendimiento y conservación.

A la Dra. Mery Suni y Kelly Huerta por su apoyo en el laboratorio de Fisiología Vegetal. Al Dr. Reynaldo Linares Palomino por sus consejos y palabras en este tiempo.

Agradezco a mis amigos por los años compartidos y viajes en la universidad, y a mis amigos del Museo de Historia Natural UNMSM por su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa.

Agradezco al grupo de investigación "Estudio de poblaciones amenazadas de la flora (FLORAM)" de la UNMSM, liderado por la Dra. Joaquina Albán. Al Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM por el apoyo económico brindado, al proyecto de investigación "Evaluación del potencial terapéutico y aplicabilidad de los extractos de quina (*Cinchona* spp: Rubiaceae) en Cepas de SARS-COV-2" (Resolución Rectoral N°00522-DGA-2020) y al fondo de Promoción de Trabajos de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM (Resolución Rectoral N°00916-DGA-2019).

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN I

ABSTRACT II

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MARCO TEÓRICO 4

2.1. Origen y distribución geográfica 4

2.2. Categoría taxonómica 5

2.3. Aspectos botánicos 6

2.4. Enfoque reproductivo 8

2.4.1. Sistema reproductivo 8

2.4.2. Heterostilia 9

2.4.3. Estudios reproductivos en el género *Cinchona* 11

2.5. Enfoque citogenético 11

2.5.1. El ciclo y la división celular 11

2.5.2. Formación de los cromosomas 12

2.5.3. Estudios citogenéticos de la familia Rubiaceae 13

2.5.4. Estudios citogenéticos en C*inchona.* 15

2.6. Usos de las especies de *Cinchona* 15

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 17

3.1. Hipótesis 17

3.2. Objetivos 17

3.2.1. Objetivo general 17

3.2.2. Objetivos específicos 17

4. MATERIALES Y MÉTODOS 17

4.1. Área de estudio 17

4.2. Colecta de material biológico 19

4.3. Caracterización morfológica floral 19

4.4. Caracterización morfométrica floral 20

4.5. Citología: conteo cromosómico 22

4.5.1. Germinación de semillas 22

4.5.2. Determinación de hora mitótica 23

4.5.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico 23

4.5.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico 26

5. RESULTADOS 27

5.1. Caracterización morfológica floral 27

5.2. Caracterización morfométrica floral 32

5.3. Citología: conteo cromosómico 40

5.3.1. Germinación de semillas 40

5.3.2. Determinación de la hora mitótica 42

5.3.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico 42

5.3.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico 43

6. DISCUSIÓN 46

6.1. Caracterización morfológica floral 46

6.2. Caracterización morfométrica floral 46

6.3. Citología: conteo cromosómico 49

6.3.1. Germinación de semillas 49

6.3.2. Determinación de la hora mitótica 50

6.3.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico 50

6.3.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico 51

7. CONCLUSIONES 53

8. RECOMENDACIONES 54

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estado de carácter de la estructura floral del género *Cinchona*…….21

Tabla 2. Variables morfológicas de la estructura floral de *Cinchona*……....*22*

Tabla 3. Procedimiento para la determinación del número cromosómico de *Cinchona krauseana*, *C. lancifolia* y *C. capuli*……..…..26

Tabla 4. Estado de carácter de la estructura floral del género *Cinchona*.……29

Tabla 5. Medidas florales de las especies de *Cinchona*…….……...34

Tabla 6. Prueba U de Mann – Whitney para las flores distilas de las especies de *Cinchona*.……....38

Tabla 7. Porcentaje de germinación en cada medio de cultivo para *Cinchona krauseana*, *C. lancifolia* y *C. capuli* ……..……..41

Tabla 8. Protocolo de conteo cromosómico de *Cinchona krauseana*, *C. lancifolia* y *C capuli*……..…..……..……..…...44

Tabla 9. Comparación de reportes previos y nuevos registros de números cromosómicos ……..…….……46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de Heterostilia……..…….……10

Figura 2. Progresión del ciclo celular durante la replicación del ADN y la división nuclear……..…….12

Figura 3. Ubicación geográfica de las especies de *Cinchona* ……18

Figura 4. Medidas morfométricas de las estructuras florales del género *Cinchona*.……....21

Figura 5. Proceso de siembra de semillas de las especies de *Cinchona*……...22

Figura 6. Preparación citológica de las raíces de las especies de *Cinchona*….....24

Figura 7. Inflorescencias de *Cinchona*……...…….....27

Figura 8. Estructuras florales de *Cinchona capuli*…….....29

Figura 9. Estructuras florales de *Cinchona krauseana*…….....30

Figura 10. Estructuras florales de *Cinchona lancifolia*…….....31

Figura 11. Diagrama de cajas de *Cinchona capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia*…....34

Figura 12. Diagrama de cajas de las flores brevistilas y longistilas de *Cinchona capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* ..……..……..38

Figura 13. Diagrama de dispersión de la relación entre la longitud del estambre y pistilo de las flores brevistilas y longistilas de las especies de *Cinchona*……...……39

Figura 14. Semillas y raíces de las especies de *Cinchona*…….…....41

Figura 15. Etapas de la división celular de *Cinchona krauseana*…….…....42

Figura 16. Número de cromosomas para las especies de *Cinchona*……...….44

RESUMEN

La familia Rubiaceae, del orden Gentianales, es una de las familias más grandes de plantas con flores. *Cinchona* está entre los 102 géneros reportados como más apreciado en el Perú, por sus propiedades medicinales, como antimalárico y su variedad de uso, hasta hoy, como antiinflamatorio, antimicrobiano y antiviral. El género *Cinchona* presenta escasos estudios sobre su morfología y morfometría floral. Previamente se había reportado la presencia de heterostilia en sus especies, con un importante rol en su biología reproductiva y posterior conservación. Asimismo, estudios citológicos en algunas especies del género reportan un número básico de n=17 cromosomas, con poliploides (4x) de tamaño muy reducido. Este estudio propone examinar la morfología y morfometría floral, así como determinar el número cromosómico y estandarizar un protocolo específico para el conteo cromosómico de tres especies del género *Cinchona*: *C. capuli*, *C. lancifolia* y *C. krauseana*, denominadas "quina" o "cascarilla", como un aporte a los estudios taxonómicos y evolutivos de las especies endémicas de Perú.

Palabras claves: *Cinchona*, morfología, Citología, Rubiaceae.

ABSTRACT

The Rubiaceae family, of the order Gentianales, is one of the largest families of flowering plants. *Cinchona* is among the 102 genera reported as the most appreciated in Peru, for its medicinal properties, as antimalarial and its variety of use until today, as anti-inflammatory, antimicrobial and antiviral. The genus *Cinchona* presents few studies on its floral morphology and morphometry. The presence of heterostyly in its species has been previously reported, with an important role in its taxonomic identification, reproductive biology and subsequent conservation. Likewise, cytologic studies of some species of the genus report a basic number of n=17 chromosomes, with polyploids (4x) of very small size. In this study we propose to perform floral morphological and morphometrical examinations, as well as to determine the chromosome number and the standardize a specific protocol for chromosome counting of three species of the genus *Cinchona*: *C. capuli*, *C. lancifolia* and *C. krauseana*, known as "quina" or "cascarilla", as a contribution to taxonomic and evolutionary studies of Peruvian endemic species.

Key words: *Cinchona*, morphology, cytology, Rubiaceae.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Rubiaceae forma uno de los más grandes grupos de angiospermas (Robbrecht 1998), dentro del orden Gentianales, (APG IV), incluyendo alrededor de 620 géneros y 13,000 especies (Govaerts et al. 2006) con predominio de especies arbóreas y arbustos que se encuentran en varios estratos de los bosques tropicales (Burger y Taylor 1993), presentando una mayor variedad reproductiva, caracterizadas por mecanismos florales que poseen diferentes tipos de organización del androceo y gineceo (Robbrecht 1988); además, su gran diversidad taxonómica y ecológica, lo convierten en un grupo modelo para estudios evolutivos y biogeográficos (Antonelli et al. 2009; Bremer 2009). Por lo tanto, es necesario conocer la biología floral, fenología de la floración, sistema reproductivo y el agente polinizador que posee una especie para comprender los aspectos de su biología reproductiva (Primack 1980, 1985),

La heterostilia es considerada un polimorfismo floral con base genética, la forma distilia (dos tipos o tamaños de estilo) o tristilia (tres tipos), son tipos de morfología floral diferenciados por el posicionamiento recíproco de la altura de los estigmas y anteras, denominado hercogamia recíproca (Ganders et al. 1979; Lloyd y Webb 1992) que ocurre aproximadamente en 28 familias de angiospermas, y en la familia Rubiaceae se encontró alrededor de 91 géneros y 416 especies con presencia de distilia (Bahadur 1968, Ganders 1979, Ollerton y Cranmer 2002), registrada principalmente en la subfamilia Rubioidae y tribu Psychotrieae (Robbrecht1988, Barrett y Richards 1990), donde la distilia se considera una característica primitiva (Barrett 1992). Este polimorfismo morfológico suele asociarse con un sistema de incompatibilidad intramorfo y propio (Barrett y Cruzan 1994), y se ha evidenciado que el carácter morfológico y fisiológico ha evolucionado varias veces en paralelo en las Angiospermas (Barrett 2019), siendo importante diferenciar sus

características para aportar a la resolución de la compleja taxonomía de sus especies, y el conocimiento de su biología reproductiva y conservación.

Respecto a los estudios taxonómicos en las plantas, una herramienta imprescindible es la citogenética, la cual, en conjunto con los estudios moleculares, han permitido en los últimos años tener una mejor visión de los procesos evolutivos en las plantas. La carencia de estudios citológicos y citogenéticos en la familia Rubiaceae puede deberse a la falta de colecciones científicas, así como a las dificultades técnicas para su estudio. Se conoce que una proporción grande de las especies de plantas superiores son poliploides. Averett (1981) estimaba que aproximadamente el 36% de las angiospermas eran poliploides, pero entre el 70 y 80% eran poliploides ancestrales; es decir, presentaban poliploidía en su historia evolutiva, además de alcanzarse altos niveles de ploidía en algunos géneros (Grant 1986).

El número de cromosomas y nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma porque pueden mostrar las relaciones existentes entre las especies de un género o familia y clarificar el origen de los híbridos naturales y variedades cultivadas. Además, gran parte de las características reproductoras y evolutivas de las especies se explican por el conocimiento de sus rasgos citológicos (Valladolid et al. 2004).

El género *Cinchona* es nativa de la región andina de América del Sur y las montañas del Sur de América Central (Andersson 1998, Maldonado et al. 2015), formado por 23 especies (Albán 2013) conocidas como "quina" o "cascarilla", siendo *Cinchona officinalis*, la más resaltante por su efecto medicinal. La importancia de este género radica en el uso de la corteza de *Cinchona* porque contienen alcaloides cristalizables, entre quinina y sus derivados, siendo el único tratamiento efectivo contra la malaria (Hodge 1947, Kaufman y Ruveda 2005). En consecuencia, las cortezas de las especies silvestres de *Cinchona* fueron ampliamente cosechadas,

reduciendo sustancialmente las poblaciones de algunas de ellas (Martin y Gandara 1945).

El género *Cinchona* presenta flores hermafroditas y esta condición puede facilitar la autopolinización, teniendo consecuencias negativas que conlleva la autofecundación y la consanguinidad (Charlesworth y Charlesworth 1987, Barrett 2002 a, 2022b, Cesaro et al. 2004, Bailey y McCauley 2006) y en algunas especies de *Cinchona* se ha reportado la presencia de heterostilia (Andersson 1998, Albán 2013); sin embargo, los estudios morfológicos y morfométricos florales son escasos para este género; así como los estudios citológicos y citogenéticos. Mathew (1979), mencionó problemas en la estabilidad de los cromosomas y un exceso de tinción del citoplasma, así como el pequeño tamaño y difícil observación de sus cromosomas (Mathew y Philip 1978, Kiehn 1995).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen y distribución geográfica

Inicialmente se consideraba como el centro de diversificación de las Rubiaceae al Neotrópico, como originarias de América Central y de los Andes (Gentry 1982). Sin embargo, estudios filogenéticos (Bremer y Erikson 2009), colocan a *Luculieae* y *Coptosapelteae* en la base, indicando de esta manera que el origen de las Rubiaceae sería en el sudeste de Asia. Siendo descritas como originarias del Paleotrópico, con dispersión boreotropical hacia tierras bajas tropicales de América Central y América del Sur, mostrando la evolución de las Rubiaceae neotropicales y su progresividad del oeste al este del levantamiento andino, trajo consigo una serie de incursiones marinas y sistemas lacustres que bloquearon la dispersión de plantas, moldeando la distribución de la flora moderna (Antonelli et al. 2009).

El clima donde se distribuyen las especies del género *Cinchona* corresponde predominantemente al de "ceja de selva" o "ceja de montaña", generalmente cálido y húmedo, con precipitaciones abundantes y persistentes, y nubosidad casi todo el año (Zevallos 1989).

Pino y Taylor. (2006) registraron seis especies endémicas del género *Cinchona* en el Perú, pero posteriormente Albán (2013) registro cinco especies que ampliaron su distribución geográfica a otros países. Las especies fueron *Cinchona fruticosa* y *Cinchona scrobiculata* para Ecuador; *Cinchona micrantha* y *Cinchona pyrifolia* a Bolivia; y *Cinchona krauseana* para ambos países. De esta manera, solo *Cinchona glandulifera* se mantiene como endémica, ubicada en los departamentos de

Amazonas, Cajamarca, Huánuco y Puno; además, registro a *Cinchona nítida como* una nueva especie endémica, ubicada en los departamentos de Huánuco y Pasco, teniendo como resultados dos especies endémicas para Perú.

2.2. Categoría taxonómica

Las Rubiaceae forman uno de los más grandes grupos de angiospermas (Robbrecht 1998), dentro del orden Gentianales, (APG IV), incluyendo alrededor de 620 géneros y 13,000 especies (Govaerts et al. 2006). Este grupo es monofilético, reconociéndose a nivel de subfamilias a *Coffeoideae* y *Cinchonoideae*, en base a la cantidad de óvulos por lóculo, siendo uno o más de dos respectivamente (Schumann 1891). Posteriormente, fueron reorganizadas, primero en cinco (Bremekamp 1966), y luego en cuatro subfamilias: Antirheoideae, Cinchonoideae, Ixoroideae y Rubioideae (Robbrecht 1988). La última clasificación, basada en estudios moleculares, reconoce a tres subfamilias (Cinchonoideae, Ixoroideae y Rubioideae) y más de 40 tribus. La subfamilia Cinchonoideae incluye nueve tribus (Bremer 2009), entre ellas la Cinchoneae.

La tribu Cinchoneae incluye ocho géneros, tras la remoción de algunos géneros y la adición de uno nuevo: *Cinchona, Joosia, Ladenbergia, Remijia, Stilpnophyllum, Cinchonopsis*, *Maguireocharis* y *Pimentelia*, formando los seis primeros géneros un grupo monofilético (Anderson 1998).

El género *Cinchona* es un grupo monofilético bien soportado en las Rubiaceae, basado en evidencia morfológica y molecular (Andersson y Antonelli 2005, Manns y Bremer 2010). Comprende 23 especies (Albán 2013) comúnmente llamadas "quina"

o “cascarilla", siendo *Cinchona officinalis*, la más conocida desde el punto de vista medicinal.

En Perú, la familia Rubiaceae está representada por 110 géneros y 782 especies incluyendo 96 endemismos en 46 géneros, entre ellos el género *Cinchona* con dos especies endémicas (Albán 2013).

Reino:	Plantae
Sub reino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Rubiaceae
Género:	*Cinchona*

2.3. Aspectos botánicos

La descripción botánica del género *Cinchona* inició con La Condamine en 1737, y posteriormente Linneo en 1753 describió al género *Cinchona* y su especie tipo *(Cinchona officinalis* L.) Las especies del género *Cinchona* suelen ser arbustos o árboles, el tronco puede descascararse y su corteza se caracteriza por su sabor amargo; tienen estipulas interpeciolares diferentes, libres, no fusionadas alrededor del peciolo, caducas o persistentes, triangular a oblonga liguladas u obovadas, algunas veces reflexa, unidas cara a cara en la yema glandular en la base (Anderson 1998).

Las flores del género *Cinchona* están dispuestas en inflorescencias básicamente en una cima dicasial, cabezuela o reducida a una sola flor, actinomorfas o raramente zigomorfas o bilabiadas, hermafroditas (o unisexuales y en plantas dioicas), y frecuentemente presentan heterostilia. Cáliz, 4-5 lobulado, a veces acrescente en el fruto. Corola gamopétala, hipocraterimorfa, rotácea o infundibuliforme, estivación valvar o contorta; textura gruesa con color blanco, crema, rosado, rojo o púrpura; el tubo de la corola externamente es puberulento, pubescente o glabro, internamente es glabro, levemente hirsuto o villoso, ausencia o presencia de tricomas en el interior; lóbulos de la corola 5 raramente 4 o 6, triangulares, valvados, con extensiones villosas o papilares en el interior de las márgenes del limbo. Estambres tantos como los lóbulos de la corola, alternos con ellos, epipétalos en tubo corolino; anteras biloculares, introrsas, dorsifijas o basifijas, usualmente libres con dehiscencia longitudinal, por excepción poricida. Ovario ínfero o raramente súpero o semiínfero; carpelos 2 o más, generalmente bilocular, placentación axilar o aparentemente basal, a veces varios lóculos, ovario unilocular con placentación parietal; óvulos por lo general numerosos en cada lóculo; estilo 1, delgado, a menudo bipartido; estigmas usualmente lineares, 1 en cada rama del estilo, o 1 solo bilobulado (Mostacero et al. 2002, Albán 2013). Fruto cápsula septicida, ovoide, oblongo o cilíndrico, dehiscencia acropétala o basipétala; posteriormente las valvas se desprenden en el ápice; valvas de paredes delgadas y levemente leñosas (Albán 2013).

Cinchona se distingue de otros géneros de la tribu Cinchoneae por tener estípulas valvadas con colectores dispuestos en varias filas, lóbulos de la corola densamente vellosos en el interior a lo largo de los márgenes, y filamentos de longitud marcadamente desigual en flores heterostilias (Andersson 1998). A pesar de su inclusión en los últimos estudios sistemáticos, filogenéticos, biogeográficos y de

biodiversidad (Andersson 1998, Antonelli et al. 2009, Maldonado et al. 2015), *Cinchona* sigue siendo un género poco estudiado (Maldonado et al. 2017).

2.4. Enfoque reproductivo

2.4.1. Sistema reproductivo

Las angiospermas se encuentran en gran parte de los ecosistemas (Renner y Ricklefs 1995) y se caracterizan principalmente por la presencia de flores, bisexuales representando el 90% y unisexuales, masculinas o femeninas (Barrett y Hough 2013); teniendo una alta variación en la posición de sus estructuras reproductivas como el despliegue espacial y temporal de sus órganos reproductivos (pistilos y estambres), esta diversidad se ve reflejada en una extensa gama de sistemas reproductivos (Barrett 2002).

Los sistemas reproductivos se caracterizan por presentar fenómenos y rasgos relacionados con los procesos de polinización y formación del embrión que incluyen órganos sexuales (presencia o ausencia), disposición intrafloral, individual y poblacional, compatibilidad genética entre gametos, mecanismos asexuales, variación temporal en la maduración de sexos o barreras morfológicas florales (Bawa y Beach 1981, Cardoso et al. 2018). Además, presenta una continuidad de sistemas de apareamiento, como la autogamia estricta hasta la polinización cruzada obligada (Barrett et al. 1996) en función de factores intrínsecos y extrínsecos (Barrett y Eckert 1990, Abe 2001) como las gradientes altitudinales y ecológicas (Dafni 1994). En ese sentido, influye en la estructura genética de poblaciones y en su potencial reproductivo (Ashton 1969, Scariot et al. 1991, Barrett 2003).

La biología floral es importante para el sistema reproductivo de las plantas porque estudia la relación entre las flores y su ambiente (biótico y abiótico) respecto al tipo de polinizador y transferencia de polen (Lloyd y Schoen 1992, Harder y Barrett 2006, Mansilla et al. 2010), siendo su objetivo explicar la función de los órganos florales, mediante el análisis morfológico floral, comportamiento de agentes polinizadores, periodo de floración, tiempo de receptividad del estigma, maduración de las anteras, despliegue y longevidad floral (Primack 1980, 1985, Zimmerman 1988, Lloyd y Schoen 1992, Barrett 2003).

El sistema reproductivo sexual comprende los sistemas florales, caracterizados por la presencia de flores bisexuales que utilizan diferentes mecanismos para facilitar la autopolinización o polinización cruzada y poder alcanzar el éxito reproductivo. En el caso de la polinización cruzada, la separación espacial (hercogamia) y temporal (dicogamia) de los órganos sexuales (Mandujano et al. 2010, Cardoso et al. 2018), optimizan las funciones masculinas y femeninas de la flor; respecto a la autopolinización, se desarrollan estrategias como la autofecundación para garantizar el éxito reproductivo. Entre ellas, se encuentra la heterostilia, que es uno de los mecanismos que promueve la polinización cruzada y disminuye la perdida de polen (Darwin 1877, Lloyd y Webb 1992a, 1992b).

2.4.2. Heterostilia

La heterostilia es un polimorfismo floral con base genética en las poblaciones de las plantas, caracterizada por la diferenciación longitudinal entre el estilo y el estambre (hercogamia recíproca) ocasionando la aparición de dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales (Webb y Lloyd 1986, Barrett 1992). Las especies distilias presentan flores brevistilas (estilo corto y estambre largo) y longistilas (estilo largo y estambre corto); las tristilias presentan flores con estilo corto, medio y

largo, donde cada flor tiene estambres con alturas de anteras que corresponde a las alturas del estigma de los otros morfos (Darwin 1877, Ganders 1979, Naiki 2012).

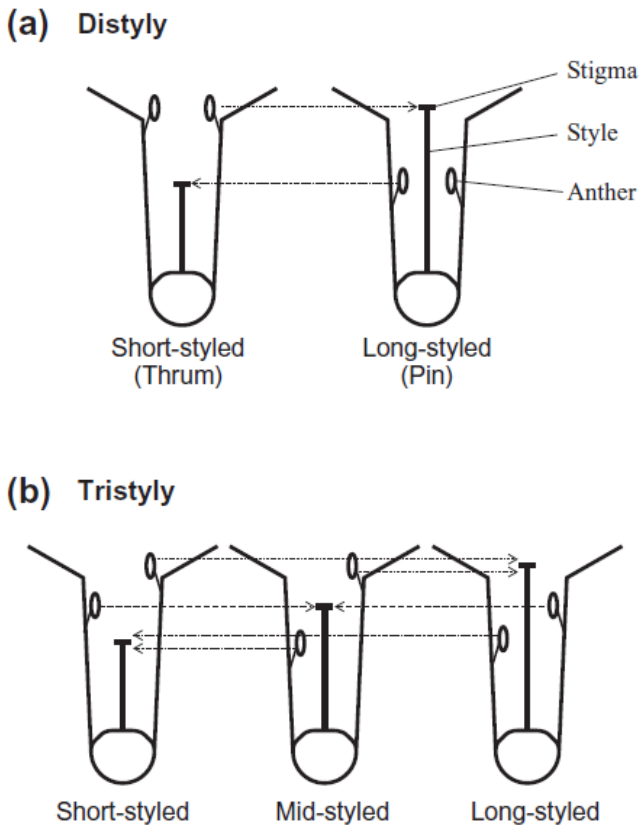


Figura 1. Presencia de heterostilia: (a) Flores distilas (b) Flores tristilas.

Fuente: (Naiki 2012)

La distilia presenta caracteres morfológicos (partes florales, tamaño de las anteras, morfología del estigma y papilas estigmáticas, dimorfismo del grano de polen) y fisiológicos (sistema de incompatibilidad heteromórfica que impide las fecundaciones propias e intramorfas) (Barrett y Richards 1990, Barrett 1992, Dulberger 1992, Lloyd y Webb 1992, Barrett et al. 2000). En consecuencia, cada morfo floral produce frutos y semillas cuando son polinizados con un morfo floral opuesto que influye en el flujo de polen en la naturaleza poblacional (Ganders

1979, Barrett 1992a, Dulberger 1992, Teixeira y Machado 2004a, 2004b, Lopes y Buzato 2005).

2.4.3. Estudios reproductivos en el género *Cinchona*

En *Cinchona officinalis*, las plantas pueden formar flores a partir de los 4 años de edad siendo las aves sus principales agentes polinizadores. Respecto a la época de floración del género *Cinchona* suele iniciar en febrero y disminuir en mayo; la fructificación, desde abril hasta junio; y consecuentemente las semillas pueden ser colectadas entre mayo y junio (Jerez 2017). Aunque en algunos casos se ha observado que la floración y fructificación de sus especies puede variar de acuerdo a su distribución geográfica.

Sobre la germinación del género *Cinchona* en su ambiente natural suele demorar entre 2 a 3 semanas, asimismo el crecimiento de las plántulas es muy lento (Jerez 2017). Actualmente las poblaciones de las especies de *Cinchona* han disminuido debido a factores antropogénicos como la quema para apertura de campos de cultivo, o el uso de la madera (Mejía 2014), y en los últimos años debido a la intensificación de su uso medicinal.

2.5. Enfoque citogenético

2.5.1. El ciclo y la división celular

El ciclo celular es un mecanismo esencial para todos los organismos vivos y es considerado como un proceso regulador y conservador para la proliferación celular (Dewitte y Murray 2003). El ciclo celular está constituido por la interfase y la Fase M.

La interfase incluye a las fases G1, S y G2, se replica el ADN y se fabrica todo lo necesario para la producción de las dos células hijas (Vermeulen et al. 2003). En la fase G1, ocurre la preparación de las células para la duplicación del ADN, proceso que se lleva a cabo en la Fase S (síntesis del ADN); y la fase G2 las células se preparan para la posterior división nuclear llamada fase M.

La Fase M se caracteriza por la división del núcleo en la mitosis y posteriormente la división del citoplasma en la citocinesis (Maes et al. 2017), produciendo dos células hijas idénticas genéticamente a la célula madre (Marston y Amon 2005, Wijnker y Schnittger 2013).

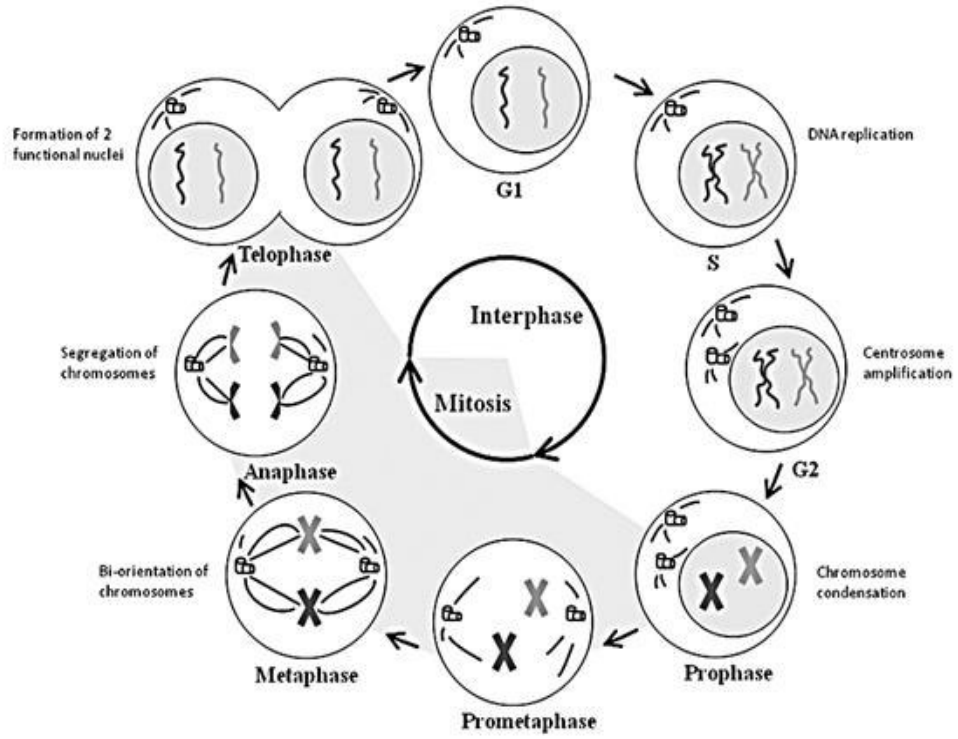


Figura 2. Progresión del ciclo celular durante la replicación del ADN y la división nuclear. Fuente: Maes et al. (2017).

2.5.2. Formación de los cromosomas

En la interfase (G1, S y G2) los cromosomas se encuentran descondensados, son replicados (formación de cromátidas hermanas) en la fase S y se preparan

para la segregación en la fase G2. La condensación y segregación cromosómica ocurre en la fase M, específicamente en la mitosis que comprende a la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

La mitosis inicia con la profase, caracterizada por la condensación de los cromosomas; prometafase, ruptura de la membrana nuclear y formación del huso mitótico; metafase, los cromosomas alcanzan su máxima condensación, ocurre la biorientación de las cromátidas hermanas en la placa ecuatorial y se genera una estructura doblemente simétrica (Glotzer et al. 1991, Lacadena 1996, Vermeulen et al. 2003, Maes et al. 2017); anafase, la cohesión desaparece en toda la longitud de las cromátidas hermanas, permitiendo ser separados por microtúbulos que emanan de los polos opuestos del huso; y por último, la telofase, una vez separadas las cromátidas hermanas se forman dos núcleos funcionales. Posteriormente, la citocinesis originará dos células y cuando se completa la separación, las cromátidas se descondensan y comienza un nuevo ciclo celular (Glotzer et al. 1991, Losada y Hirano 2001, Mcintosh 2016).

En las células somáticas se encuentran dos juegos de cromosomas homólogos, cada uno de los cuales proviene de sus progenitores masculino y femenino, denominándose a esta condición como diploide (2n). En algunas especies, las células somáticas presentan más de dos juegos de cromosomas, recibiendo el nombre de poliploides (2n=3x, 4x, 5x, etc.). Siendo la poliploidización un proceso y no un evento (De Wet 1980), se constituye como el rasgo más conspicuo de la evolución cromosómica en las plantas superiores (Stebbins 1971).

2.5.3. Estudios citogenéticos de la familia Rubiaceae

Un estudio realizado por Kiehn (1995), presentó resultados citológicos que corroboran la hipótesis molecular acerca de las relaciones evolutivas, por

ejemplo, una estrecha asociación de Hedyotideae y Spermacoceae (Bremer et al. 1995, Natali et al. 1995). En combinación con resultados de otros campos de investigación (biología molecular, morfología y fitogeografía), los caracteres cariotípicos han demostrado ser útiles para la comprensión de las relaciones entre grupos de Rubiaceae taxonómicamente difíciles (Kiehn 1991).

Se conoce el número de cromosomas de aproximadamente 730 especies de Rubiaceae, en todas las agrupaciones, por lo que permite una consideración razonable con respecto al número base, poliploidía, distribución, relaciones inter/intra específicas, ascendencia y evolución de la familia. Sin embargo, esto es solo alrededor del diez por ciento de la familia.

Los números base de los géneros en la familia revelan la presencia de n=6 a n=14 y series de n=17, siendo el número base predominante en la familia n=11 (2,3,6,8,10,12,14,20) y seguido de n=9 (4,6,8) (Lee 1985). De acuerdo a Stebbins (1950), se ha producido un alto grado de diferenciación morfológica en la familia sin numerosos cambios en el número de cromosomas.

Los primeros conteos cromosómicos de la familia Rubiaceae iniciaron con Homeyer (1932, 1935); posteriormente Fagerlind (1934) registro el número cromosómico de algunas especies de los géneros como *Asperula, Coffea, Galium, Gardenia, Ixora, Pentas, Psychotria, Rubia* y otros; Raghavan y Srinivasan (1941) realizaron estudios citológicos de 20 especies de *Spermacoce* y *Guettarda*; otro estudio fue en la región de Kerala y Tamil Nadu en el sur de la India con 15 tribus, 100 especies y 28 géneros como *Cinchona, Coprosma, Pentas y Rodeletia* (Mathew y Philip 1978, 1979); otro en el Sur de la India de 41 especies de 24 géneros como *Oldenlandia*, *Pavetta*, Psychotria y otros, mostraron un rango de 2n=18 a 2n=72 (Selvaraj 1987). Los mayores conteos cromosómicos de Rubiaceae fueron publicados para plantas de África, India y

Nueva Zelanda, siendo escasas las publicaciones para América Central y Madagascar (Kiehn 1991).

Estudios realizados en varios géneros de Rubiaceae por Kiehn (1985, 1986, 1991) sugieren que los niveles de ploidía en Rubiaceae iban de 2n a 20-22n. Aunque la familia Rubiaceae ha sido estudiada a nivel taxonómico, filogenético y evolutivo, los estudios cromosómicos son escasos, como sucede con otros grandes grupos de dicotiledóneas. Esta carencia de estudios citológicos puede deberse a la distribución de los miembros de la familia, las técnicas usadas, la estabilidad de los cromosomas y un exceso de tinción del citoplasma (Mathew y Philip 1979). Sin embargo, se han contabilizado taxones de todas las agrupaciones. Por lo tanto, esto permite una consideración razonable con respecto al número base, poliploidía, distribución, inter/intra relación, ascendencia y evolución de la familia.

2.5.4. Estudios citogenéticos en C*inchona.*

Los estudios del cariotipo de *Cinchona* en el mundo son muy escasos debido al pequeño tamaño y difícil observación de los cromosomas de las células somáticas (Mathew y Philip 1979, Kiehn 1995). A partir de estudios en la fertilidad del polen, se encontraron células en la etapa meiótica con n=17 cromosomas, siendo el número básico de *Cinchona calisaya* Wedd. (Dawson 1948, Mendes 1939, Selvaraj 1948, Mathew y Philip 1979), *Cinchona ledgeriana* (Howard) Bern.Moens ex Trimen, *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubecens* Vahl. (como *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotzsch, Mathew y Philip 1978).

2.6. Usos de las especies de *Cinchona*

La familia Rubiaceae presenta especies con una considerable importancia económica, debido a los alcaloides acumulados en la corteza, raíces, hojas, flores, frutos, semillas y polen, de manera que varias especies presentan propiedades medicinales (Delprete, 2004). Algunas especies como del género *Cinchona*, son conocidas por su efecto antipalúdico y reconocidas como parte de la historia natural del Perú (Herrera 1936).

Las especies de *Cinchona* fueron reconocidas por sus propiedades medicinales y alcanzaron una alta estima en el siglo XVIII hasta mediados del siglo por la eficacia de sus alcaloides como la quinina, por su capacidad de inhibir el crecimiento y reproducción de las diversas especies de *Plasmodium* (Protozoario) en el tratamiento de la malaria. Posteriormente, la hidroxicloroquina fue sintetizada a partir de sus cortezas y luego remplazada por otros medicamentos (Madsen 2005, Kaufman y Ruveda 2005). De su corteza se obtiene un promedio de 40% de alcaloides cristalizables (Hodge 1947). Los cuatro principales alcaloides de *Cinchona* (quinina, quinidina, cinchonina y cinchonidina) poseen actividad antipalúdica, pero tienen diferentes perfiles farmacológicos (Bruce-Chwatt 1990). En la región andina, la corteza ha sido ampliamente cosechada de árboles silvestres, lo que ha reducido sustancialmente las poblaciones de algunas especies (Martin y Gandara 1945). La quinina sigue siendo utilizada hasta el día de hoy como un fármaco potente contra la malaria (Gachelin et al. 2017), además, los alcaloides de *Cinchona* tienen otros usos conocidos como antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante, antiviral e ingrediente de agua tónica (Inklebarger et al. 2020). En los últimos años el uso del agua tónica se ha extendido especialmente en Estados Unidos y países europeos (Leffingwell 2003, Ulloa 2006).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La morfología floral y el número cromosómico de tres especies de *Cinchona* permitirá tener un mayor entendimiento de la biología reproductiva del género.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Caracterizar la morfología floral y determinar el número cromosómico de las tres especies del género *Cinchona*.

3.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la morfología y morfometría de las estructuras florales de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia*.
- Determinar el tipo de dimorfismo floral (distilia vs. tristilia) de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia.*
- Estandarizar un protocolo de la preparación citológica para el conteo cromosómico de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

Las flores y semillas de *Cinchona krauseana* L. Andersson fueron colectadas en el mirador de Huancas, provincia de Chachapoyas en el departamento de Amazonas en el año 2016 y 2021, *Cinchona lancifolia* Mutis en las localidades de Cerro Cataluco, provincia de Huancabamba en el departamento de Piura en el 2016 y 2017; y *Cinchona capuli* L. Andersson en la provincia de Ayabaca en el departamento de Piura en 2016 (Fig. 3).

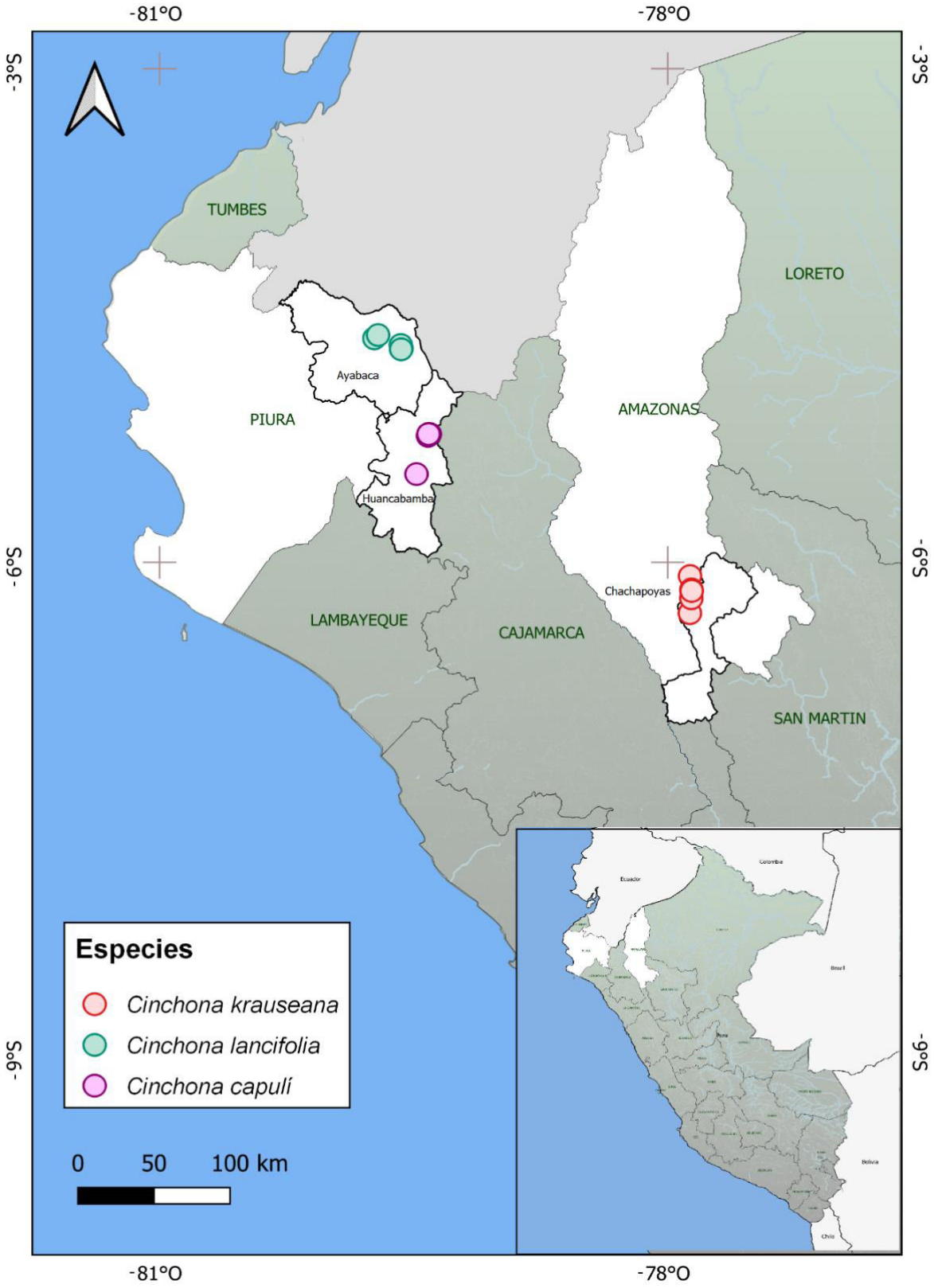


Figura 3. Ubicación geográfica de las especies de *Cinchona* incluidas en el presente estudio.

4.2. Colecta de material biológico

Se trabajó con semillas y flores de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* colectadas en los años 2016, 2017 y 2021 de la colección de *Cinchona* del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica del Museo de Historia Natural de UNMSM.

El material colectado para este trabajo está circunscrito a lo obtenido durante la ejecución de trabajos taxonómicos en el género *Cinchona* por el Grupo de Investigación FLORAM (Estudio de las Poblaciones Amenazadas de la Flora) de la UNMSM, liderado por la Dra. Joaquina Albán Castillo.

4.3. Caracterización morfológica floral

Se realizó la caracterización morfológica y reconocimiento de las estructuras florales de cada especie mediante revisión bibliográfica de las descripciones morfológicas florales (Andersson 1998), muestras herborizadas de la colección de *Cinchona* del Perú del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica del Museo de Historia Natural de la UNMSM y otras fuentes de información, los cuales se llevaron en conjunto con el asesoramiento de la especialista del género *Cinchona.* El análisis de los datos se obtuvo mediante la observación con microscopio estereoscópico para la ausencia o presencia de los caracteres respectivos de las flores, como la pubescencia interna y/o externa de la corola, entre otros (Albán et al. 2022, en prensa) (Tabla 1).

Tabla 1. Estado de carácter de la estructura floral del género *Cinchona*.

Carácter	Estado de carácter
Flores	Fragancia
	Heterostilia: Distilia
Corola	Color del tubo de la corola
	Pubescencia externa de la corola
	Pubescencia interna de la corola
	Pubescencia interna en la inserción del estambre en la corola
	Superficie interna del tubo de la corola
	Superficie interna de la corola
Cáliz	Pubescencia del cáliz
	Lóbulos del cáliz
	Disposición del cáliz
	Coléteres
	Disposición de coléteres
Estambres	Proporción de inserción del filamento en el interior de la corola
	Pubescencia del filamento
	Inserción de las anteras
Pistilo	Pubescencia del estilo
	Forma del estigma
	Proporción del estigma en relación al estilo
	Pubescencia del ovario

4.4. Caracterización morfométrica floral

Se utilizó 25 a 30 flores para cada una de las especies de *Cinchona* y se midió 23 variables morfológicas mediante el estereoscopio y el software AmScope para obtener el largo del tubo de la corola (LTC), ancho del tubo de la corola (ATC), largo de la antera del estambre (LAE), largo del ovario (LO), otros (Fig. 4, Tabla 2). El análisis fue con el programa IBM SPSS Statistics Versión 25 para la estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, valores máximo y mínimo), posteriormente se verificó la normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk para las variables y poder realizar un análisis no paramétrico de U de Mann Whitney para el dimorfismo floral (Delphy Meagher 1995; Watanabe et al. 2015; Florentin et al. 2016) según corresponda; también se realizó diagrama de cajas con Rstudio versión 4.0.1. para la comparación de variables de los caracteres de las tres especies.

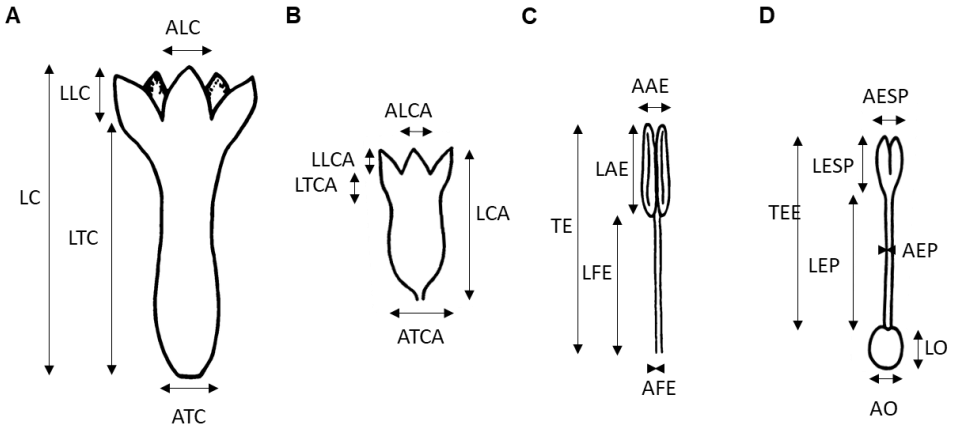


Figura 4. Medidas morfométricas de las estructuras florales del género *Cinchona*. **A.** Corola. **B.** Cáliz. **C.** Estambres. **D.** Pistilo.

Tabla 2. Variables morfológicas de la estructura floral de *Cinchona*.

Carácter	Mediciones	Sigla
Flor	Tamaño longitudinal de la flor	TL
Corola	Largo del tubo de la corola	LTC
	Ancho del tubo de la corola	ATC
	Largo del lóbulo de la corola	LLC
	Ancho del lóbulo de la corola	ALC
	Longitud de la corola	LC
Cáliz	Largo del tubo del cáliz	LTCA
	Ancho del tubo del cáliz	ATCA
	Largo del lóbulo del cáliz	LLCA
	Ancho del lóbulo del cáliz	ALCA
	Longitud del cáliz	LCA
Estambre	Largo del filamento del estambre	LFE
	Ancho del filamento del estambre	AFE
	Largo de la antera del estambre	LAE
	Ancho de la antera del estambre	AAE
	Tamaño longitudinal del estambre	TE
Pistilo	Largo del estilo del pistilo	LEP
	Ancho del estilo del pistilo	AEP
	Largo del estigma del pistilo	LESP
	Ancho del estigma del pistilo	AESP
	Tamaño longitudinal del estilo y estigma	TEE
	Largo del ovario	LOP
	Ancho del ovario	AOP

4.5. Citología: conteo cromosómico

4.5.1. Germinación de semillas

Se inició con la preparación de materiales para la siembra, esterilizados en autoclave y colocados dentro de la cámara de siembra. Se desinfectó las semillas de *Cinchona krauseana*, *Cinchona lancifolia* y *Cinchona capuli* de posibles patógenos con hipoclorito al 4% durante 10-15 minutos, luego se enjuagó 5 veces con abundante agua destilada para eliminar cualquier resto del desinfectante.

Se utilizó tres medios de cultivo como nitrato de potasio - KNO_3 (2000 mg/L) (Besnier 1989, Ruiz 2014, Cancho 2017); MS (g/L) (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa (5 g/L) y fitogel (4.5 g/L); y agua destilada. Agrupando de 8 a 10 semillas para cada placa Petri y su posterior siembra en la cámara de cultivo (Fig. 5). Finalizada la siembra de las semillas se realizó el control de las mismas para la obtención del ápice radicular de las raíces de cada semilla.

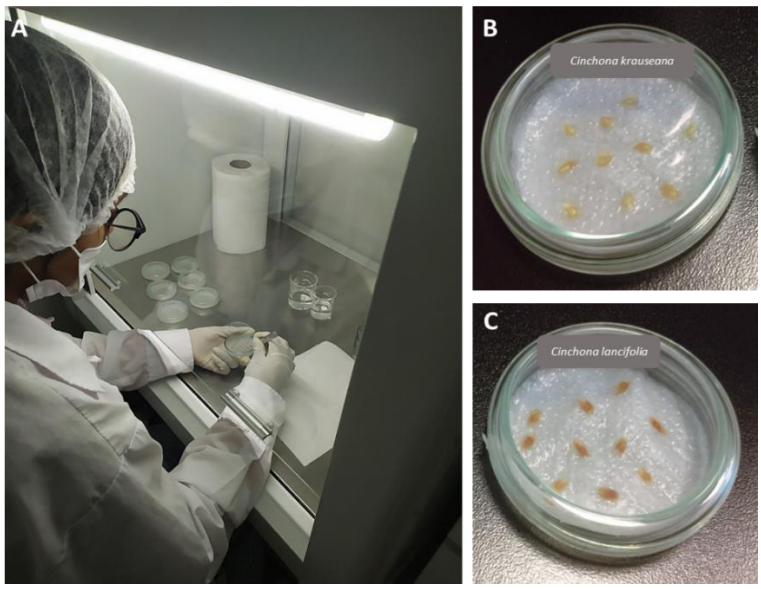


Figura 5. Proceso de siembra de semillas de las especies de *Cinchona*. **A.** Siembra en la cámara de cultivo. **B.** *Cinchona krauseana* en agua destilada. **C.** *Cinchona lancifolia* en nitrato de potasio (KNO_3).

4.5.2. Determinación de hora mitótica

El rango empleado para determinar la hora mitótica más efectiva (Cota y Philbrick 1994) fue cada 30 minutos desde las 6:00 a.m. hasta la 1:00 p.m. Se experimentó con 52 y 17 semillas de *C. krauseana* y *C. lancifolia* respectivamente, la repetición para cada horario fue aleatorio debido al número de semillas y germinación en diferentes horarios y días. Además, se usó por completo las semillas germinadas, debido al pequeño tamaño de la raíz.

4.5.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico

Se empleó diferentes procedimientos y variantes del pretratamiento, fijación, hidrolisis y tinción de las células, basados en protocolos establecidos (Speranza 2003, Sherped 2010) para estandarizar un protocolo de la preparación citológica para el conteo cromosómico de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia*.

Prefijación o pretratamiento: Se usó 8-Hidroxiquinolina como inhibidor celular a diferentes concentraciones (0.001M y 0.003M) y tiempos de exposición (1 - 4 horas), y agua destilada a 4°C durante 4 y 24 horas.

Fijación: Se empleó la solución Farmer (etanol y ácido acético glacial en una proporción 3:1) durante 24 horas. Posteriormente fue opcional el realizar el conteo inmediatamente o conservar la muestra en etanol al 70% a 4°C por tiempo indefinido.

Hidrólisis: Se utilizó diferentes reactivos (Tabla 3) para desnaturalizar la capa epidérmica del ápice radicular, se diseccionó las raíces usando el microscopio estereoscópico binocular que consistió en separar la raíz de la semilla y a su vez retirar la cubierta o caliptra de la parte superior del tejido meristemático apical.

Tinción: Primero se añadió el ácido acético y luego la orceína acética, ambos reactivos con diferentes concentraciones para obtener una mejor fijación de la coloración**;** adicionalmente se expuso la lámina al calor (Tabla 3) para ajustar la temperatura de la orceína acética.

Por último, se realizó el *Squash* sobre una lámina para expandir las células.

La observación de las células y cromosomas se efectuó en un microscopio óptico Leica DM500 con aumento de 100X y aceite de inmersión. Las fotografías se obtuvieron con la cámara incorporada del microscopio (Fig. 6).

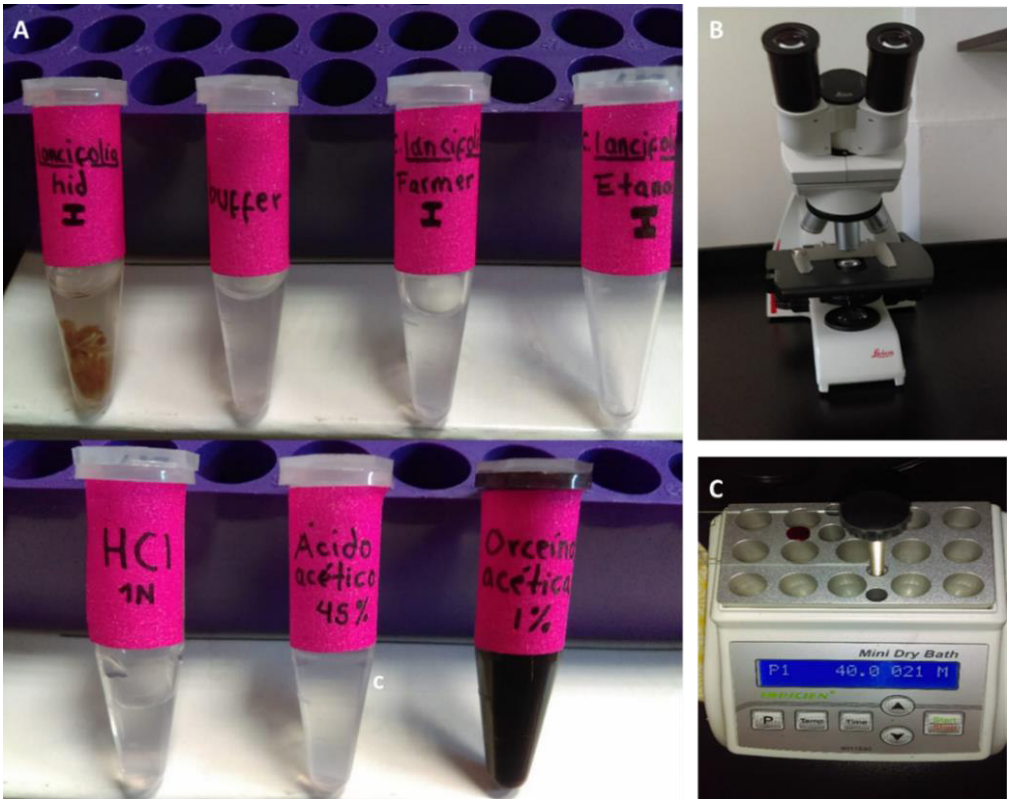


Figura 6. Preparación citológica de las raíces de las especies de *Cinchona*. **A.** Reactivos químicos para el pretratamiento, fijación, hidrolisis y tinción. **B.** Microscopio Estereoscópico binocular. **C.** Mini Dry Bath.

Tabla 3. Procedimientos y variantes de la preparación citológica para el conteo cromosómico de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia*.

Procedimiento	Reactivo	Concentración	Temperatura	Tiempo
Pretratamiento	8-Hidroxiquinolina	0.001M	22°-24 °C	1 hr.
				2 hrs.
				3 hrs.
				4 hrs.
		0.003M	22°-24 °C	1 hr.
				2 hrs.
				3 hrs.
				4 hrs.
	Agua destilada	-	4 °C	4 hrs
				24 hrs
Fijación	Solución Farmer	(3 etanol al 96%:1 Ácido acético glacial)	22-24 °C	24 hrs.
Conservación	Etanol	96%	4 °C	-
			22°-24 °C	-
Hidrólisis	HCl	1N	22°-24 °C	1-15 min
		2N	22°-24 °C	1-15 min
	pectinasa-celulasa	0.1%	37° C	3-30min
			40 °C	5-30 min
Tinción	Ácido acético y	40%	22°-24 °C	3-15 min
		45%		
		60%		
	Orceína acética	40%	22°-24 °C	3-15 min
		45%		
		50%		
		Baño maría	37°	1-5 min
		Mechero de alcohol	-	1-5 min
		Termobloque	35°C	5-15 min
			40°C	
			45°C	5-10 min
			50°C	
			55°C	5 min

4.5.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico

Se inclina a 45° la laminilla sobre la lámina, tratando de concentrar todo el material en el centro de la misma, luego se homogenizó con golpes suaves mediante una aguja o borrador con suma precaución. Se empleó la técnica del *Squash* que consiste en ejercer presión uniforme sobre la laminilla para extender células y cromosomas. Por último, se selló la lámina con esmalte por los bordes para evitar la evaporación de la orceína acética. Se etiquetó el nombre científico y número de muestra al margen derecho de la lámina para continuar con las observaciones y registro de fotografías de las células metafásicas para el conteo cromosómico.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización morfológica floral

Las flores de las especies de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* (Fig. 7) presentan similitudes entre las tres especies y en algunos casos entre dos de ellas, sin embargo, también se observó caracteres morfológicos diferenciales (Tabla 4) como el tipo de pubescencia del cáliz (serícea, ausente y estrigosa para *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* respectivamente); y únicamente la pubescencia interna en la corola de *C. krauseana*.

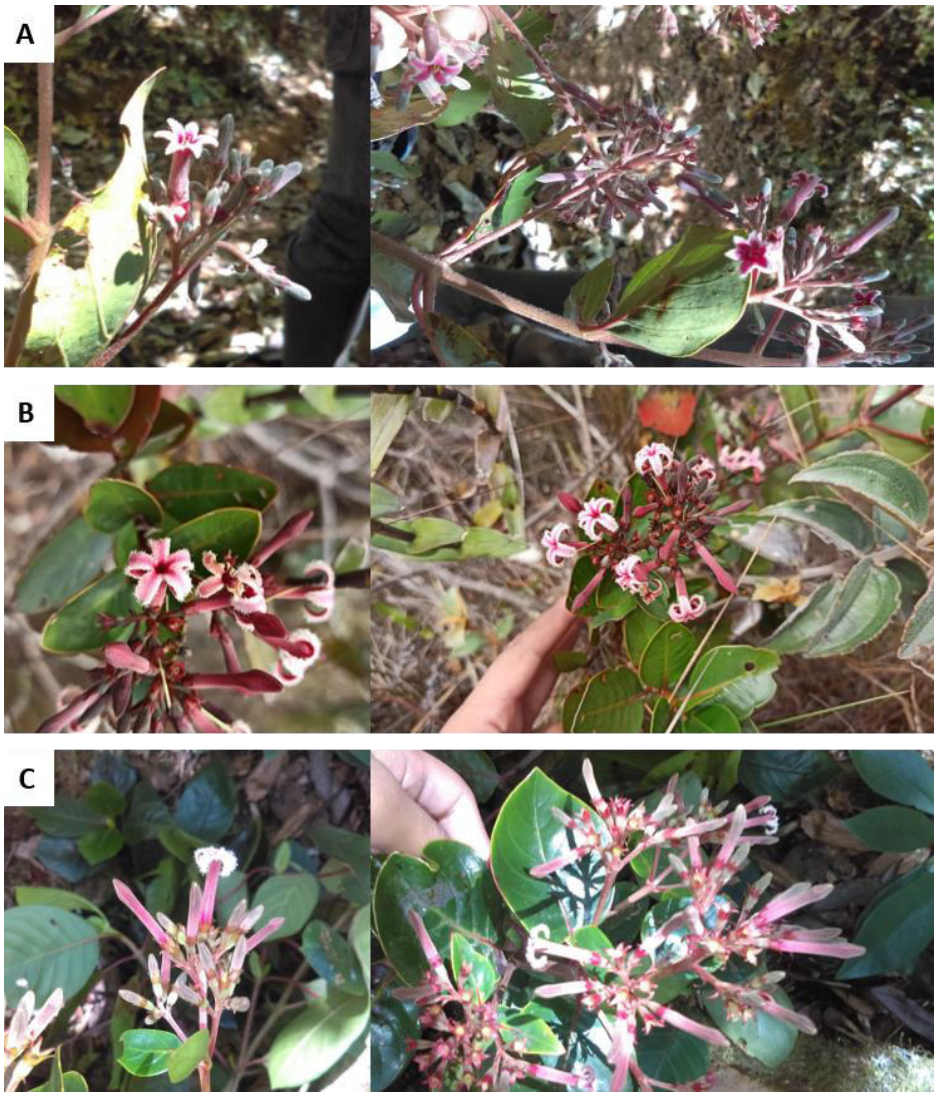


Figura 7. Inflorescencias de *Cinchona*. **A.** *Cinchona capuli*. **B.** *Cinchona krauseana*. **C.** *Cinchona lancifolia*.

Tabla 4. Estado de carácter de la estructura floral del género *Cinchona*.

Carácter	Estado de carácter	*Cinchona capuli*	*Cinchona krauseana*	*Cinchona lancifolia*
Flores	Fragancia	Dulce suave	Dulce suave	Dulce intenso
	Heterostilia:	Distilia	Distilia	Distilia
Corola	Color del tubo de la corola	Fandango	Vino	Fandango
	Pubescencia externa de la corola	hirsuta	hirsuta	hirsuta
	Pubescencia interna de la corola	ausente	Pilosula por debajo de la inserción del estambre	ausente
	Superficie interna del tubo de la corola	suave, lisa	suave, lisa	suave, lisa
Cáliz	Pubescencia externa del cáliz	serícea	ausente	estrigoso
	Lóbulos del cáliz	Regularmente lobulados de 1/4-2/3 de la longitud total del cáliz	Regularmente lobulados de 1/4-2/3 de la longitud total del cáliz	Regularmente lobulados de 1/4-2/3 de la longitud total del cáliz
	Disposición de cáliz	Tubular y dividido irregularmente a medida que la corola se expande	Fusionado en un tubo cerrado y dividido irregularmente a medida que la corola se expande	Fusionado en un tubo cerrado y dividido irregularmente a medida que la corola se expande
	Disposición de coléteres	Interior del cáliz: solitario sobre las sinuosidades de los lóbulos	Interior del cáliz: solitario sobre las sinuosidades de los lóbulos	Interior del cáliz: solitario sobre las sinuosidades de los lóbulos
Estambres	Proporción de inserción del filamento en la corola	≥ 1/4 de su longitud	≥ 1/4 de su longitud	≥ 1/4 de su longitud
	Pubescencia del filamento	Ausente	Ausente	Ausente
	Inserción de las anteras	Cercana a la base	Cercana a la base	Cercana a la base
Pistilo	Pubescencia del estilo	Ausente	Ausente	Ausente
	Forma del estigma (DUDA)	Extendido y recto	Extendido y recto	Extendido y recto
	Porcentaje del estigma en relación al estilo	≥ 15% de longitud del estilo	≥ 15% de longitud del estilo	≥ 15% de longitud del estilo
	Pubescencia del Ovario	Ausente	Ausente	Ausente

Se evidencia la presencia de pubescencia serícea, ausente y estrigosa para *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* respectivamente (Figs. 8, 9 y 10). Para *Cinchona krauseana* se observó la pubescencia en el interior de la corola, debajo de la inserción del estambre, siendo una pubescencia pilosula (Fig. 9G).

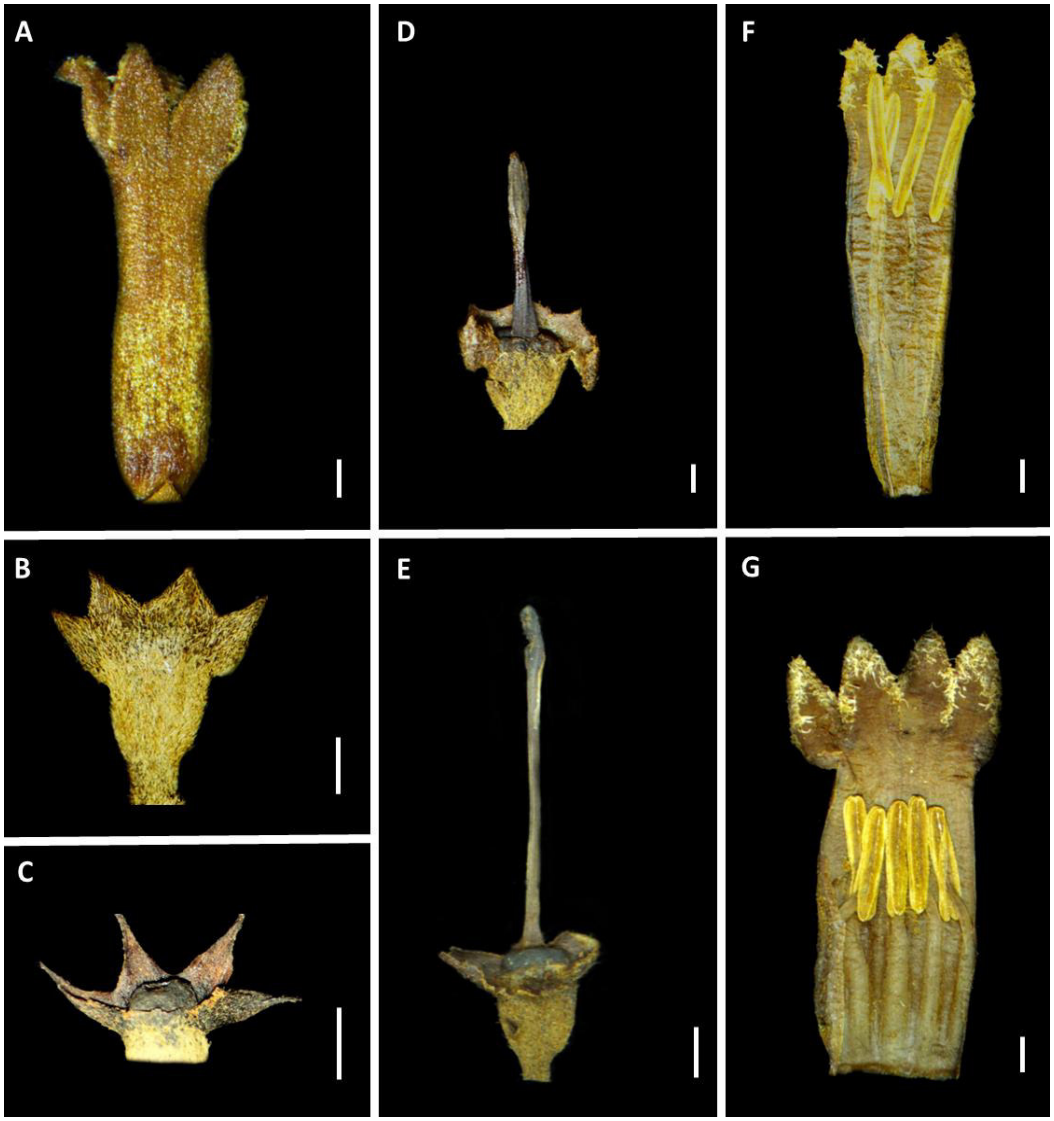


Figura 8. Estructuras florales de *Cinchona capuli.* **A.** Corola **B.** Cáliz. **C.** Lóbulos del cáliz. **D.** Pistilo de flor brevistila. **E.** Pistilo de flor longistila. **F.** Estambres de flor brevistila **G.** Estambres de flor longistila (Barra = 1mm).

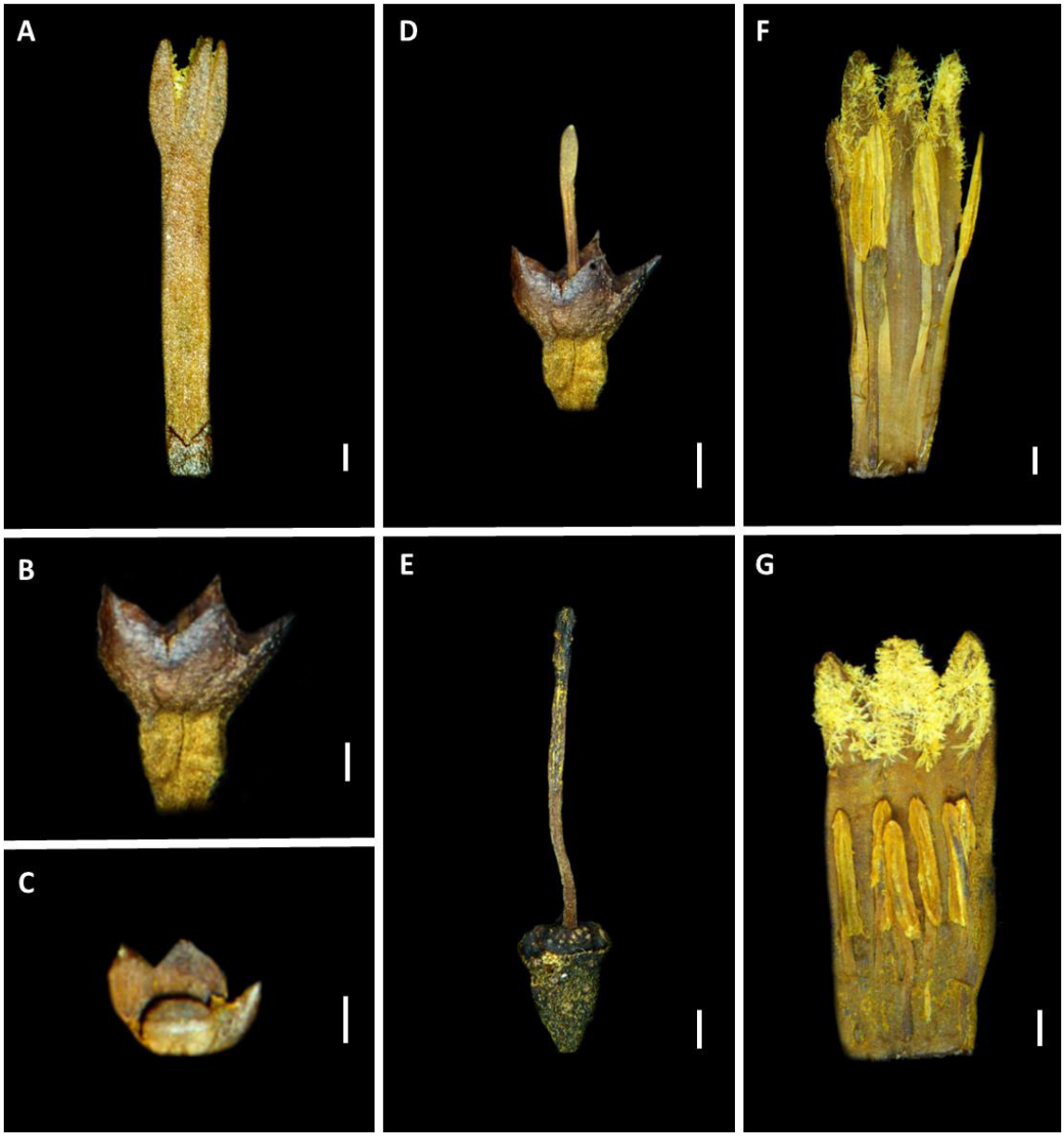


Figura 9. Estructuras florales de *Cinchona krauseana.* **A.** Corola **B.** Cáliz. **C.** Lóbulos del cáliz. **D.** Pistilo de flor brevistila. **E.** Pistilo de flor longistila. **F.** Estambres de flor brevistila **G.** Estambres de flor longistila (Barra = 1mm).



Figura 10. Estructuras florales de *Cinchona lancifolia.* **A.** Corola **B.** Cáliz. **C.** Lóbulos del cáliz. **D.** Pistilo de flor brevistila. **E.** Pistilo de flor longistila. **F.** Estambres de flor brevistila **G.** Estambres de flor longistila (Barra = 1mm).

5.2. Caracterización morfométrica floral

Se obtuvo el número mínimo, número máximo, media ($\bar{x}$) y desviación estándar (SD) de las variables morfológicas correspondientes a la corola, cáliz, estambre y pistilo con diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Shapiro Wilk para cada especie de *Cinchona* (Tabla 5). Además, el promedio del tamaño longitudinal de la flor (11.7, 21.1 y 20mm), longitud de la corola (9.8, 18.8 y 17.5 mm); longitud del cáliz (1.5, 3 y 2.4 mm); longitud del estambre (7.4, 10.9 y 12.5 mm); y altura de pistilo (6.4, 8.6 y 8 mm) de las especies de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* respectivamente muestran que los mayores valores corresponden a *Cinchona krauseana* y el menor valor a *Cinchona capuli*, excepto en la longitud de la antera donde el mayor valor corresponde a *Cinchona lancifolia* y el menor a *Cinchona capuli.* Respecto a la longitud de la flor y longitud de la corola presentan simetría, a excepción de la longitud del cáliz de *C. capuli*. Los valores de la longitud del cáliz, longitud de la antera y longitud estigma-estilo muestran una distribución asimétrica en las tres especies, excepto en la longitud del cáliz de *C. capuli* y *C. lancifolia* (Fig.11).

Asimismo, la variación del tamaño longitudinal del estambre y del pistilo evidenció la presencia de distilia (flores longistilas y brevistilas) para las tres especies de *Cinchona.*

Tabla 5. Medidas florales de las especies de *Cinchona*.

Variables	Sigla	*Cinchona capuli*				*Cinchona krauseana*				*Cinchona lancifolia*			
		Mín	Máx	$\bar{x}$	SD	Mín	Máx	$\bar{x}$	SD	Mín	Máx	$\bar{x}$	SD
Tamaño longitudinal de la flor	TL	10.2	13.4	11.7	0.8	18.1	23.7	21.1	1.7	16.3	22.3	20	1.5
Largo del tubo de la corola	LTC	5.7	8.9	7.5	0.8	9.4	13.8	12.2	1.2	10.8	15.3	12.6	1.4
Ancho del tubo de la corola	ATC	1.1	2.2	1.6	0.3	2.7	5.7	3.7	0.9	2.0	4.1	2.9	0.5
Largo del lóbulo de la corola	LLC	1.9	3.4	2.3	0.4	4.8	8.1	6.6	1.0	3.7	6.0	5.0	0.7
Ancho del lóbulo de la corola	ALC	0.7	1.2	0.9	0.1	1.5	2.8	2.1	0.4	1.0	2.1	1.6	0.4
Longitud de la corola	LC	7.5	11	9.8	0.9	15.2	21	18.8	1.7	13.2	20	17.6	1.5
Largo del tubo del cáliz	LTCA	0.5	1.1	0.7	0.1	0.9	2.1	1.5	0.3	0.9	1.6	1.3	0.2
Ancho del tubo del cáliz	ATCA	1.1	2.4	1.9	0.3	2.5	4.1	3.2	0.5	2.6	3.9	3.3	0.4
Largo del lóbulo del cáliz	LLCA	0.4	1.0	0.8	0.2	1.1	2.1	1.5	0.3	0.7	1.9	1.2	0.4
Ancho del lóbulo del cáliz	ALCA	0.6	1.1	0.8	0.1	1.1	1.9	1.5	0.2	0.7	2.0	1.4	0.5
Longitud del cáliz	LCA	1.1	1.8	1.5	0.2	2	4	3	0.5	1.8	3.4	2.4	0.6
Largo del filamento del estambre	LFE	2.8	6.1	4.7	1.0	3.3	10.5	6.2	2.2	3.4	9.8	7.8	1.9
Ancho del filamento del estambre	AFE	0.1	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.4	0.1	0.3	0.5	0.4	0.1
Largo de la antera del estambre	LAE	2.4	3.1	2.7	0.2	3.8	5.6	4.6	0.5	2.8	5.9	4.7	1.0
Ancho de la antera del estambre	AAE	0.3	0.6	0.4	0.1	0.5	0.8	0.7	0.1	0.4	0.8	0.7	0.1
Tamaño longitudinal del estambre	TE	5.7	8.9	7.4	1.1	7.1	14.9	10.9	2.5	6.5	15.7	12.5	3.1
Largo del estilo del pistilo	LEP	1.4	7.9	4.8	2.2	3.3	11.5	6.8	3.2	3.4	9.2	6.1	2.2
Ancho del estilo del pistilo	AEP	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.6	0.4	0.1	0.3	0.6	0.5	0.1
Largo del estigma del pistilo	LESP	1.1	5.8	1.6	0.9	1.2	2.3	1.9	0.3	1.5	3.3	1.9	0.5
Ancho del estigma del pistilo	AESP	0.2	0.5	0.4	0.1	0.5	1.2	0.8	0.2	0.4	1.0	0.7	0.2
Tamaño longitudinal del estilo y estigma	TEE	3.7	9.0	6.4	2.0	5.0	13.4	8.6	3.2	3.9	11.1	8.0	2.2
Largo del ovario	LOP	1.2	2.7	2.0	0.3	2.4	3.7	3.2	0.3	2.5	4.0	3.3	0.3
Ancho del ovario	AOP	1.0	2.5	1.4	0.3	2.0	3.5	2.7	0.4	1.5	2.6	2.2	0.5

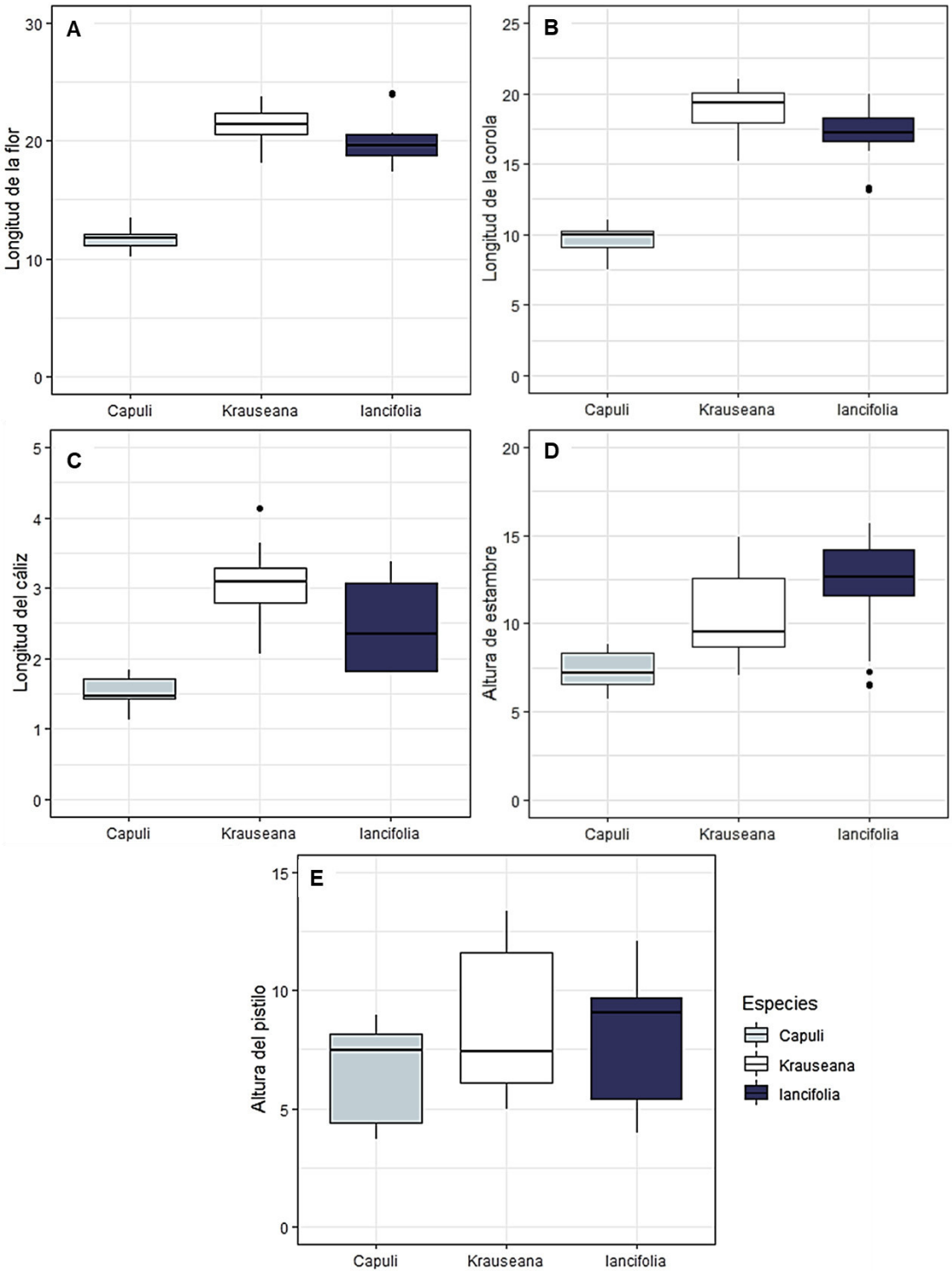


Figura 11. Diagrama de cajas de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C.* l*ancifolia*. **A.** Longitud de la flor. **B.** Longitud de la corola. **C.** Longitud del cáliz **D.** Altura del estambre. **E.** Altura del pistilo.

En los resultados de la prueba paramétrica de U de Mann-Whitney se obtuvo una diferenciación significativa ($p < 0.05$) entre las flores brevistilas y longistilas, como la longitud de la flor, largo del tubo de la corola, largo del lóbulo de la corola, ancho del tubo de la corola, longitud de la corola, longitud del cáliz, longitud del estambre, largo de la antera del estambre, largo del filamento del estambre, longitud del estilo y estigma , largo del estigma, largo del estilo y la separación estambre-pistilo para cada especie (Tabla 6).

Se determinaron los valores mínimos y máximos de las flores brevistilas y longistilas para la longitud del cáliz (1.1-1.5 mm y 1.2-1.8 mm), largo del lóbulo de la corola (2-3.4 mm y 1.9-2.6 mm), longitud del estambre (7.8-8.9 mm y 5.7-7.2 mm), y longitud del estigma-estilo (3.7-5.4 mm y 7.3-9 mm) observando ligera asimetría en los valores de la longitud del cáliz y largo del lóbulo de la corola para ambos morfos en *Cinchona capuli.* Las flores brevistilas y longistilas de *Cinchona krauseana* presentan valores mínimos y máximos en el ancho del tubo de la corola (2.7-5.5 mm y 3.1-5.7 mm), largo de la corola (15.2-21 mm y 15.6-20.8 mm), largo del lóbulo de la corola (4.8-7.7 mm y 6.1-8.1 mm), longitud del estambre (7.8-15.7 mm y 6.5-6.6 mm), y longitud del estigma-estilo (4-12.1 mm y 11-11 mm) encontrando asimetría en los valores del ancho del tubo de la corola y longitud de la corola para ambos morfos. Por último, los valores de *Cinchona lancifolia* para la longitud de la flor (16.3-22.1 mm y 21.-22.3 mm), largo del tubo de la corola (9-14.1 mm y 14.5 – 15.34 mm), longitud del estambre (7.8-15.7 mm y 6.4-6.6 mm) y longitud del estigma-estilo (4-9.7 mm y 11-11.1 mm), se observó una distribución asimétrica en los caracteres para las flores brevistilas (Fig. 12).

Asimismo, la distancia entre la longitud del estambre y pistilo de las flores brevistilas y longistilas de las especies fue significativamente mayor en las flores brevistilas que las flores longistilas (Tabla 6) para *C. capuli* y *C. krauseana*, y en el caso de *C. longistila* no fue significativo, lo que indicaría que la diferencia espacial en ambos

morfos es similar. En la gráfica de dispersión, se observa la relación entre la longitud del pistilo y la longitud del estambre y la predominancia de las flores longistilas, brevistilas y brevistilas en *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* respectivamente (Fig. 13).

Tabla 6. Prueba U de Mann – Whitney para las flores distilas de las especies de *Cinchona*.

	Cinchona capuli			***Cinchona krauseana***			***Cinchona lancifolia***		
	Brevistila	**Longistila**		**Brevistila**	**Longistila**		**Brevistila**	**Longistila**	
	X ± SD	**X ± SD**	**U**	**X ± SD**	**X ± SD**	**U**	**X ± SD**	**X ± SD**	**U**
Tamaño longitudinal de la flor	11.8 ± 1	11.6 ± 0.6	ns	20.8 ± 1.7	21.5 ± 1.5	ns	19.7 ± 1.5	21.8 ± 0.5	0.025
Largo del lóbulo de la corola	2.6 ± 0.5	2.1 ± 0.2	0.002	6 ± 0.9	7.35 ± 0.6	0	5 ± 0.8	4.6 ± 0.1	ns
Largo del tubo de la corola	7.1 ± 0.7	7.8 ± 0.9	ns	12.3 ± 1.2	12.2 ± 1.1	ns	12.2 ± 0.9	15.1 ± 0.4	0.002
Ancho del tubo de la corola	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3	ns	3.3 ± 0.9	4 ± 0.9	0.016	3 ± 0.6	2.7 ± 0.1	ns
Longitud de la corola	9.7 ± 0.8	9.9 ± 0.9	ns	18.3 ± 1.8	19.5 ± 1.5	0.05	17.1 ± 1.2	19.7 ± 0.4	ns
Longitud del cáliz	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	0.006	2.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4	ns	2.6 ± 0.6	2.1 ± 0.1	ns
Tamaño longitudinal del estambre	8.5 ± 0.3	6.6 ± 0.5	0	12.5 ± 1.7	8.4 ± 0.7	0	13 ± 1.8	6.5 ± 0.1	0
Largo de la antera del estambre	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1	0.052	4.96 ± 0.4	3.54 ± 0.9	0	5 ± 0.6	2.9 ± 0.1	0
Largo del filamento del estambre	5.7 ± 0.3	3.9 ± 0.5	0	7.5 ± 1.8	4.2 ± 0.5	0	8.5 ± 0.9	3.6 ± 0.0	0
Tamaño longitudinal del estilo y estigma	4.4 ± 0.5	8.1 ± 0.5	0	6.2 ± 0.9	12 ± 0.9	0	7.3 ± 2.5	11.1 ± 0	0.02
Largo del estigma del pistilo	1.5 ± 0.3	1.6 ± 1.3	0.016	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.2	ns	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.2	ns
Largo del estilo del pistilo	2.8 ± 0.5	6.5 ± 1.6	0	4.3 ± 0.9	10.1 ± 0.8	0	5.5 ± 1.9	8.6 ± 0.9	0
Separación estambre y estigma -estilo	4 ± 1	2.4 ± 1.8	0.025	6.5 ± 1.6	3.5 ± 0.9	0	6 ± 3.1	4.6 ± 1.1	ns

*ns: No significativo, valores (p>0.05).

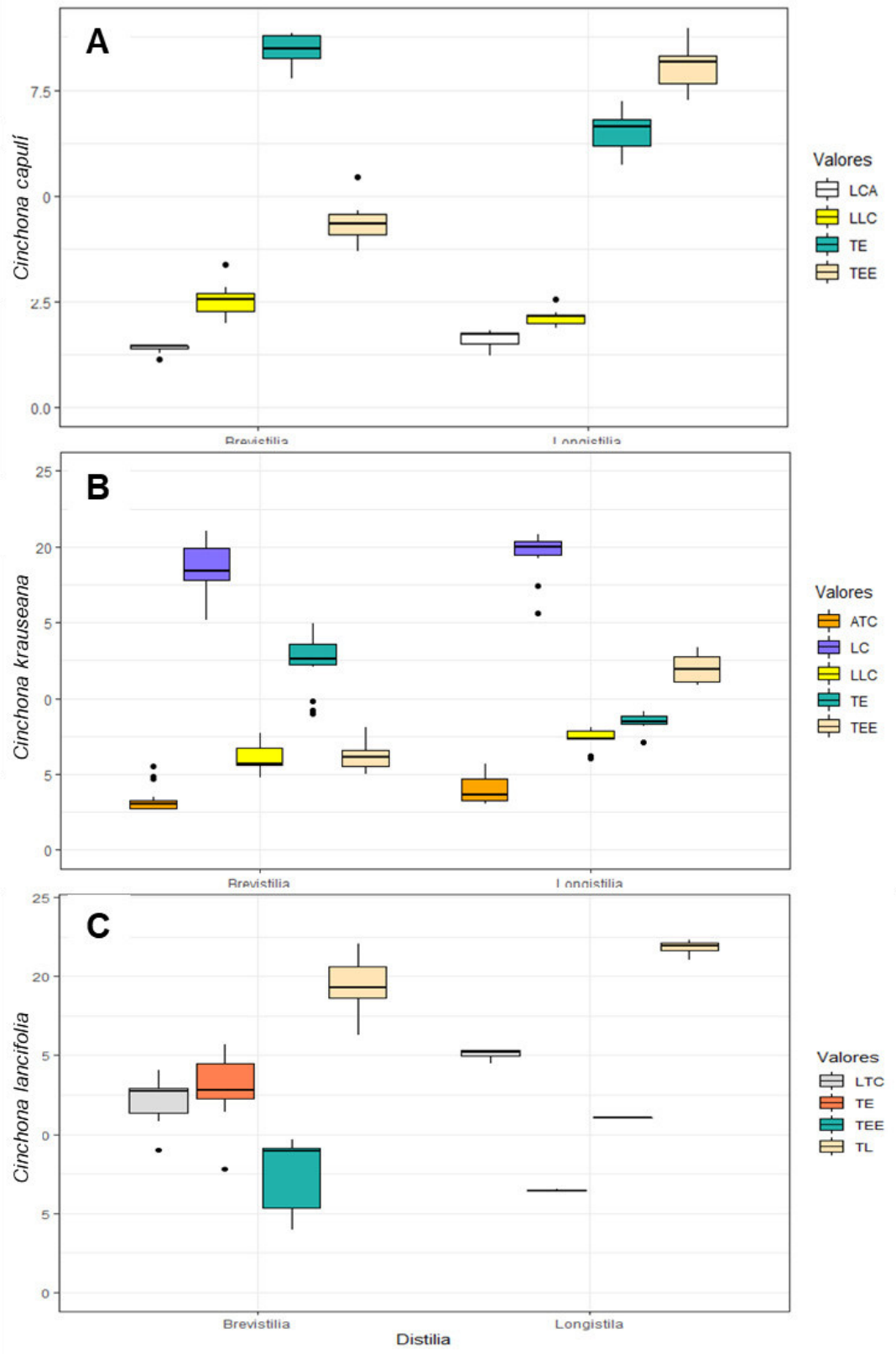


Figura 12. Diagrama de cajas de flores brevistilas y longistilas de **A.** *C. capuli* **B.** *C. krauseana* **C.** *C. lancifolia*. **Donde:** TL: Tamaño longitudinal de la corola, LTC: Largo del tubo de la corola, ATC: Ancho del tubo de la corola, LC: Longitud de la corola, LLC: Largo del lóbulo de la corola, LCA: Longitud del cáliz, TE: Longitud del estambre y TEE: Longitud estigma-estilo.

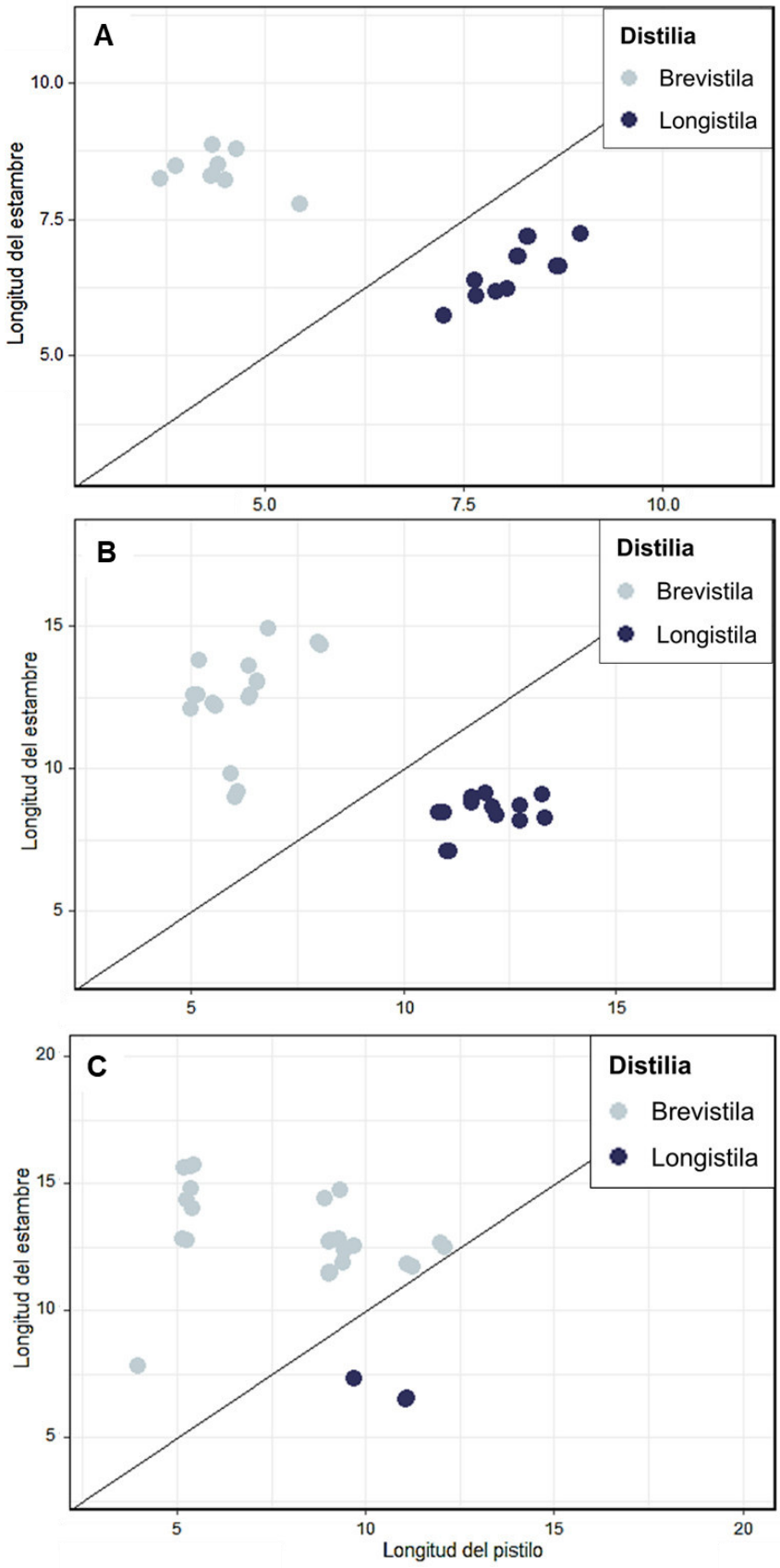


Figura 13. Diagrama de dispersión de la relación entre la longitud del estambre y pistilo de las flores brevistilas y longistilas de las especies de *Cinchona* **A.** *C. capuli* **B.** *C. krauseana* **C.** *C. lancifolia.*

5.3. Citología: conteo cromosómico

5.3.1. Germinación de semillas

Las raíces obtenidas en la germinación de *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* presentaron un mayor tamaño y grosor, siendo diferente a las raíces muy delgadas de *Cinchona capuli* (Fig. 14). En todos los casos, el potencial germinativo fue de 90% con agua destilada y papel toalla, por lo cual no fue necesaria la siembra en medios de cultivo. En el caso de *Cinchona capuli* se probaron diferentes medios de cultivo, donde la germinación fue mínima o en algunos casos nula (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de germinación en cada medio de cultivo para *Cinchona krauseana*, *Cinchona lancifolia* y *Cinchona capuli*.

Medios de cultivo	*Cinchona krauseana*	*Cinchona lancifolia*	*Cinchona capuli*	Días de germinación
KNO3	-	-	40%	10-15
MS + Sacarosa + fitogel	-	-	30%	7-9
Agua destilada	90%	90%	10%	10-15

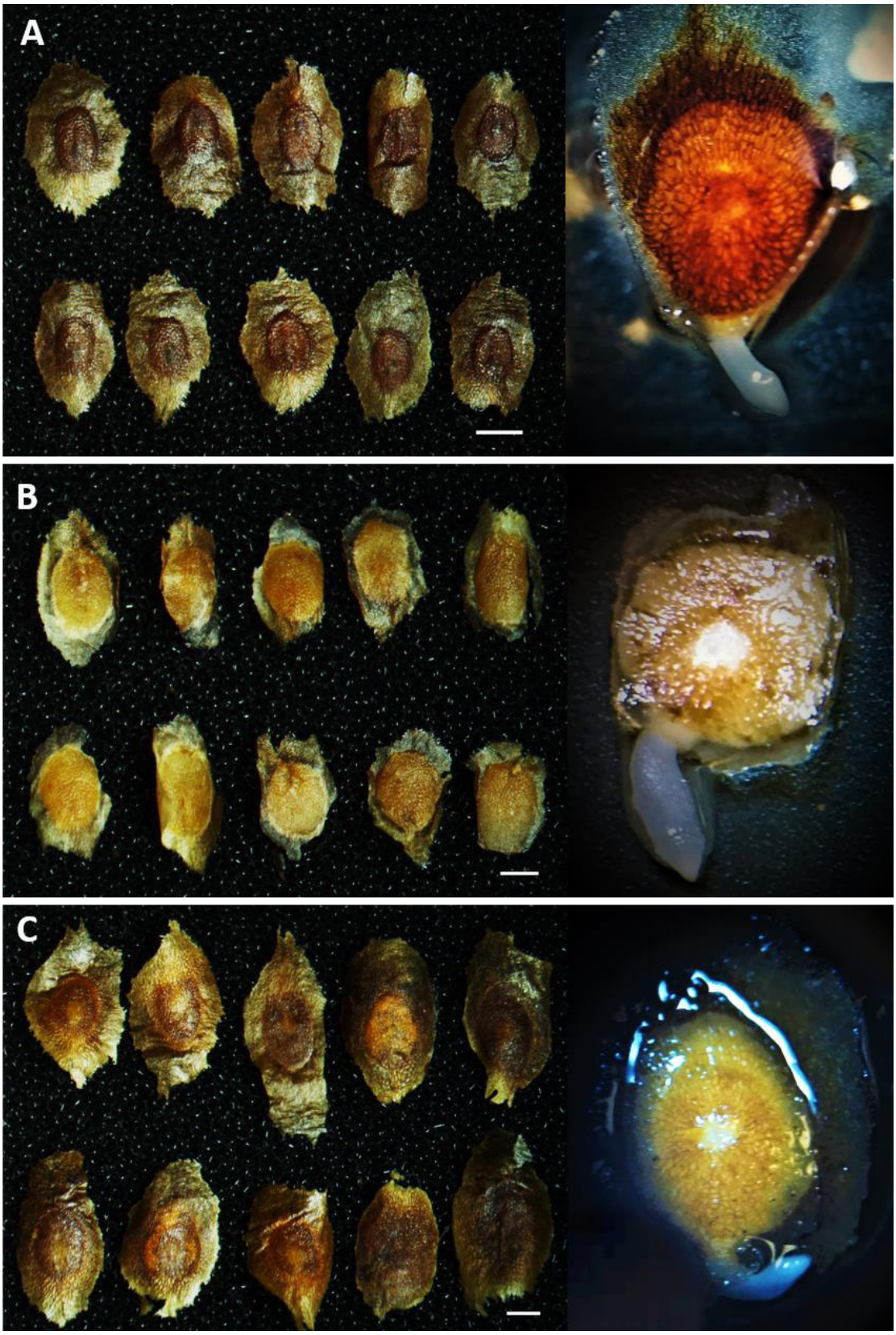


Figura 14. Semillas y raíces de las especies de *Cinchona* **A.** *Cinchona capuli*. **B.** *Cinchona krauseana*. **C.** *Cinchona lancifolia* (Barra = 1mm).

5.3.2. Determinación de la hora mitótica

La determinación de la hora mitótica óptima para *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia*, estuvo en el rango de 8:00 a 9:00 de la mañana, porque se observó un mayor número de células en división celular (Fig. 15)

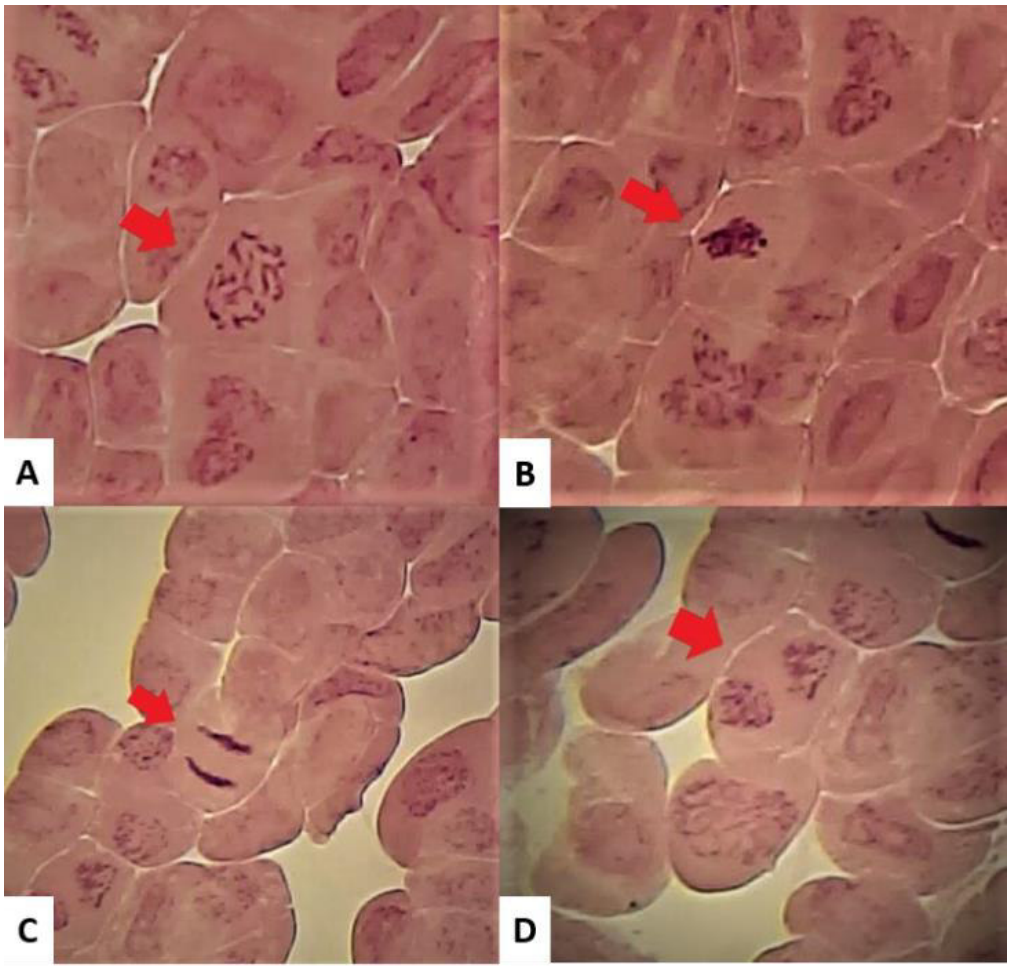


Figura 15. Etapas de la división celular de *Cinchona krauseana* **A.** Profase **B.** Metafase **C**. Anafase **D**. Telofase. Aumento:100X.

5.3.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico

El número de preparaciones citológicas para el conteo cromosómico de las tres especies de *Cinchona* fue 140. Respecto a la determinación del número cromosómico, las células y cromosomas de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* eran muy pequeñas, observándose a menudo superpuestos o enrollados; por tal

motivo, se utilizó diferentes reactivos, concentraciones, temperatura y tiempo para la obtención de un protocolo estandarizado para el conteo cromosómico de las tres especies de *Cinchona* (Tabla 8).

Tabla 8. Protocolo de preparación citológica para el conteo cromosómico de *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia*

Procedimiento	Reactivo	Concentración	Temperatura	Tiempo
Pretratamiento	8-Hidroxiquinolina	0.003M	22°-24 °C	2-4 hrs.
Fijación	Solución Farmer	(3 etanol al 96%:1 Ácido acético glacial)	22-24 °C	24 hrs.
Conservación	Etanol	96%	4 °C	-
Hidrólisis	HCl	1N	22°-24 °C	13 min
Tinción	Ácido acético	45%	22°-24 °C	3-4 min
	Orceína acética	45%	40°C	6 min

5.3.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico

A partir del protocolo estandarizado para las especies de *Cinchona*, se encontró de cuatro a seis células metafásicas para cada especie, obteniendo el número cromosómico de 2n = 34, 32 y 32 para *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana*, *Cinchona lancifolia* respectivamente (Fig. 16). El número de cromosomas encontrado para las tres especies de *Cinchona* son nuevos registros para este género.

No se encontró un tipo de ploidía para las especies de *Cinchona*. La tabla 9 presenta una comparación de los estudios previos del número cromosómico

respecto a los nuevos registros obtenidos en este estudio para las especies de *Cinchona*.

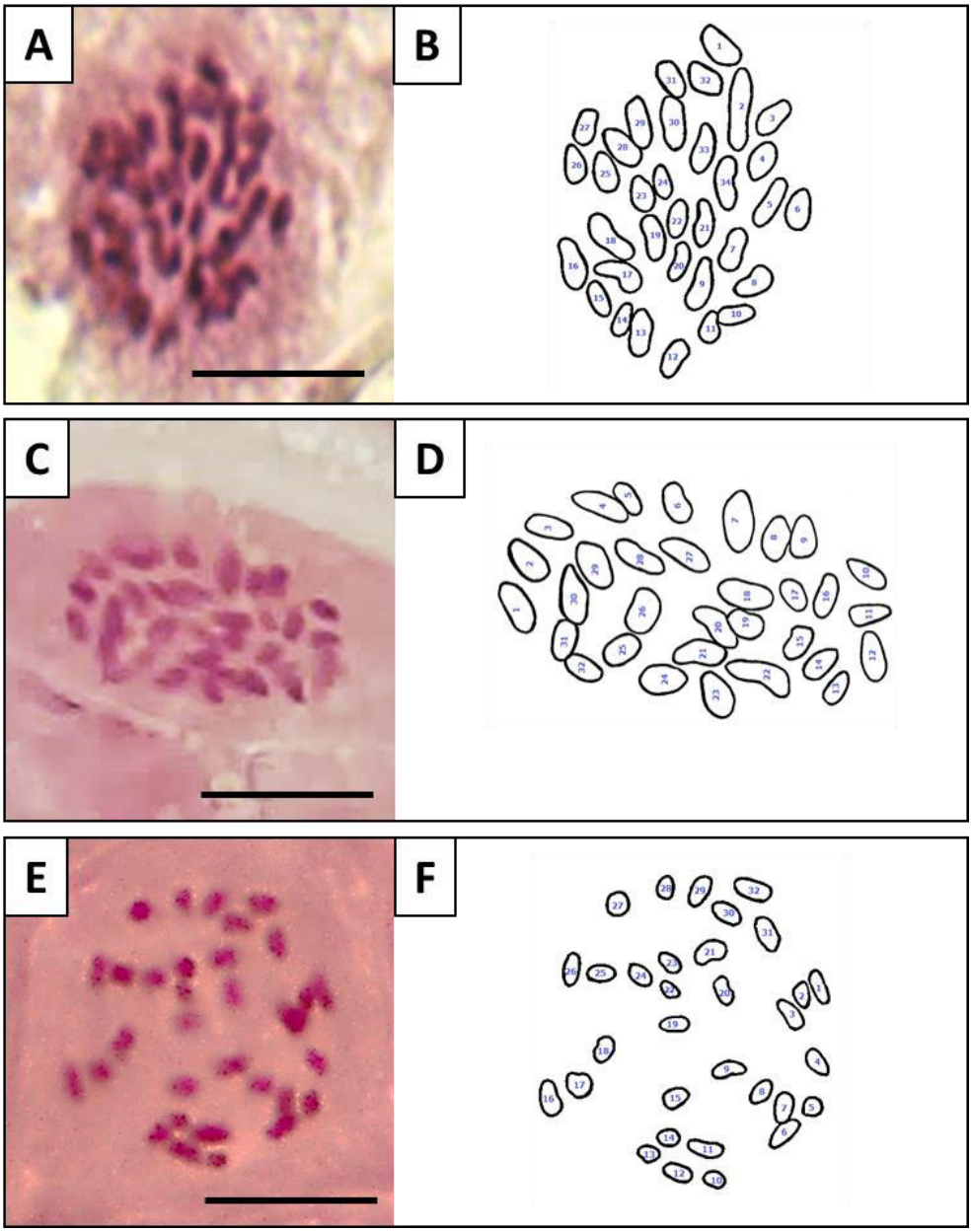


Figura 16. Número de cromosomas para las especies de *Cinchona*. **A. B**. Placa metafásica y esquema individualizado con 2n=34 cromosomas de *Cinchona capuli*. **C. D.** Placa metafásica y esquema con 2n=32 cromosomas de *Cinchona krauseana*. **E. F**. Placa metafásica y esquema con 2n=32 cromosomas de *Cinchona lancifolia*. Aumento:100X. (Barra = 5µm).

Tabla 9. Comparación de reportes previos y nuevos registros de números cromosómicos.

Número de cromosomas		División meiótica (Reportes previos)	División mitótica (Este estudio)
Especies	**(n)**	**Autores**	**(2n)**
Cinchona calisaya Wedd. *(Cinchona ledgeriana* Moens)	n=17	Mendes 1940	-
		Dawson 1949	-
		Selvaraj 1949	-
		Mathew y Philip 1979	-
Cinchona officinalis Hook.	n=17	Mathew y Philip 1979	-
Cinchona pubescens Vahl.	n=17	Dawson 1949	-
		Mathew y Philip 1979	
Cinchona capuli L. Andersson			2n=34
Cinchona krauseana L. Andersson	-	-	2n=32
Cinchona lancifolia Mutis.	-	-	2n=32

6. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización morfológica floral

Los caracteres morfológicos florales comparten similitudes entre las flores de las tres especies de *Cinchona*, no obstante, a nivel microscópico el tamaño y la pubescencia interna o externa en diferentes estructuras florales puede ayudar a su diferenciación. Por ejemplo, la pubescencia interna en la inserción de los estambres en la corola de *C. krauseana* es un carácter valioso para su identificación y diferenciación taxonómica, como también la presencia de coléteres en la parte interna del cáliz sobre las sinuosidades de los lóbulos, aunque la observación de los coléteres fue difícil debido a la antigüedad de algunas muestras herborizadas. Los resultados obtenidos en este estudio permiten complementar los estudios morfológicos vegetativos para las especies de *C.* c*apuli* y *C. lancifolia* realizados por Huamán (2020) y permitió reconocer la presencia de distilia, un tipo de heterostilia, para las tres especies mencionadas previamente en los estudios realizados por Anderson (1989) y Albán (2013).

6.2. Caracterización morfométrica floral

Las mediciones morfométricas florales de las especies de *C. capuli*, *C. krauseana* y *C. lancifolia* permitieron obtener las variables morfológicas más relevantes y diferenciar la altura y ancho de las estructuras florales de cada especie. Algunas variables coinciden con lo reportado por Anderson (1998), como la comparación de las medidas morfométricas respecto al largo de la flor, corola, cáliz, estambres y pistilo, siendo mayor en *C. krauseana*, seguido por *C. lancifolia* y por último *C. capuli*.

Respecto a la distilia, se encontró diferencias significativas según U de Mann – Whitney para el largo del lóbulo de la corola, largo del tubo de la corola, ancho del tubo de la corola, longitud de la corola y longitud del cáliz para *C. krauseana*, *C.*

lancifolia y *C. capuli*. En el caso de la corola, este carácter suele ser reportado en otras especies de Rubiaceae, como la presencia de corolas más grandes en las flores brevistilas de *Palicourea fendleri*, *P*alicourea *petiolaris* (Sobrevila et al. 1983), *Guettarda scabra* Lam. (Richards y Koptur 1993), *Gaertnera vaginata* Lam. (Pailler y Thompson 1997) y *Palicourea padifolia* (Willd. ex Schult.) C.M. Taylor y Lorence (Ree 1997); y en algunos casos no existe relación entre el tamaño grande de la corola y las flores brevistilas, como lo reportado en *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg*., Psychotria birotula* L. B. Sm., Downs, y *Psychotria pubigera* (Castro y Oliveira 2001) y *Psychotria* DC. (Monteiro et al. 1991). Sin embargo, en este estudio se observó que el largo del lóbulo de la corola es mayor en flores brevistilas que longistilas en *Cinchona capuli*; el ancho del tubo de la corola, largo del lóbulo de la corola y longitud de la corola es mayor en flores longistilas de *Cinchona krauseana*; y la longitud del tubo de la corola es mayor en flores longistilas *Cinchona lancifolia*. Estas variaciones en los caracteres morfológicos de la corola en especies con polimorfismos florales podrían evidenciar una presión selectiva en la evolución de un mecanismo reproductivo (Novo et al. 2018).

Cinchona krauseana tiene flores con estambres fusionados a la corola, específicamente la parte inferior del filamento, pero no muestra diferencias significativas en ambos morfos respecto al largo del tubo de la corola, pero si respecto al lóbulo de la corola; esto podría ser importante, porque algunas especies que presentan variación en la longitud del tubo de la corola, cumplen un rol evolutivo fundamental en la formación y mantenimiento de la hercogamia (Faivre y McDade 2001, Santos-Gally et al. 2013). Otro carácter importante es la diferenciación del tamaño de las papilas estigmáticas (Ganders 1979) porque suelen ser más grandes en las flores longistilas; aunque, Dulberger (1992) observó estigmas más grandes en las flores brevistilas de *Psychotria ipecacuana*; y en este estudio no se encontró diferencias significativas a excepción de *C. capuli*.

Este estudio encontró significativo la relación entre la longitud del estambre y pistilo de las flores brevistilas y longistilas de *C. capuli* y *C. krauseana*, según la prueba de U de Mann - Whitney, siendo favorable para una mayor precisión en la transferencia del polen (Barrett 2002), así como la predominancia de flores longistilas en *C. capuli* que permitiría una mayor carga de los granos de polen en comparación a las flores brevistilas, siendo importante para la polinización (Lloyd y Webb 1992); no obstante, el predominio de flores brevistilas para *C. lancifolia* y *C. krauseana*, coincide con las observaciones realizadas en campo, respecto a la mayor abundancia de flores brevistilas de sus individuos, por ello es importante realizar estudios de polinización y apareamiento en diferentes poblaciones para determinar si la variación de los patrones de distilia tienen una base adaptativa (Zhou et al. 2017), porque su asociación con las variaciones morfológicas y morfométricas pueden varían entre especies, poblaciones e individuos (Ganders 1979, Dulberger 1992, Faivre y McDade 2001, Rossi et al. 2005) que podrían estar afectando su abundancia poblacional.

La hercogamia reciproca fue significativa para *C. capuli* y *C. krauseana*, y no en C. l*ancifolia*, este caso podría ser debido a los escasos individuos con flores longistilas encontradas en este estudio y la predominancia de un morfo para cada especie. Varios casos de distilia en especies de Rubiaceae suelen ser debido a los cambios en la disponibilidad, el comportamiento de los polinizadores, e incluyen la evolución de la autocompatibilidad (Sobrevilla et al. 1983, Barrett 1992, Richards y Koptur 1993, Riveros et al. 1995, Ree 1997). No hay información sobre el control genético de distilia en trabajos de Rubiaceae, pero estudios en otras familias muestran la existencia de un sistema bialélico como un supergen que controla la morfología y la incompatibilidad de las características de distilia (Lewis y Jones 1992, Barret y Shore 2008).

6.3. Citología: conteo cromosómico

6.3.1. Germinación de semillas

En el proceso de germinación, se realizó la prueba de tinción con Tetrazolio, Tetrazolio (ISTA 2006) para determinar la viabilidad de *Cinchona capuli,* obteniendo un resultado negativo posiblemente debido a la inmadurez o deterioro de las semillas, las cuales fueron difíciles de encontrar y recolectar en las expediciones realizadas, y en su mayoría se hallaban en estado vegetativo. Por ello se buscó material de colecciones científicas antiguas, que permitieran la germinación de las semillas y preparación citológica para el conteo cromosómico de las tres especies. Asimismo, las semillas de *Cinchona capuli* podrían estar en etapa de dormancia, por ello después de probar la germinación en diferentes medios de cultivo, se logró la germinación y obtención de las raíces.

Los ensayos de germinación fueron una parte importante de este estudio porque después de este proceso, se necesitaba realizar la colecta y preparación citológica para el conteo cromosómico. Inicialmente se usó agua destilada y papel toalla para *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia*, pero debido a la baja o nula viabilidad de *Cinchona capuli* se tuvo que emplear diversos medios de cultivo para incrementar la germinación de esta especie como nitrato de potasio (KNO_3), reportado en estudios previos para la germinación de especies de *Cinchona* (Ruiz 2014, Cancho 2017), siendo efectivo para obtener un mayor porcentaje de germinación para *Cinchona capuli*.

Cinchona krauseana y *Cinchona lancifolia* fueron dos especies colectadas en los últimos años y para su germinación solo se utilizó agua destilada y papel toalla, ambas especies permitieron realizar distintas pruebas para la determinación de la hora mitótica y estandarizar el protocolo de la preparación citológica para el

conteo cromosómico para *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia.*

6.3.2. Determinación de la hora mitótica

La determinación de la hora mitótica para las tres especies de *Cinchona* fue entre las 8:00 y 9:00 de la mañana, esto se aproxima al rango de 9:00 a 10:00 de la mañana, reportado en un estudio reciente para *Neolamarckia cadamba*, perteneciente a la familia Rubiaceae (Wei-Seng et al. 2021). En las últimas décadas no se ha mencionado un rango específico para determinar la hora mitótica de las especies de la familia Rubiaceae, lo cual, dificultó aún más este proceso, debido al escaso número de semillas y repeticiones para cada horario.

6.3.3. Preparación citológica para el conteo cromosómico

La estandarización del protocolo para la preparación citológica del conteo cromosómico tuvo varios procedimientos y variantes en base a estudios previos de conteo cromosómico de la familia Rubiaceae (Selvaraj 1987, Speranza et al.2003), esta estandarización fue necesaria debido a que los conteos cromosómicos respecto al género *Cinchona* fueron realizaron hace décadas cuando la tecnología microscópica no era tan avanzada, y no solo para este género sino para toda la familia Rubiaceae (Kiehn 1995).

La diversidad vegetal y características particulares de cada especie respecto al tamaño celular, composición del citoplasma, número y tamaño de cromosomas y grosor de la pared celular suelen causar la modificación o variación en la preparación citológica para el conteo cromosómico (Jiang et al., 2020), siendo difícil en muchas ocasiones, siendo el caso de este estudio realizado en las especies del género *Cinchona* como el pretratamiento, debido al número de

semillas y concentración de 8- hidroxiquinolina; la hidrólisis, la capa epidérmica de la raíz de las especies de *Cinchona* eran muy delgadas, pequeñas y resistentes que dificultaron su eliminación sin alterar o dañar el contenido interno; y la técnica de tinción, las células eran muy pequeñas, incluso al ser observadas en un aumento de 100x con aceite de inmersión en el Microscopio, igualmente los cromosomas, podían encontrarse superpuestos, dispersos o enrollados en las células por ejercer un inadecuado aplastamiento o exceso de tinción para las tres especies.

El conteo cromosómico en las placas metafásicas de las células de las tres especies de *Cinchona* resultó bastante complicado por su tamaño particular que coincide con lo mencionado en previos estudios (Mathew y Philip 1978, Kiehn 1995), por tal motivo se esquematizó los cromosomas en papel para facilitar su conteo, asimismo, se contó con otro observador en algunas ocasiones para el esquema y conteo respectivo. En el caso de *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* se tenía un mayor número de semillas, permitiendo aumentar las repeticiones de la preparación citológica para el conteo cromosómico, a diferencia de *Cinchona capuli* que tenía un menor número de semillas, baja viabilidad y dificultades en la germinación posiblemente por el tiempo transcurrido desde la fecha de su colecta.

6.3.4. Preparación de láminas y conteo cromosómico

Los estudios previos para la determinación del número cromosómico de las especies del género *Cinchona* fueron realizados a partir de los botones florales (División meiótica), reportando 2n=34 cromosomas (Mendes 1939, Dawson 1948, Selvaraj 1948, Mathew y Philip 1978, Kiehn 1995); este estudio, determinó el número cromosómico a partir de las raíces (División mitótica), debido a la

vulnerabilidad y número de individuos de las especies de *Cinchona* (Álban et al. 2013, Huamán 2020); por ello, se tomó como referencia procedimientos de conteo cromosómico a partir de las raíces en la familia Rubiaceae (Speranza 2003, Naiki, 2004, Correa et al. 2010).

Los números cromosómicos reportados en este estudio son nuevos registros que podrían sugerir una ampliación del rango reportado para las especies del género *Cinchona*. Considerando que la familia Rubiaceae tiene una gran variación respecto a los números cromosómicos de sus géneros y especies (Lee 1985). El número cromosómico 2n=32 no brinda soporte para establecer posibles eventos de aneuploidía o hibridación para las especies mencionadas.

Este estudio permite contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de las tres especies del género *Cinchona* para un mayor entendimiento de la variabilidad morfológica, morfométrica, geográfica y cromosómica de sus especies.

7. CONCLUSIONES

- La caracterización morfológica y morfométrica de las estructuras florales de *C. capuli* y *C. lancifolia* complementa estudios taxonómicos realizados previamente; y respecto a *C. krauseana*, la pubescencia interna en la inserción del filamento de las anteras en la corola permitió evidenciar un carácter particular en esta especie.
- Se observó la presencia de distilia en las tres especies de *Cinchona* con predominio de flores brevistilas para *C. krauseana* y *C. lancifolia*, y flores longistilas en *C. capuli*.
- Se encontraron diferencias significativas en relación a las flores brevistilas y longistilas respecto a la corola, cáliz, estambre, estigma-estilo y distancia longitudinal entre el estambre y estigma-estilo de cada especie.
- La estandarización de un protocolo de la preparación citológica para el conteo cromosómico de las tres especies del género *Cinchona*, permitió determinar el número cromosómico de 2n=34, 2n=32 y 2n=32 para *Cinchona capuli*, *Cinchona krauseana* y *Cinchona lancifolia* respectivamente, siendo nuevos registros para el género *Cinchona*.

8. RECOMENDACIONES

- Caracterizar la morfología y morfometría de las estructuras reproductivas de las especies de *Cinchona* para la identificación de su compleja taxonomía.

- Elaborar estudios sobre la abundancia, distribución geográfica, fenología, reproducción y polinización para complementar este estudio y permitir un mayor entendimiento de la biología reproductiva de las tres especies de *Cinchona*.

- Considerar una mayor colecta del número de semillas para la germinación y preparación citológica para el conteo cromosómico de las especies de *Cinchona*, debido al pequeño tamaño de sus raíces, células y cromosomas.

- Emplear el protocolo estandarizado de la preparación citológica del conteo cromosómico de este estudio para las especies faltantes de *Cinchona* y la posibilidad de la presencia o ausencia de ploidías en este género, complementado con estudios filogenéticos para el análisis de su evolución.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe T. 2001. Flowering phenology, display size, and fruit set in an understory dioecious shrub, *Aucuba japonica* (Cornaceae). *American Journal of Botany* 88 (3): 455-461.

Albán J. 2013. Etnobotánica de Rubiáceas Peruanas (Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas). Unidad de Posgrado. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

Andersson L. y Persson C. 1991. Circumscription of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae) - a cladistics approach. *Plant Systematics and Evolution* 178(1–2): 65–94.

Andersson L. 1998. A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 81:1-75.

Andersson L. y Antonelli A. 2005.Phylogeny of the tribe Cinchoneae (Rubiaceae), its position in Cinchonoideae, and description of a new genus, *Ciliosemina*. *Taxon* 54(1): 17–28.

Antonelli A., Nylander J., Persson C. y Sanmartín I. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(24): 9749–9754.

Ashton P. 1969. Speciation among tropical forest trees: some deductions in light of recent evidence. *Biological journal of the Linnean Society* 1: 156-196.

Averett J. 1981. Polyploidy in plant taxa: summary. *In Polyploidy: 269-273*. New York.

Barrett S. y Eckert G. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. *Biological Approaches y Evolutionary Trends in Plants*: 229-254.

Barrett S. y Richards J. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden 55*: 35-61.

Barrett S. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. *Evolution and function of heterostyly*: 1-29.

Barrett S. y Cruzan M. 1994. Incompatibility in heterostylous plants. In *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants* 2:189–219.

Barrett H., Harder L. y Worley A. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions: Biological Sciences 351*(1345):1271-1280.

Barrett S., Jesson L. y Baker A. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany 85*: 253-265.

Barrett S. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3 (4): 274-284.

Barret 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 358: 991-1004.

Barrett S. y Shore J. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. *Self-incompatibility in flowering plants.* Springer, Berlin: 3-32.

Barrett S. y Hough J. 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany* 64 (1): 67–82.

Bawa K. y Beach J. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254-274.

Besnier F. 1989. Semillas, Biología y Tecnología. Madrid. España.

Brako L. y Zaruchi J. 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri

Bremekamp C. 1966. Remarks on the position, the delimitation and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerlandica 15*(1): 1-33.

Bremer B., Andreasen K. y Olsson D. 1995. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 383-397.

Bremer B. 2009. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96(1): 4-26.

Bremer B. y Eriksson T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170(6): 766–793.

Bruce-Chwatt L.1990. *Cinchona* and quinine: a remarkable anniversary. *Interdisciplinary Science Reviews 15*(1): 87-93.

Burger W. y Taylor C. 1993. Flora Costaricensis: Familia N° 202 Rubiaceae. *Fieldiana, Botany* (33):1-333.

Cancho S. 2017. Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de *Cinchona krauseana* L. Andersson y *C. calisaya* Wedd. (Rubiaceae). Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Botánica. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

Cardoso J., Viana M., Matias R., Furtado M., Caetano A., Consolaro H. y Brito V. 2018. Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* 32: 329-348.

Castro C. y Oliveira P. 2001. Reproductive biology of the protandrous *Ferdinandusa speciosa* Pohl (Rubiaceae) in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 24:167–172.

Cota J. y Philbrick C.1994. Chromosome number variation and polyploidy in the genus *Echinocereus (*Cactaceae). *American Journal of Botany 81*(8): 1054-1062.

Corrêa A., Jung-Mendaçolli S. y Forni-Martins E. 2010. Karyotype characterisation of Brazilian species of the genus *Psychotria* L.—subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Kew Bulletin* 65: 45-52.

Dafni A. 1994. Pollination Ecology: A Practical Approach. *Brittonia* 46. DOI:10.2307/2807163

Darwin C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. London.

Dawson R. 1948: *Cinchona* polyploids. - *Lloydia* 11: 81- 85.

Delph L. y Meagher T.1995. Sexual dimorphism masks life history trade-offs in the dioecious plant Silene latifolia. *Ecology 76*(3): 775-785.

Delprete P., Smith N., Mori S., Henderson A., Stevenson D. y Helad S. 2004. Flowering Plants of the Neotropics. *The New York Botanical Garden.* New Jersey Washington USA.

De Wet J. 1980. Origins of polyploids. *Polyploidy: Biological relevance* (13): 3-15.

Dewitte W, Murray J. 2003. The plant cell cycle. *Annual review of plant biology* 54: 235–264

Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. Evolution and function of heterostyly: 41-84.

Fagerlind F. 1934. Beiträge zur kenntnis der zytologie der Rubiaceen. *Hereditas* 19(1–2): 223–232.

Faivre A. y McDade L. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany 88*(5): 841-853.

Florentin M., Cabaña Fader A. y Gonzalez A. 2016. Morpho-anatomical and morphometric studies of the floral structures of the distylous *Oldenlandia salzmannii* (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica 30*: 585-601.

Gachelin G., Garner P., Ferroni E., Tröhler U. y Chalmers I. 2017. Evaluating *Cinchona* bark and quinine for treating and preventing malaria. *Journal of the Royal Society of Medicine 110*(1): 31–40. https://doi.org/10.1177/0141076816681421

Ganders F. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.

Gentry A. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden 69*(3): 557-593.

Glotzer M., Murray A. y Kirschner, M. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature 349*(6305): 132–138.

Govaerts R., Andersson L., Robbrecht E., Bridson D., Davis A., Schanzer I. y Sonke B. 2006. World Checklist of Rubiaceae. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*. URL: http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/ (Revisado: 15 del Junio,

2018).

Grant V. 1989. Especiación Vegetal. Ed. Limusa. México.

Gachelin G., Garner P., Ferroni E., Tröhler U. y Chalmers I. 2017. Evaluating *Cinchona* bark and quinine for treating and preventing malaria. *Journal of the Royal Society of Medicine 110*(1): 31–40. https://doi.org/10.1177/0141076816681421

Ganders F. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.

Gentry A. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden 69*(3): 557-593.

Glotzer M., Murray A. y Kirschner, M. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature 349*(6305): 132–138.

Govaerts R., Andersson L., Robbrecht E., Bridson D., Davis A., Schanzer I. y Sonke B. 2006. World Checklist of Rubiaceae. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*. URL: http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/ (Revisado: 15 del Junio, 2018).

Grant V. 1989. Especiación Vegetal. Ed. Limusa. México.

Harder L. y Barrett S. 2006. Ecology and Evolution of Flowers. *Systematic Biology* 57(3):516–517.

Herrera F. 1936. R.P. F. Gonzalez Laguna. *La Crónica*. 1º de enero.

Hodge W. 1947. Wartime *Cinchona* procurement in Latin America. *Economic Botany* 2(3): 229–257.

Homeyer H. 1932. Zur zytologie der rubiaceae. *Planta* 18(3): 640.

Homeyer H. 1935. Beiträge zur Kenntnis der Zytologie und Systematik der Rubiaceen. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 67: 237–263.

Huamán L. 2020. Evaluación morfológica y del estado de conservación de seis especies del género *Cinchona* L. (Rubiaceae) en los Andes del norte y centro de Perú. Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biodiversidad y Gestión de Ecosistemas. Ciencias Biológicas, UNMSM.

Inklebarger J., Gyer M., Galanis N., Michael M. y Adel D. 2020. *Cinchona* Bark For The Treatment Of Covid-19 Pnemonia: A Modern Review Of The Potential Anti-Viral Therapuetic Applications Of An Old Treatment. *International Journal of Medical Science and Clinical Invention* *7*(05): 4795–4801. https://doi.org/10.18535/IJMSCI/V7I05.02

International Seed Testing Association. 2016. ISTA International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland.

Jerez E. 2017. Propagación sexual y asexual de la cascarilla (*Cinchona officinalis* L.), con fines de potencial reproductivo en el vivero Catiglata del Consejo Provincial de Tungurahua. Tesis de Licenciatura para la obtención del título de Ingeniero Forestal. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/7663

Jiang Y., Liu S., Hu J., He G., Liu Y., Chen X., ... y Gao S. 2020. Polyploidization of *Plumbago auriculata* Lam. in vitro and its characterization including cold tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 140: 315-325.

Kaufman T. y Rúveda E. 2005. The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war. *Angewandte Chemie International 44*(6): 854-885.

Kiehn M. 1985. Karyosystematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Africa, Madagascar and Mauritius. *Plant Systematics and Evolution* 149(1–2): 89–118.

Kiehn M. 1986. Karyosystematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Sri Lanka. *Plant Systematics and Evolution* 154(3–4): 213–223.

Kiehn M. 1991. Chromosome numbers of and karyological notes on *Paederia* L. (Rubiaceae-Paederieae). *Opera Botanica Belgica* 3: 125-132.

Kiehn M. 1995. Chromosome survey of the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 398-408.

Kiehn M. 2010.Chromosomes of Neotropical Rubiaceae. I: Rubioideae 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97(1): 91–105.

La Condamine M. 1738. Sur I´ arbre du Quinquina Mén. *Histoire de l'Académie Royale des Sciences*: 226-243.

Lacadena J. 1996. *Citogenética*. Madrid: Editorial Complutense.

Lee Y. 1985. Remarks on the chromosome numbers in the Rubiaceae. *Phytologia* 57(1): 73-79.

Leffingwell J. 2003. Chirality & Bioactivity. *Pharmacology* 3 (1): 1–27.

Lewis D. y Jones D. 1992. The genetics of heterostyly. *Evolution and function of heterostyly*:129-150.

Losada A. y Hirano T. 2001. Shaping the metaphase chromosome: Coordination of cohesion and condensation. *Bioessays 23*(10): 924-935 https://doi.org/10.1002/bies.1133

Lloyd D. y Schoen D. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369.

Lloyd D. y Webb C.1992a. The evolution of heterostyly. *Evolution and function of heterostyly*: 151-178.

Lloyd D y Webb C. 1992b. The selection of heterostyly. Evolution and function of heterostyly: 79-207.

Maes A., Menu E., De Veirman K., Maes K., Vanderkerken K. y De Bruyne E. 2017. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. *Oncotarget 8(52):* 90501–90520. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18765

Maldonado C., Molina C., Zizka A., Persson C., Taylor C., Albán J., Chilquillo E. y Antonelli A. 2015. Estimating species diversity and distribution in the era of Big Data: to what extent can we trust public databases? *Global Ecology and Biogeography 24*(8): 973-984.

Maldonado C., Persson C., Albán J., Antonelli A., y Rønsted N. 2017. *Cinchona anderssonii* (Rubiaceae), a new overlooked species from Bolivia. *Phytotaxa* 297(2): 203-208.

Maldonado C., Barnes J., Cornett C., Holmfred E., Hansen S. H., Persson C., Antonelli A. y Rønsted N. 2017. Phylogeny predicts the quantity of antimalarial alkaloids within the iconic yellow *Cinchona* bark (Rubiaceae: *Cinchona calisaya*). *Frontiers in plant science* 8: 391.

Madsen J. 2002. Historia cultural de la cascarilla de Loja. *Botánica Austroecuatoriana: estudios sobre los recursos naturales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*: 385-399.

Mandujano M., Carrillo-Angeles I., Martínez-Peralta C. y Golubov J. 2010. Reproductive biology of Cactaceae. *Desert plants:* 197-230.

Manns U. y Bremer B. 2010. Towards a better understanding of intertribal relationships and stable tribal delimitations within Cinchonoideae ss. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56(1): 21–39.

Mansilla R., López C., Flores M. y Espejo R. 2010. Estudios de la biología reproductiva en cinco accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. y Endl.) Robinson. *Ecología aplicada* 9(2):167-175.

Marston A, y Amon A. 2005. Erratum: Meiosis: Cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*(10): 818. https://doi.org/10.1038/NRM1759

Martin W. y Gandara J. 1945. Alkaloid content of Ecuadorian and other American *Cinchona* barks. *Botanical Gazette* 107: 184-199.

Mathew P. y Philip K. 1978. Cytology of South Indian Rubiaceae. *Nucleus* 22: 47 49.

Mathew P. y Philip K. 1979. Studies on south Indian Rubiaceae II. Cytology of *Cinchona* Linn [India]. *Nucleus* 22:125-127.

Mejía F. 2014. Factores que influyen en la germinación de semillas de 6 especies del género Cinchona (Rubiaceae) en el Perú. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Botánica. Universidad Nacional San Marcos, Lima, Perú

Mendes A. 1939. *Os cromosômios das Rubiáceas*. *Boletim Técnico do Instituto Agronômico* 55: 3-11.

Monteiro R., Nakajima J., Da Silva Ribeiro J. y Toledo J. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de Psychotria barbiflora DC.(Rubiaceae). *Naturalia (São José do Rio Preto) 16*: 137-146.

Mostacero J., Mejía F. y Gamarra O. 2002. *Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú II*. Trujillo.

Mcintosh J. 2016. Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 8*(9), a023218. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A023218

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biosssays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.

Natali A., Manen, J. y Ehrendorfer F. 1995. Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in particular the tribe Rubieae: evidence from a non-coding chloroplast DNA sequence. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 428-439.

Naiki A. y Nagamasu H. 2004. Correlation between distyly and ploidy level in *Damnacanthus* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 91(5): 664-671.

Naiki A. 2012. Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. *Plant Species Biology* 27: 3-29.

Norbury C. y Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry 61*(1): 441–468. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.61.070192.002301

Novo R., Consolaro H., Almeida N. & Castro C. 2018. Floral biology of the velvetseed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism?. *Flora* 239: 62-70.

Pailler T. y Thompson J. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American journal of botany 84*(3): 315-327.

Pino D. y Taylor C. 2006. Rubiaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología* 13(2): 586-599.

Primack R. 1980. Variation in the phenology of natural populations of montane shrubs in New Zealand. *The Journal of Ecology*: 849-862.

Primack R. 1985. Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 15-37. DOI: 10.1146/annurev.es.16.110185.000311.

Puangsomlee P y Puff C. 2001. Chromosome numbers of Thai Rubiaceae. *Nordic Journal of Botany* 21(2): 165–176.

Raghavan T. y Srinivasan A. 1941. Studies in Rubiaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 14 (4):412-426.

Ree R. 1997. Pollen Flow, Fecundity, and the Adaptive Significance of Heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) 1. *Biotropica 29*(3): 298-308.

Renner S. y Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.

Richards J. y Koptur S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80:31-40.

Riveros G., Barría O. y Humaña P. 1995. Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmannii* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution 194*(1): 1-8.

Robbrecht E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botánica Bélgica* 1: 271.

Rossi A., Oliveira L. y Vieira M. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 28: 285-294.

Ruíz C. 2014. Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, Cinchona pubescens. REBIOLEST 2(1): 5-15.

Santos-Gally R., Gonzalez-Voyer A. y Arroyo J. 2013. Deconstructing heterostyly: the evolutionary role of incompatibility system, pollinators, and floral architecture. *Evolution 67*(7): 2072-2082.

Scariot A. Lieras E. y Hay J. 1991. Reproductive Biology of the palma *Acrocomía aculeata* in Central Brazil. *Biotropica* 23: 12-22.

Schumann K. 1891. Rubiaceae. *Die naturlichen Pflanzenfamilien* 4: 1-156.

Selvaraj R. 1987. Karyomorphological studies in South Indian Rubiaceae. *Cytologia* 52(2): 343–356.

Shepherd V. 2010. Mitosis in plant cells. *Plant Cell Biology* : 209-238.

Speranza P., Vaio M. y Mazzella C. 2003. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae): An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genetics and Molecular Biology* 26(4): 449–503.

Stebbins L. 1950.Variation and evolution in plants. *Variation and evolution in plants. Columbia University:* 420.

Stebbins L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Ltda. London.

Sobrevila C, Ramírez N y De Enrech N. 1983. Reproductive biology of Palicourea flendleri and Palicourea petiolaris (Rubiaaceae), heterostylous shrubs of tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15:161–169.

Teixeira L. y Machado I. 2004a. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de Psychotria barbiflora DC.(Rubiaceae). *Acta botanica brasilica* 18: 853-862.

Teixeira L. y Machado I. 2004b. Sabicea cinerea Aubl.(Rubiaceae): distilia e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 27: 193-204.

Ulloa C., Zarucchi J. y León B. 2004. Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa*: 1-242.

Ulloa C. 2006. Aromas y sabores andinos. *Botánica económica de los Andes Centrales. La Paz:* 313-328.

Valladolid A., Blas R. y Gonzáles R. 2004. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. *Conservación y Uso de la Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos: Una Década de Investigación Para el Desarrollo (1993-2003):* 95-99.

Vermeulen K., Van Bockstaele D. y Berneman Z. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation 36*(3): 131. https://doi.org/10.1046/J.1365-2184.2003.00266.X

Weberbauer A. 1945. El Mundo vegetal de los Andes Peruanos. Estación Experimental Agrícola de la Molina: 776.

Webb J. y Lloyd G. 1986. The avoidance of interference between the presentation

of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.

Wei-Seng H., Wee-Hiang E. y Kwong-Hung L. 2021. Cytogenetic, chromosome count optimization and automation of Neolamarckia cadamba (Rubiaceae) root tips derived from in vitro mutagenesis. *Notulae Scientia Biologicae* 13(3): 10995-10995.

Wijnker E. y Schnittger A. 2013. Control of the meiotic cell division program in plants. *Plant Reproduction* 26:143–158. https://doi.org/10.1007/s00497-013-0223-x

Zevallos A. 1989. Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Cinchona* en el Perú. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

Zhou W., Barrett S., Li H., Wu Z., Wang X., Wang H. y Li D. 2017. Phylogeographic insights on the evolutionary breakdown of heterostyly. *New Phytologist 214*(3): 1368-1380. DOI:10.1111/nph.14453

Zimmerman M. 1988. Nectar production, flowering phenology, and strategies for pollination. *Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies*: 157-178.