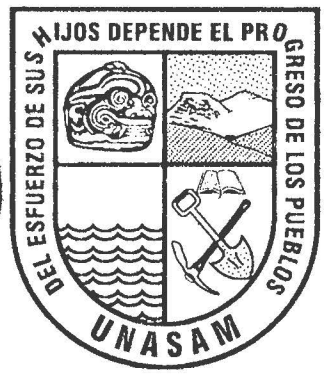
UNIVERSIDAD NACIONAL "SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO"

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

Universidad Nacional de Ancash "Santiago Antúnez de Mayolo"
División Biblioteca Especializada F. C. A.



Universidad Nacional de Ancash "Santiago Antúnez de Mayolo"
División Biblioteca Especializada F. C. A.

"EFECTO DEL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO Y ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (CHACPÁ), PARA SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO"

Presentado por:

Bach. MESTANZA ROBLES ELDER MILKO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

Huaraz, Perú

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL
"SANTIAGO ANTUNEZ DE MAYOLO"
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA – SHANCAYAN
TELEFAX - 043426588 -106
HUARAZ PERU

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado de Tesis que suscriben, reunidos para escuchar y evaluar la sustentación de Tesis presentado por el Bachiller en Ciencias Agronomía **ELDER MILKO MESTANZA ROBLES,** denominado: **"EFECTO DEL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO Y ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (CHACPÁ), PARA SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO"**. Escuchada la sustentación y las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, la declaramos:

APROBADA

CON EL CALIFICATIVO (*) MUY BUENO

En consecuencia, queda en condición de ser calificado **APTO** por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias y por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" y recibir el Título de **INGENIERO AGRÓNOMO** de conformidad con la Ley Universitaria y el Estatuto de la Universidad.

Huaraz, 13 de Abril del 2015.

Dr. JOSÉ DEL CARMEN RAMÍREZ MALDONADO
PRESIDENTE

Ing. M. Sc. NELLY PILAR CAYCHO MEDRANO
SECRETARIA

Ing. ORESTES DELFÍN ALVARADO CASTILLO
VOCAL

Ing. EUSEBIO REYES HUAMÁN
PATROCINADOR

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
COPATROCINADORA

(*) De acuerdo con el Reglamento de Tesis, ésta debe ser calificada con términos de: SOBRESALIENTE, MUY BUENO, BUENO Y REGULAR.

UNIVERSIDAD NACIONAL
"SANTIAGO ANTUNEZ DE MAYOLO"
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA – SHANCAYAN
TELEFAX - 043426588 -106
HUARAZ PERU

ACTA DE CONFORMIDAD DE TESIS

Los Miembros de Jurado de Tesis que suscriben, nombrados por Resolución N° 327-2014-UNASAM-FCA/D, se reunieron para revisar el informe de Tesis, presentado por el Bachiller en Ciencias Agronomía **ELDER MILKO MESTANZA ROBLES**, denominado: **"EFECTO DEL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO Y ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (CHACPÁ), PARA SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO"**, y sustentada el día 13 de Abril del 2015, por Resolución Decanatural N° 192-2015-UNASAM-FCA/D, lo declaramos CONFORME.

En consecuencia queda en condiciones de ser publicada.

Huaraz, 13 de Abril del 2015.

Dr. JOSÉ DEL CARMEN RAMÍREZ MALDONADO
PRESIDENTE

Ing. M. Sc. NELLY PILAR CAYCHO MEDRANO
SECRETARIA

Ing. ORESTES DELFÍN ALVARADO CASTILLO
VOCAL

Ing. EUSEBIO REYES HUAMÁN
PATROCINADOR

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
COPATROCINADORA

DEDICATORIA

En primer lugar dar gracias a Dios, por haberme guiado a lo largo de mi carrera y darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en el intento.

A mis padres: MATEO y LILA, por su apoyo, consejo, comprensión y amor en todo momento.

A mis hermanos: Soraya, quien me protege desde el cielo, y Carlos por el apoyo incondicional brindado.

A mis tíos: Elmer, Enrique, Jorge y Manuel por sus consejos y constante apoyo.

A mis profesores, compañeros y amigos por las experiencias compartidas en el transcurso de mi vida universitaria.

AGRADECIMIENTO

A MI PATROCINADOR: Ing. Eusebio Reyes Huamán

A MI COPATROCINADORA: Dr. Carmen Tamariz Angeles

Quienes con sus conocimientos y apoyo, supieron guiarme en el desarrollo de la tesis.

Al Proyecto, "Caracterización Fitoquímica, Biológica y Molecular de Plantas Alto-andinas Peruanas, con Potencial en la Industria Farmacológica", por brindarme las facilidades y los recursos, para la presente investigación.

Al Dr. Percy Olivera Gonzales, por su apoyo incondicional en la realización de la presente investigación.

A mis jurados de tesis, por las correcciones realizadas antes y durante la ejecución de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

I. INTRODUCCIÓN **1**

OBJETIVO GENERAL **2**

OBJETIVO ESPECÍFICOS **2**

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **3**

2.1. ANTECEDENTES **3**

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA **4**

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA **4**

a. Aspecto general **4**

b. Raíz **4**

c. Hojas **5**

d. Flores **5**

e. Frutos **5**

f. Semillas **5**

2.4. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT **6**

2.5. ESTADÍO DE CRECIMIENTO **6**

2.6. USOS Y POTENCIALIDADES **7**

2.7. PROPAGACIÓN DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **8**

a. Propagación asexual **8**

b. Propagación sexual **8**

2.8. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES **9**

2.9. MICROPROPAGACIÓN **9**

2.9.1. Etapa 3: Enraizamiento **10**

2.9.2. Etapa 4: Aclimatación **12**

2.10. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN **12**

2.10.1. En el enraizamiento **12**

2.10.1.1. Factores genéticos **12**

2.10.1.2. Factores fisiológicos 13
2.10.1.3. Factores del medio de cultivo 13
2.10.1.4. Factores ambientales 15
2.10.2. En la aclimatación 16
2.10.2.1. Temperatura 16
2.10.2.2. Humedad relativa e Intensidad de luz 17
2.10.2.3. Sustrato 17
2.11. SUSTRATOS 17
2.11.1. Arena 17
2.11.2. Musgo 18
2.11.3. Turba 19
2.11.3.1. Turba de musgo *Sphagnum* 20
III. MATERIALES Y MÉTODOS 21
3.1. MATERIALES 21
3.1.1. Área de estudio - ubicación 21
A. Ubicación política 21
B. Ubicación geográfica 21
3.1.2. Materiales de laboratorio 21
3.1.3. Equipos 23
3.1.4. Material vegetal e Insumos 23
3.2. MÉTODO 24
3.2.1. Tipo de Estudio 24
3.2.2. Diseño experimental 24
3.2.3. Randomización 24
3.2.4. Esquema experimental 25
3.2.5. Procesamiento estadístico 26
3.2.6. Población o Universo 28
3.2.7. Unidad de Análisis 28
3.2.8. Muestra 28
3.2.9. Parámetros a evaluar 28
a. En el enraizamiento 28
b. En la aclimatación 29
3.3. PROCEDIMIENTO 30
3.3.1. Enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. 30

a. Preparación del medio de cultivo con hormona ANA **30**

b. Preparación del medio de cultivo con hormona AG_3 ..... **30**

c. Siembra *in vitro* **31**

d. Incubación *in vitro* **32**

3.3.2. Aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en condiciones de invernadero **33**

a. Preparación y esterilización de sustratos **33**

b. Prueba previa para la transferencia de vitroplantas de la etapa III a la etapa IV **33**

c. Transferencia de vitroplantas de la etapa III a la etapa IV **34**

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36

4.1. TRATAMIENTO HORMONAL CON ÁCIDO NAFTALENACÉTICO – ANA EN LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **36**

4.1.1. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación ANA **36**

4.1.2. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA **38**

4.1.3. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de ANA **40**

4.1.4. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA **41**

4.1.5. Vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de ANA **43**

4.1.6. Vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA **44**

4.2. TRATAMIENTO HORMONAL CON ÁCIDO GIBERÉLICO - AG_3 EN LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **46**

4.2.1. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **46**

4.2.2. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **48**

4.2.3. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **49**

4.2.4. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **51**

4.2.5. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis* grandiflora (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **52**

4.2.6. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **54**

4.2.7. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **55**

4.2.8. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **57**

4.2.9. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **58**

4.3. ACLIMATACIÓN DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. EN CONDICIONES DE INVERNADERO **60**

4.3.1. Prueba previa para el prendimiento de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato en condiciones de invernadero evaluado al mes **60**

4.3.2. Aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con turba y arena en proporciones 1:1 en condiciones de invernadero **61**

V. CONCLUSIONES **62**

VI. RECOMENDACIONES **63**

VII. BIBLIOGRAFÍA **64**

VIII. ANEXOS **70**

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Pág.
1.	Randomización en el Diseño Completamente al Azar	24
2.	Diseño completamente al azar para la propagación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (Chacpá)	25
3.	Análisis de varianza (ANVA)	27
4.	Prendimiento porcentual de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato	29
5.	Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA	36
6.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA	36
7.	Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 30 días de aplicación de ANA	37
8.	Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA	38
9.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA	38
10.	Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 60 días de aplicación de ANA	39
11.	Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA	40
12.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA	40
13.	Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA	41
14.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA	42
15.	Análisis de varianza de vitroplanta con callo a los 30 días de aplicación de ANA	43
16.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para vitroplanta con callo a los 30 días de aplicación de ANA	43
17.	Análisis de varianza de vitroplanta con callo a los 60 días de aplicación de ANA	44
18.	Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para vitroplanta con callo a los 60 días de aplicación de ANA	45

19. Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **46**

20. Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **47**

21. Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **47**

22. Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **48**

23. Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **48**

24. Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **49**

25. Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **49**

26. Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **49**

27. Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **50**

28. Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **51**

29. Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **51**

30. Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **52**

31. Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **53**

32. Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **54**

33. Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **54**

34. Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **55**

35. Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3 ..... **56**

36. Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **57**

37. Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3 ..... **57**

38. Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **58**

39. Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3 ..... **59**

40. Prendimiento porcentual de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato evaluado al mes **60**

41. Porcentaje de supervivencia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en condiciones de invernadero **61**

42. Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA **70**

43. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **71**

44. Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA. **71**

45. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **72**

46. Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA **72**

47. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **73**

48. Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA **73**

49. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **74**

50. Datos tomados de vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA **74**

51. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **75**

52. Datos tomados de vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA **75**

53. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **76**

54. Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **76**

55. Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **77**

56. Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **78**

57. Datos tomados de longitud de raíz adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **79**

58. Datos tomados de longitud de raíz adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **80**

59. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **80**

60. Datos tomados de longitud de raíz adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **81**

61. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **81**

62. Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **82**

63. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **82**

64. Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **83**

65. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **83**

66. Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3 ..... **84**

67. Prueba de Comparación de Medias de Tukey **84**

ÍNDICE DE FIGURAS

Cuadro N°	Título	Pág.
1.	Estructura de Ácido Naftalenacético	11
2.	Estructura de Ácido Giberélico	11
3.	Preparación de medio de cultivo con y sin hormona	31
4.	Siembra *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.	32
5.	Incubación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.	32
6.	Preparación y esterilización de los sustratos	33
7.	Vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., transferidas a 5 sustratos diferentes en condiciones de invernadero	34
8.	Plántulas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., transferidas a un sustrato estéril (turba y arena en una proporción de 1:1)	35
9.	Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra	37
10.	Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra	39
11.	Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra	41
12.	Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra	42
13.	Promedio de vitroplanta con callo a diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra	44
14.	Promedio de vitroplanta con callo a diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra	45
15.	Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 30 días después de la siembra	47

16. Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra **48**
17. Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra **50**
18. Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 30 días después de la siembra **52**
19. Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra **53**
20. Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra **55**
21. Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 30 días después de la siembra **56**
22. Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra **58**
23. Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra **59**
24. Arbusto de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **85**
25. Flor y fruto de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **85**
26. Vitroplantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con diferentes dosis de ANA **86**
27. Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T0 (0,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días **87**
28. Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días **87**
29. Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días **88**
30. Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días **88**
31. Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días **89**
32. Cámara donde se dio las condiciones de invernadero para la aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. **89**
33. Plantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 45 días **90**
34. Plantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días **90**

ÍNDICE DE ANEXOS

Cuadro N°	Título	Pág.
1.	CUADROS	70
2.	FOTOGRAFÍAS	85

RESUMEN

El presente trabajo de investigación "EFECTO DEL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO Y ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (CHACPÁ), PARA SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO", se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo", ubicado en la Ciudad Universitaria de Shancayan, provincia de Huaraz, Departamento de Ancash.

El objetivo fue evaluar los efectos del Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3) en el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. (Chacpá), para su aclimatación en invernadero. En la etapa de enraizamiento *in vitro*, se cultivaron vitroplantas de Chacpá de 2 cm de longitud aproximadamente, en medio semisólido de Murashige & Skoog a mitad de sales, suplementado con sacarosa 2,0 % y phytagel 0,3 % a un pH de 5,67; al que se añadió una auxina (ANA) a diferentes concentraciones (0,00; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg/L), y del mismo modo una giberelina (AG_3) a diferentes concentraciones (0,00; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg/L) para ser evaluadas. El análisis estadístico que se utilizó fue el Diseño Completamente al Azar (DCA), y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$). El mejor tratamiento que produjo el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas fue T3 (0,75 mg/L de AG_3), y el de mayor longitud de raíz fue T4 (1,00 mg/L AG_3).

En la etapa de aclimatación se realizó una prueba previa durante un mes para establecer un mejor sustrato de los 5 sustratos probados: musgo + tierra (1:1); musgo + arena (1:1); turba + arena (1:1); turba + tierra (1:1) y arena sola. Obteniéndose el mejor porcentaje de prendimiento de Chacpá en turba + arena (1:1). En cuanto a las vitroplantas enraizadas de Chacpá, sembradas en turba + arena en proporciones 1:1 en condiciones de invernadero, mostraron a los 2 meses un 46 % de supervivencia.

Palabra clave: *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., enraizamiento *in vitro*, aclimatación, auxina, Ácido Naftalenacético, giberelina, Ácido Giberélico.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales altoandinas son recursos naturales, que generan ingresos económicos a numerosas familias rurales de nuestro país, dentro de estas especies se encuentra *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. conocida con el nombre común de "Chacpá" que es una especie leñosa aparentemente fuera de peligro de extinción (Reynel y Marcelo, 2009), de la cual se aprovecha las flores en infusión, para aliviar el resfrió y como ornamental (Saavedra, 1995); las ramas para fabricación de canastas y la madera como leña.

En la zona de influencia del Corredor Biológico del Parque Nacional Huascarán, la expansión de la frontera agrícola y ganadera, la extracción inadecuada y la mala planificación forestal (dando prioridad a especies exóticas como eucalipto), ponen en riesgo la composición y permanencia del hábitat donde se desarrolla el "Chacpá".

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales constituyen una de las alternativas de propagación que se pueden aplicar en un intento de mantener la biodiversidad del medio ambiente, ya que plantas en vías de extinción pueden multiplicarse *in vitro* y luego ser llevadas nuevamente a sus ambientes originales. Si bien, cada una de las fases o etapas del cultivo *in vitro* tienen sus propios desafíos y aspectos técnicos que resolver, la experiencia general indica, que las fases más críticas son introducción (contaminación de plantas) y aclimatación (incapacidad de las nuevas plantas para adaptarse a medio *ex vitro*) como lo menciona Pristley (2006). Pero para especies leñosas, el enraizamiento es una de las fases críticas en el cultivo in vitro. La forma de aplicar las hormonas de enraizamiento y su dosis, es clave para el éxito (Hermoso et al., 2013); por lo tanto, una buena micropropagación va a depender de la especie a trabajar.

Debido a que no existen trabajos de investigación sobre enraizamiento *in vitro*, y menos en aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., la investigación se ha orientado a buscar un método de enraizamiento *in vitro,* a partir de brotes para su aclimatación en invernadero.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3) en el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. (Chacpá), para su aclimatación en invernadero.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los parámetros morfológicos (número de raíces, longitud de raíces, altura de vitroplanta y la presencia de callo) en la etapa de enraizamiento de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. con diferentes concentraciones de Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3).

- Obtener la concentración óptima del Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3) para la obtención de vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br.

- Establecer el mejor sustrato para la aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en condiciones de invernadero.

- Indicar el porcentaje de supervivencia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en el mejor sustrato elegido en condiciones de invernadero.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES

Bunn y Dixon (1992), trabajaron con brotes (vitroplantas) sin enraizar de 3 a 5 cm de largo, obtenidos *in vitro* de *Grevillea scapigera* (Proteaceae), los cuales fueron enraizados en vivo en un invernadero bajo empañado 70 % de sombra utilizando un polvo de enraizamiento comercial de IBA, 0,1 % (w / w) aplicado a la base de los brotes. El 67 % de los brotes tratados de esta manera después de 5 semanas se aclimataron. Las plantas de *Grevillea scapigera* han crecido en condiciones de invernadero.

Cruzat y Barrios (2010), mencionan que algunas especies dentro de la familia Proteaceae presentan problemas en su multiplicación, lo que ha dificultado encontrar viveros con experiencia en ellas. Esto representa una seria limitante al momento de planificar el establecimiento de un plantel comercial. Lo anterior lleva a buscar técnicas avanzadas de propagación vegetativa, que permitan incrementar el material vegetal a nivel de productores y asegurar un buen establecimiento de esta especie al inicio de la producción, lo cual sólo se puede alcanzar con plantas de buena calidad.

Yldefonzo (2013), realizó estudios para establecer un método de desinfección para el establecimiento *in vitro* y determinar la concentración apropiada de hormona Bencilaminopurina (BAP) en medio Murashige y Skoog, 2,2 g/L (a mitad de la concentración), suplementado con sacarosa 2,0 % y Phytagel 0,3 % con pH 5,67 para la multiplicación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. El procedimiento de desinfección se realizó con el uso de alcohol al 70 % durante 15 minutos, siendo efectiva por su alta desinfección en folículos. Para la etapa de multiplicación de todas las concentraciones hormonales los tratamientos T4 (3,0 mg/L BAP) y T5 (4,0 mg/L BAP) permitieron la mayor cantidad de brotes.

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Brown (1811), señala que la clasificación taxonómica es de la siguiente manera:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Proteales
Familia: Proteaceae
Género: *Oreocallis*
Especie: *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

Nombres comunes: Reynel y Marcelo (2009), mencionan lo siguiente: "Chacpá", "Llama llama", "Saltaperico", "Atash", "Cucharita".

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Reynel y Marcelo (2009), mencionan las características botánicas de esta especie de la siguiente manera:

a. Aspecto general

Arbusto que llega a medir hasta 7 m de altura y el tallo 20 cm de diámetro; presentado una copa dispersa; una corteza externa agrietada, de color grisáceo, y la corteza interna de color blanquecino.

b. Raíz

Watt y John (1999), mencionan que la familia Proteaceae presenta raíces laterales cortas y densamente espaciadas (raíz proteoide).

c. Hojas

Hojas simples y alternas; color verde opaco; dispuestas en espiral; de forma elíptica a oblonga, de 7 cm a 12 cm de longitud por 3 cm a 4 cm de ancho; con el ápice obtuso a redondo; el borde entero y la base aguda. Peciolos largos, de 1 cm a 2 cm de longitud. Los nervios secundarios son de 10 a 15 pares robustos y amarillentos por el envés de la hoja. Las hojas son rígidas y sin pelos.

d. Flores

Las flores se hallan en racimos erguidos. Estas son grandes y vistosas, de 4 a 5 cm de longitud, de color rosado o crema. Son hermafroditas. Pétalos unidos formando un tubo estrecho y largo. Estambres presentes en el interior del tubo de la corola. Pistilo único con un estilo largo.

e. Frutos

Efloras (2008), menciona que presenta folículo alargado y cilíndrico, pedúnculo largo, coriáceo, pruinoso.

Yldefonzo (2013), menciona que los frutos presentan cáscara lisa, de color amarillento a verde rojizo, que se torna gris cuando madura. Frutos grandes, de 10 cm a 15 cm de longitud y 1,5 cm a 3 cm de diámetro con numerosas semillas las cuales tienen un ala membranosa.

f. Semillas

Las semillas son aladas y numerosas, la viabilidad se mantiene por un año. Peso por 1000 semillas es de 30 g.

2.4. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

Según Reynel y Marcelo (2009), la especie *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. se encuentra en toda la zona andina del Perú y Ecuador. El rango altitudinal de la especie está entre 1500 a 4000 m.s.n.m.

Pretell et al. (1985), en el Perú se encuentra a lo largo de las vertientes orientales, desde la región de Paucartambo (Departamento de Cusco) hasta Moyobamba (San Martín). También, en valles interandinos con buen nivel de humedad ambiental y sin heladas, como los de Apurímac, Mantaro, Callejón de Huaylas y zona de los Conchucos. Se le encuentra prosperando en suelos aún en formación, granito y cuarzo, por lo tanto con pH ácido.

Yldefonzo (2013), menciona que *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. se encuentra en Pitek, distrito de Independencia, provincia de Huaraz, departamento de Ancash con latitud 9°30´26.76"S, longitud de 77°28´21.33"O y a una altura de 3554 m.s.n.m.

Tamariz et al. (2011), las plantas que se encuentran a grandes alturas, como *Oreocallis grandiflora*, prefieren suelos con materia húmica, la que es transportada hacia abajo por agentes biológicos; lo que conlleva a que se aflojen las arenas rígidas cuyas partículas son muy pequeñas y constituyen poros que no permiten una fácil penetración de las raíces, pues disminuyen el grado de compactación.

2.5. ESTADÍO DE CRECIMIENTO

Ríos y Acevedo (2007), el tiempo que transcurre la planta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en cada estadío de crecimiento es: plántulas entre 2 a 3 años, juveniles 4 a 6 años (primera floración), plantas maduras entre 6 a 12 años. Y finalmente se consideran plantas viejas a partir de 13 a 15 años de vida, que generalmente se manifiesta con la muerte regresiva.

2.6. USOS Y POTENCIALIDADES

- Producto: Reynel y Marcelo (2009), mencionan que esta especie se usa en la confección de canastas con las ramitas y rebrotes (por la flexibilidad que presentan), madera con alto poder calorífico, se le valora como leña y tinglados para viveros.

- Agroforestería: Pretell et al. (1985), por su rusticidad, sistema radicular y aporte de hojarasca al suelo, es una buena especie para protección de laderas.

- Medicinal: Saavedra (1995), menciona que las flores en infusión son utilizadas para aliviar el resfrió. El jugo extraído de las cápsulas y semillas es considerado útil para el caso de hernias aplicándolo externamente en cataplasma.

Tamariz (1999), menciona que se utilizaron extractos hidroalcohólicos y acuosos de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. para realizar pruebas biológicas y fitoquímicas, los experimentos realizados demostraron en estas dos formas de extractos un gran espectro de actividad antibacteriana e indicando que los compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides/triterpenos que contienen al parecer tendrían altas actividades o estarían en altas concentraciones.

Según DICYT (2007), "el 25 por ciento de los fármacos que se prescriben hoy en día tienen origen vegetal y constituyen la base para la industria cosmética, de perfumes, agroalimentaria, de insecticidas y otras. La alternativa a la producción natural es su cultivo *in vitro*, que se basa en una propiedad de las células vegetales denominada totipotencia, es decir, "que una célula en un momento adecuado y con condiciones adecuadas puede dar lugar a una planta completa sin necesidad de que haya germinación". Producir estos compuestos en el laboratorio "evita la influencia de factores como el clima o las plagas, asegurando un buen suministro al mercado sin necesidad de tener que explotar el medio natural".

Inforegión (2010), menciona que el Perú ofrece un interesante potencial derivado de su inmensa diversidad biológica nativa para ingresar a nuevas líneas productivas así como

consolidar su actual oferta de plantas medicinales para los mercados locales, regionales, nacional e internacional.

- Ornamental: Presenta flores vistosas.

2.7. PROPAGACIÓN DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

a. Propagación asexual

Pretell et al. (1985), menciona que la propagación asexual es a través de estacas, pero debido a la pobre capacidad de enraizamiento de las estacas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., la mejor forma de propagarlo es a partir de semilla botánica.

b. Propagación sexual

Según Reynel y Marcelo (2009), el *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., en condiciones *ex vitro* se propaga sexualmente por semilla botánica, mediante un tratamiento pregerminativo: remojo en agua por 48 horas y eliminación mecánica del ala de la semilla. Las semillas se siembran en camas de almacigo, con un sustrato de tierra negra / tierra agrícola / turba / arena (1/2/1/1); con un porcentaje de germinación del 90 al 97 %. Finalizada la germinación (entre 14 y 25 días), se espera a que la planta presente 3 a 5 cm de altura para repicar a bolsas de polietileno. Finalmente para la instalación de la planta a campo definitivo se recomienda plantar a raíz desnuda, y una vez entrada la temporada de lluvias.

Mientras que en condiciones *in vitro* Yldefonzo (2013), menciona que se propaga sexualmente por semilla botánica (provenientes de folículos de color marrón, rojizo o amarillo) en medio Murashige y Skoog, 2,2 g/L (a mitad de la concentración), suplementado con sacarosa 2,0 % y Phytagel 0,3 % con pH 5,67, permitiendo el 100 % de germinación.

2.8. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Mroginski et al. (2010), definen al "Cultivo de tejidos" como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que puede ser protoplastos – células desprovistas de pared celular – células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como "cultivo in vitro de plantas" por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales).

Oxford-Complutense (1998), el cultivo de tejidos es el desarrollo de tejidos de organismos vivos fuera del organismo, en un adecuado medio de cultivo.

Roca y Mroginski (1991), mencionan que el éxito del cultivo de tejidos depende sustancialmente del medio del cultivo empleado, que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema del cultivo.

Mroginski et al. (2010), definen al medio de cultivo como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran: Una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras de crecimiento y agente gelificante (en el caso de medios semisólidos).

2.9. MICROPROPAGACIÓN

Barba et al. (2001), citado por Rosales (2014), la micropropagación implica la selección de una planta y el aislamiento de una parte de ella, llamada explante el cual después de someterse a desinfección, se coloca en un medio de cultivo en donde dará origen a embriones o brotes y finalmente, a plantas completas; una vez que se obtienen las plantas, se sacan de condiciones *in vitro* y se trasplantan a un sustrato a condiciones ambientales para su comercialización o utilización.

Según Olmos et al. (2010), la micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado.

Olmos et al. (2010), mencionan cinco etapas para la micropropagación:

Etapa 0: Preparación del material vegetal
Etapa 1: Establecimiento del cultivo
Etapa 2: Multiplicación
Etapa 3: Enraizamiento
Etapa 4: Aclimatación

Para este trabajo de investigación se ha trabajado en las dos últimas etapas, las mismas que se detallan a continuación:

2.9.1. Etapa 3: Enraizamiento

Olmos et al. (2010), mencionan que en esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

Para el enraizamiento *in vitro* se hace uso de algunos "reguladores de crecimiento", definidas por Pierik (1990) como un grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación y división celular, promueven o inhiben la aparición de raíces adventicias y/o de yemas adventicias (en los vástagos). Estas hormonas se encuentran presentes y activas en pequeñas cantidades y se las pueden clasificar en: auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno.

Para este trabajo de investigación se hizo uso de un tipo de auxina y una giberelina: Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3).

Pierik (1990), menciona que el Ácido Naftalenacético (ANA), es una auxina sintética, y relativamente más activa, utilizándose en concentraciones de 0,001-10 mg/L. Las

auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión.

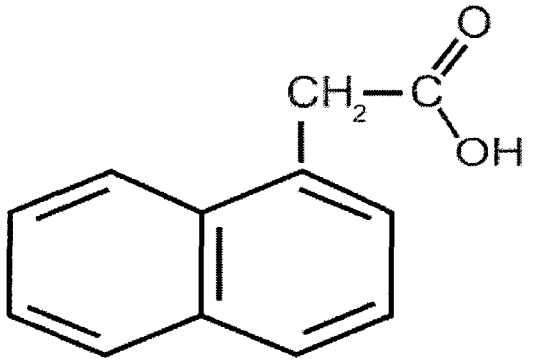


Figura 1. Estructura del Ácido Naftalenacético
Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Auxinas

Según Pierik (1990), el Ácido Giberélico (AG_3), es una de las giberelinas más usadas, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor: Se pierde el 90 % de su actividad biológica después del autoclavado. Las giberelinas generalmente inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos, pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas. Las giberelinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias, y también la formación de vástagos.

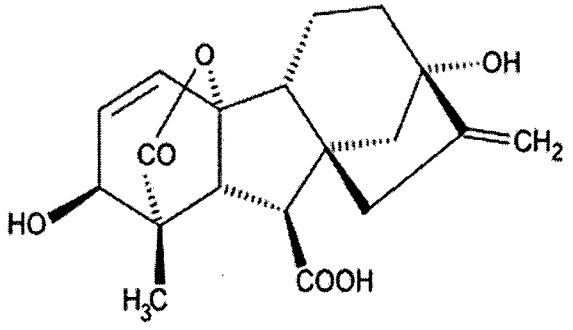


Figura 2. Estructura del Ácido Giberélico
Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_giberélico

2.9.2. Etapa 4: Aclimatación

Taiz y Zeiger (2006), mencionan que la aclimatación es la tolerancia de un organismo, especialmente una planta, como resultado de una exposición previa al estrés. La aclimatación se distingue de la adaptación porque está última se refiere al nivel de resistencia determinado genéticamente, que se ha adquirido por un proceso de selección tras numerosas generaciones.

Olmos et al. (2010), mencionan que la estrategia a implementarse durante la etapa de aclimatación deberá contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de los plantines. El retraso en el desarrollo de la cutícula y la escasa funcionalidad del aparato estomático que presentan las hojas de la mayoría de las especies cultivadas *in vitro*, determinan una alta tasa de transpiración que puede ocasionar la muerte por deshidratación. El control de este proceso fisiológico es de vital importancia durante la aclimatación, teniendo en cuenta que la disminución de la transpiración será gradual y dependerá de la rehabilitación de los estomas, así como también del desarrollo de la cutícula.

2.10. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN

2.10.1. En el enraizamiento

En general los factores que afectan el enraizamiento *in vitro* son: factores genéticos, factores fisiológicos, factores del medio de cultivo (como carbohidratos, nutrientes minerales y reguladores de crecimiento), factores ambientales, entre otros.

2.10.1.1. Factores genéticos

Radice (2010), manifiesta que el genotipo es un proceso determinante en todos los procesos morfogénicos (entiéndase por morfogénesis como la capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explanto inicial), desde la capacidad del

explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Por esta causa no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo.

Según Cortina et al. (2006), muchas de las características relacionadas con el crecimiento y la adaptación de las especies están sujetos a control genético, y se ha de tener en cuenta para un uso correcto de los materiales de reproducción.

Greenwood y Weir (1994), citado por Solé (2012), han sugerido que la variación genética relacionada con la capacidad de enraizamiento podría ser dependiente de variaciones en la respuesta a auxina de cada familia.

2.10.1.2. Factores fisiológicos

Marín (1997), reporta que el estado fisiológico en que se encuentra el brote es muy importante. Esta influido tanto por el origen del explanto como por subcultivos anteriores. Los explantos tomados de plantas jóvenes enraízan con más facilidad que los tomados de plantas adultas. El enraizamiento mejora al aumentar el número de subcultivos *in vitro*, dado que se produce un presunto rejuvenecimiento, también con etiolación y con heridas basales. Por otra parte, el enraizamiento es perjudicado por una alteración fisiológica, la vitrificación, en que los tejidos se vuelven hiperhídricos.

2.10.1.3. Factores del medio de cultivo

Carbohidratos

Pierik (1990), menciona que el azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo, y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis debido a la baja intensidad lumínica.

Mroginski et al (2010), manifiestan que prácticamente todos los cultivos *in vitro* son heterótrofos y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, es el azúcar más utilizado.

Nutrientes minerales

Marín (1997), menciona que los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. Una concentración de nutrientes minerales reducida a la mitad o a la cuarta parte suele mejorar el enraizamiento en árboles y arbustos.

Olmos (2010), menciona que los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige y Skoog) y el WPM (woody plant medium, esto es, medio para plantas leñosas).

Reguladores de crecimiento

Pierik (1990), menciona que en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y citoquininas, juegan un papel muy importante.

Radice (2010), estos compuestos pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada.

Taiz y Zeiger (2006), mencionan que la relación auxina/citoquinina regula la morfogénesis en cultivos de tejidos de la siguiente manera: relaciones altas de auxina/citoquinina estimulan la formación de raíces, valores bajos de la relación auxina/citoquinina dan lugar a la formación de tallos. A niveles intermedios el tejido crece como un callo indiferenciado.

Marín (1997), menciona que las aplicaciones de auxina durante todo el enraizamiento a 0,2-3 mg/L son poco utilizadas, ya que muchos patrones forman

abundante callo debido a la acción continua de la auxina, especialmente con el ANA.

Pernisova et al. (2008), Selby et al. (1992), citado por Solé (2012), mencionan que los efectos de las hormonas vegetales como las citoquininas, las giberelinas y el ácido abscísico en el proceso de formación de raíces adventicias también ha sido estudiado. Las citoquininas parecen ser el inhibidor más activo de enraizamiento adventicio y se ha sugerido que participan en la regulación de la distribución auxínica intracelular afectando a la capacidad de inducción de organogénesis de la auxina. Por otro lado el efecto inhibidor de enraizamiento de las giberelinas y el ácido abscísico parece ser menos potente que el de las citoquininas.

Según Harbage y Stimart (1996), citado por Marín (1997), en el medio de cultivo el pH y la actividad de los tejidos cultivados disminuyen con el tiempo, encontrando una influencia notable de la acidificación del medio en la inhibición del enraizamiento.

2.10.1.4. Factores ambientales

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales más favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie, 1986).

Mroginski et al. (2010), Marín (1997), en general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25-28 °C. La temperatura comúnmente utilizada para enraizamiento es cercana a 25 °C, aunque en ciertos casos ha sido favorable una temperatura más alta (35 °C).

Marín (1997), Mroginski et al. (2010), la luz es necesaria, para que la morfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal, los cultivos sometidos a intensidades de luz muy altas o muy bajas no muestran buen crecimiento. Intensidades de 1000 a 3000 lux son suficientes para un desarrollo normal. La luz

es generalmente provista de lámparas fluorescentes del tipo <<luz día>>, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas.

Radice (2010), la humedad dependerá del sello o cobertura del envase empleado. Si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100 %. Si en cambio existe la posibilidad de un intercambio gaseoso la humedad puede descender a niveles cercanos al 50 %. Este importante descenso de humedad puede provocar variación en la concentración de sus compuestos hasta llegar a niveles tóxicos.

2.10.2. En la aclimatación

Hartman y Kester (1997), la duración de esta etapa depende principalmente de la rusticidad de las especies pero en general es de 45 a 60 días aproximadamente.

Pierik (1990), las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen generalmente la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90-100 %. Como consecuencia, cuando se transfiere la planta al suelo, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones in vivo es más baja. En las plantas procedentes de tubo de ensayo tienen las células en empalizadas (presentan un gran contenido de cloroplastos y su función fotosintética es primordial) más pequeñas y en menor cantidad. Los estomas pueden no ser suficientemente operativos; y al permanecer abiertos, cuando la planta ha pasado al suelo pueden ser el origen de un importante estrés hídrico, durante las primeras horas de aclimatación. Es importante tener en cuenta que la planta no ha desarrollado su capacidad fotosintética.

Castillo (2007), Rojas et al. (2004), los factores ambientales a tomar en cuenta en la etapa de aclimatación son: temperatura, humedad relativa e intensidad de luz y sustrato.

2.10.2.1. Temperatura: para la mayoría de los cultivos en invernadero está entre los 20 a 25 °C.

2.10.2.2. Humedad relativa e Intensidad de luz: en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar. Se requiere durante los tres primeros días de un ambiente cercano al 95 % de humedad relativa y 40 % de exposición a la luz.

2.10.2.3. Sustrato: suelto, poroso, y estéril para fomentar el crecimiento, desarrollo y especialización de las raíces.

2.11. SUSTRATOS

Alvarado y Solano (2002), definen al sustrato o medio como material en el cual se plantan semillas, se insertan brotes, o se establecen plantas. Presentando las siguientes funciones: Proporciona un anclaje y soporte para la planta, retiene humedad de modo que esté disponible para la planta, permite el intercambio de gases entre las raíces y la atmosfera, y servir como depósito para los nutrientes de la planta.

Debido a que la familia Proteaceae presentan raíz proteoide (Watt y John, 1999). Las plantas de Chacpá deben estar en un sustrato adecuado que les proporcione sostén y drenaje.

2.11.1. Arena

Infoagro (2014), la arena es de origen inorgánico o mineral natural, como la arena de río. Su granulometría más adecuada oscila entre 0,5 y 2 mm de diámetro, densidad aparente es similar a la grava, su capacidad de retención del agua es media (20 % del peso y más del 35 % del volumen), su capacidad de aireación disminuye con el tiempo a causa de la compactación, su capacidad de intercambio catiónico es nula. Es relativamente frecuente que su contenido en caliza alcance el 8-10 %. Algunos tipos de arena deben lavarse previamente. Su pH varía entre 4 y 8. Su durabilidad es elevada. Es bastante frecuente su mezcla con turba, como sustrato de enraizamiento y de cultivo en contenedores.

2.11.2. Musgo

Campbell y Reece (2007), Bryophyta es el nombre taxonómico formal del filo constituido solamente por los musgos. Estas plantas son particularmente comunes y se diversifican en los bosques húmedos y terrenos pantanosos, donde constituyen hábitats para minúsculos animales. Algunas especies de musgos habitan inclusive en ambientes tan extremos como cumbres de las montañas, tundras y desiertos. Muchos musgos existen en hábitats muy fríos o secos porque pueden sobrevivir a la pérdida de la mayor parte de su agua corporal y luego rehidratarse cuando la humedad está a su disposición.

Un género de musgo de los terrenos pantanosos, *Sphagnum*, o musgo de la turba o musgo esfagno, está ampliamente distribuido, formando extensos depósitos de material orgánico parcialmente degradado conocido como turba.

Condori et al. (2012), mencionan que hasta el momento se han reportado para el Perú cuatro especies, siendo la de mayor abundancia la especie *Sphagnum maguellanicum*, la cual crece en las zonas altoandinas, con altos índices de humedad. El cual es cosechado y secado por las comunidades de Junín para ser luego exportado a bajo precio, principalmente como sustrato para el cultivo de orquídeas.

Estudios realizados en las características fisicoquímicas obtenidas para dos muestras de *Sphagnum maguellanicum* colectadas en Junín muestran:

- Densidad aparente: 0,02175 – 0,02615 g/mL.
- pH: 4,5 – 6,0.
- Conductividad: 182,7-197,2 uS.
- Captación de agua (30 segundos): 16 – 21 mL/g.
- Capacidad de retención del agua 21 veces su peso seco.

2.11.3. Turba

Serrada (2000), la base más extendida para la formación de sustratos para el cultivo de planta forestal es la turba natural, pura o mezclada con otros componentes, que es biológicamente estéril, de baja densidad, higroscópica y bastante estable.

Jaramillo (2002), define a la turba como residuos vegetales disgregados, incompletamente descompuestos.

Abad y Noguera (1998), citado por Jaramillo (2002), resaltan las siguientes propiedades:

- La densidad aparente puede llegar máximo hasta 0,6 g/mL.
- La porosidad total puede llegar a ser mayor al 95 %.
- El pH puede variar entre 3,5 y 8,5.
- Presentan alta CIC: mayor a 100 cmol (+) (kg de suelo)$^{-1}$.
- Tienen un bajo nivel de fertilidad.
- Capacidad de retención del agua 41-59 %.

Alvarado (2002), la turba consiste en vegetación acuática, pantanosa o de ciénaga parcialmente descompuesta. La composición de los diferentes depósitos de turba varía mucho, dependiendo de la vegetación original, estado de descomposición, contenido mineral y grado de acidificación. La turba puede ser clasificada en cuatro tipos distintos:

- Turba de musgo Sphagnum.
- Turba de musgo Hypneum.
- Turba de cañuela y junco.
- Turba de humus o estiércol.

Soil Survey Division Staff (SSDS, 1993), citado por Jaramillo (2002), reúne, con un sentido meramente descriptivo y práctico, los diferentes tipos de turbas en cuatro grupos:

- **Turba de musgo**: Compuesta por residuos de musgos, incluyendo *Sphagnum*.

- **Turba herbácea**: Compuesta por residuos de plantas herbáceas como juncos.

- **Turba de madera**: Formada por residuos de plantas leñosas como árboles y rastrojos.

- **Turba sedimentaria**: Depósito orgánico compuesto principalmente por restos de plantas acuáticas flotantes y de residuos de material fecal de animales acuáticos.

2.11.3.1. Turba de musgo *Sphagnum*

Según Alvarado (2002), es la forma de materia orgánica más popular para la preparación de sustratos para potes. El drenaje y la aireación son muy mejorados. La acidez de esta turba varía con su origen, pero en general es bastante ácida. El aspecto más importante es que no ocurren cambios biológicos o químicos, en el medio de cultivo, preparado con esta turba después de la pasteurización.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Área de estudio - ubicación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo", por un período comprendido entre los meses de agosto de 2014 a febrero de 2015

A. Ubicación política

Departamento : Ancash
Provincia : Huaraz
Distrito : Independencia
Lugar : Shancayan-Ciudad Universitaria de la UNASAM

B. Ubicación geográfica

Latitud : 09°30'59.35''S
Longitud : 77°31'27.86''O
Altitud : 3082 m.s.n.m.

3.1.2. Materiales de laboratorio

- Placas de Petri de 150 x 15 mm
- Pipetas de 10 mL
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL

- Beakers de 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Termómetro ambiental
- Hidrómetro
- Mechero de alcohol
- Magentas de plástico de aprox. 150 mL
- Tubos de ensayo de 25 x 150 mm
- Goteros con perilla o dedal de jebe
- tapas para tubos de 25 x 150 mm
- Tijera quirúrgica
- Pinza de 20 cm de largo
- Espátula
- Microespátula
- Gradillas de plástico y metal
- Papel toalla
- Bandejas de plástico
- Plumón marcador
- Regla de escritorio
- Pizeta
- Fluorescentes
- Fósforo
- Gorros
- Guantes de látex
- Mascarillas
- Guardapolvo
- Algodón
- Envases de plástico
- Ligas de hule
- Pulverizador

3.1.3. Equipos

- Balanza analítica marca ADAM
- Autoclave Horizontal marca Phoenix
- Refrigeradora marca LG
- pH-metro marca Thermo Scientific Orion 4 Star
- Agitador magnético marca IKA- CMAG HS7
- Micropipeta marca Axygen de 100 – 1000 uL
- Micropipeta marca Axygen de 20 – 200 uL
- Cámara fotográfica marca Canon 16 mp
- Luxómetro marca PCE Instruments
- Cámara de flujo laminar marca Labconco
- Cámara de aclimatación o estante de vidrio con puerta corrediza

3.1.4. Material vegetal e Insumos

- Explantos (Vitroplantas) de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.
- Hormona Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG_3) (SIGMA)
- Medio basal Murashige y Skoog (SIGMA)
- Sacarosa (Scharlau)
- Phytagel (SIGMA)
- Modificadores de pH (HCl y NaOH)
- Buffer
- Alcohol de 96°
- Agua destilada estéril
- Metanol
- Sustratos: tierra agrícola, turba, musgo y arena

3.2. MÉTODO

3.2.1. Tipo de Estudio

Se trata de una investigación aplicada por que los resultados obtenidos nos permitirán brindar recomendaciones sobre el enraizamiento y aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

3.2.2. Diseño experimental

El diseño estadístico empleado es el Diseño Completamente al Azar DCA con 5 tratamientos (incluido el testigo) y 20 repeticiones por hormona.

3.2.3. Randomización

Cuadro 01: Randomización en el Diseño Completamente al Azar.

Variable independiente X / **Variable dependiente Y**		CONCENTRACIONES HORMONALES (T_n)				
		T_0	**T_1**	**T_2**	**T_3**	**T_4**
Componente de la planta	**P_1**	**T_0P_1**	**T_1P_1**	**T_2P_1**	**T_3P_1**	**T_4P_1**

<u>Para el Ácido Naftalenacético (ANA)</u>

Dónde:

P_n: Explante, subcultivado de la etapa de multiplicación (Etapa II).
T_n: Concentración final de Ácido Naftalenacético - ANA ($mg.L^{-1}$): $T_0 = 0$ $mg.L^{-1}$; $T_1 = 0{,}25$ $mg.L^{-1}$; $T_2 = 0{,}50$ $mg.L^{-1}$; $T_3 = 0{,}75$ $mg.L^{-1}$ y $T_4 = 1$ $mg.L^{-1}$.

Para el Ácido Giberélico (AG_3)

Dónde:

P_n: Explante, subcultivado de la etapa de multiplicación y (etapa II).

T_n: Concentración final de Ácido Giberélico - AG_3 ($mg.L^{-1}$): T_0 = 0 $mg.L^{-1}$; T_1 = 0,25 $mg.L^{-1}$; T_2 = 0,50 $mg.L^{-1}$; T_3 = 0,75 $mg.L^{-1}$ y T_4= 1 $mg.L^{-1}$.

3.2.4. Esquema experimental

Cuadro 02: Diseño completamente al azar para la propagación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. (Chacpá).

T_3	T_0	T_2	T_4	T_1	T_0	T_2	T_4	T_3	T_1
T_3R_1	T_0R_1	T_2R_1	T_4R_1	T_1R_1	T_0R_1	T_2R_1	T_4R_1	T_3R_1	T_1R_1
T_3R_2	T_0R_2	T_2R_2	T_4R_2	T_1R_2	T_0R_2	T_2R_2	T_4R_2	T_3R_2	T_1R_2
T_3R_3	T_0R_3	T_2R_3	T_4R_3	T_1R_3	T_0R_3	T_2R_3	T_4R_3	T_3R_3	T_1R_3
T_3R_4	T_0R_4	T_2R_4	T_4R_4	T_1R_4	T_0R_4	T_2R_4	T_4R_4	T_3R_4	T_1R_4
T_3R_5	T_0R_5	T_2R_5	T_4R_5	T_1R_5	T_0R_5	T_2R_5	T_4R_5	T_3R_5	T_1R_5
T_3R_6	T_0R_6	T_2R_6	T_4R_6	T_1R_6	T_0R_6	T_2R_6	T_4R_6	T_3R_6	T_1R_6
T_3R_7	T_0R_7	T_2R_7	T_4R_7	T_1R_7	T_0R_7	T_2R_7	T_4R_7	T_3R_7	T_1R_7
T_3R_8	T_0R_8	T_2R_8	T_4R_8	T_1R_8	T_0R_8	T_2R_8	T_4R_8	T_3R_8	T_1R_8
T_3R_9	T_0R_9	T_2R_9	T_4R_9	T_1R_9	T_0R_9	T_2R_9	T_4R_9	T_3R_9	T_1R_9
T_3R_{10}	T_0R_{10}	T_2R_{10}	T_4R_{10}	T_1R_{10}	T_0R_{10}	T_2R_{10}	T_4R_{10}	T_3R_{10}	T_1R_{10}
T_3R_{11}	T_0R_{11}	T_2R_{11}	T_4R_{11}	T_1R_{11}	T_0R_{11}	T_2R_{11}	T_4R_{11}	T_3R_{11}	T_1R_{11}
T_3R_{12}	T_0R_{12}	T_2R_{12}	T_4R_{12}	T_1R_{12}	T_0R_{12}	T_2R_{12}	T_4R_{12}	T_3R_{12}	T_1R_{12}
T_3R_{13}	T_0R_{13}	T_2R_{13}	T_4R_{13}	T_1R_{13}	T_0R_{13}	T_2R_{13}	T_4R_{13}	T_3R_{13}	T_1R_{13}
T_3R_{14}	T_0R_{14}	T_2R_{14}	T_4R_{14}	T_1R_{14}	T_0R_{14}	T_2R_{14}	T_4R_{14}	T_3R_{14}	T_1R_{14}
T_3R_{15}	T_0R_{15}	T_2R_{15}	T_4R_{15}	T_1R_{15}	T_0R_{15}	T_2R_{15}	T_4R_{15}	T_3R_{15}	T_1R_{15}
T_3R_{16}	T_0R_{16}	T_2R_{16}	T_4R_{16}	T_1R_{16}	T_0R_{16}	T_2R_{16}	T_4R_{16}	T_3R_{16}	T_1R_{16}
T_3R_{17}	T_0R_{17}	T_2R_{17}	T_4R_{17}	T_1R_{17}	T_0R_{17}	T_2R_{17}	T_4R_{17}	T_3R_{17}	T_1R_{17}
T_3R_{18}	T_0R_{18}	T_2R_{18}	T_4R_{18}	T_1R_{18}	T_0R_{18}	T_2R_{18}	T_4R_{18}	T_3R_{18}	T_1R_{18}
T_3R_{19}	T_0R_{19}	T_2R_{19}	T_4R_{19}	T_1R_{19}	T_0R_{19}	T_2R_{19}	T_4R_{19}	T_3R_{19}	T_1R_{19}
T_3R_{20}	T_0R_{20}	T_2R_{20}	T_4R_{20}	T_1R_{20}	T_0R_{20}	T_2R_{20}	T_4R_{20}	T_3R_{20}	T_1R_{20}

Hormona: Ácido Naftalenacético (ANA)

T_0: 0 mg/L el testigo

T_1: 0,25 mg/L de Ácido Naftalenacético (ANA)

T_2: 0,50 mg/L de Ácido Naftalenacético (ANA)

T_3: 0,75 mg/L de Ácido Naftalenacético (ANA)

T_4: 1 mg/L de Ácido Naftalenacético (ANA)

R_n: Repeticiones

Hormona Ácido Giberélico (AG3)

T_0: 0 mg/L el testigo

T_1: 0,25 mg/L de Ácido Giberélico (AG_3)

T_2: 0,50 mg/L de Ácido Giberélico (AG_3)

T_3: 0,75 mg/L de Ácido Giberélico (AG_3)

T_4: 1 mg/L de Ácido Giberélico (AG_3)

R_n: Repeticiones

3.2.5. Procesamiento estadístico

Se empleó el Diseño Completamente al Azar DCA. Empleándose además la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Modelo aditivo lineal para DCA:

Para el Ácido Naftalenacético (ANA)

$$Yij = \mu + \tau i + \varepsilon ij$$

Dónde:

Yij : Valor o rendimiento obtenido en el j-ésimo explanto de Chacpá, tratado con la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Naftalenacético (ANA).

μ : Efecto de la media general.

τi : Efecto de la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Naftalenacético (ANA).

εij: Efecto del error experimental en el j-ésimo explanto de Chacpá, tratado con la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Naftalenacético (ANA).

Para el Ácido Giberélico (AG_3)

$$Yij = \mu + \tau i + \varepsilon ij$$

Dónde:

Yij : Valor o rendimiento obtenido en el j-ésimo explanto de Chacpá, tratado con la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Giberélico (AG_3).

μ : Efecto de la media general.

τi : Efecto de la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Giberélico (AG_3).

εij: Efecto del error experimental en el j-ésimo explanto de Chacpá, tratado con la i-ésima dosis de la hormona de Ácido Giberélico (AG_3).

Análisis de varianza

El análisis de varianza para un diseño completamente al azar

Cuadro 03: Análisis de varianza (ANVA).

Fuentes de variación	G.L.	S.C	C.M.	F.Cal
Tratamiento	t – 1	$\Sigma Y_{i.}^2/r_i - TC$	SC(τ)/gl(τ)	CMτ/ CMε
Error	r. – t	$\Sigma Y_{ij}^2 - \Sigma Y_{i.}^2/r_i$	SC(ε)/gl(ε)	
Total	r. – 1	$\Sigma Y_{ij}^2 - TC$		

3.2.6. Población o Universo

Explantos (vitroplantas) de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. obtenidas en el proceso final de multiplicación (Etapa 02).

3.2.7. Unidad de Análisis

Explanto (vitroplanta) de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

3.2.8. Muestra

Doscientos explantos (vitroplantas) de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

3.2.9. Parámetros a evaluar

a. En el enraizamiento

- **Número de raíces adventicias:** Estos datos fueron tomados mediante la observación haciendo el conteo de cada raíz adventicia por cada vitroplanta (200) para todos los tratamientos cada 30 días hasta los 90 días para AG_3 y 60 días para ANA.

- **Longitud de raíz adventicia:** Se tomó las medidas (en centímetros) con la ayuda de una regla desde el punto de inserción de la raíz en el tallo hasta el ápice de la raíz para todos los tratamientos cada 30 días hasta los 90 días para AG_3.

- **Vitroplanta con callo:** Estos datos fueron tomados mediante la observación haciendo el conteo de cada vitroplanta con callo para todos los tratamientos con ANA (incluido el testigo-T0) cada 30 días hasta los 60 días.

- **Altura de vitroplanta:** Se tomó las medidas (en centímetros) con la ayuda de una regla desde donde inicia la parte del tallo hasta la parte apical de la planta. Estos

datos fueron cuantificados para cada vitroplanta en estudio cada 30 días hasta los 90 días para AG_3 y 60 días para ANA.

b. En la aclimatación

- **Mejor sustrato**: Esta evaluación se realizó con las mejores vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., los cuales fueron sembrados en 5 sustratos diferentes (cuadro 04) en condiciones de invernadero y evaluados porcentualmente al término de un mes.

Cuadro 04: Prendimiento porcentual de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato.

Sustratos	**A** Musgo + Tierra (1:1)	**B** Musgo + Arena (1:1)	**C** Turba + Arena (1:1)	**D** Arena	**E** Turba + Tierra (1:1)
Prendimiento porcentual (%)	%	%	%	%	%

- **Porcentaje de supervivencia:** Las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. fueron tomadas al azar, y sembradas en el mejor sustrato en condiciones de invernadero, la evaluación se realizó descriptivamente durante 2 meses en función de la respuesta morfológica (aparición de brotes). La variable de interés se cuantifico mediante la siguiente operación:

$$\textit{\% Supervivencia} = \frac{\textit{Plantas viables}}{\textit{Total de plantas}} \times 100\ \%$$

3.3. PROCEDIMIENTO

3.3.1. Enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

a. Preparación del medio de cultivo con hormona ANA

Este proceso se realizó en el laboratorio, donde se tomó como base la preparación de un litro de medio semisólido Murashige y Skoog. Pesamos sacarosa extra pura (Scharlau) 2,0 g/100 mL, más el medio Murashige y Skoog (Marca Sigma) 2,2 g/1000 mL (a mitad de la concentración indicada de 4,4 g/1000 mL). Se mezcló en 300 mL de agua destilada (para cada tratamiento incluido el testigo), en un matraz (de 500 mL) y se agitó hasta tener una solución homogénea, casi transparente; luego con la ayuda de una micropipeta se agregó las dosis correspondientes de ANA en diferentes concentraciones (Cuadro 02). Se vertió en un Beaker (de 500 mL). Los medios líquidos fueron homogenizados en un agitador magnético, y se ajustó el pH a 5,67 con el pH-metro, añadiendo el NaOH (1,0 N) para subir el pH, y HCl (1,0 N) para disminuir el pH.

Para la gelificación a condición semisólida se agregó Phytagel (Marca Sigma) 0,3 g/100 mL. Una vez disuelto homogéneamente el agente gelatinizador con la ayuda del microondas, el medio fue dispensado en tubos de ensayo (25 × 150 mm) a razón de 15 mL por tubo.

Los tubos fueron tapados y esterilizados en autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de 120 °C y 1 atm de presión. Finalmente se sacó y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

b. Preparación del medio de cultivo con hormona AG_3

Al igual que en el primer caso se preparó el Medio Murashige y Skoog (a mitad de concentración de sales) suplementado con sacarosa 2,0 g/100 mL, Phytagel 0,3 g/ 100 mL, y AG3 en diferentes concentraciones (Cuadro 02).

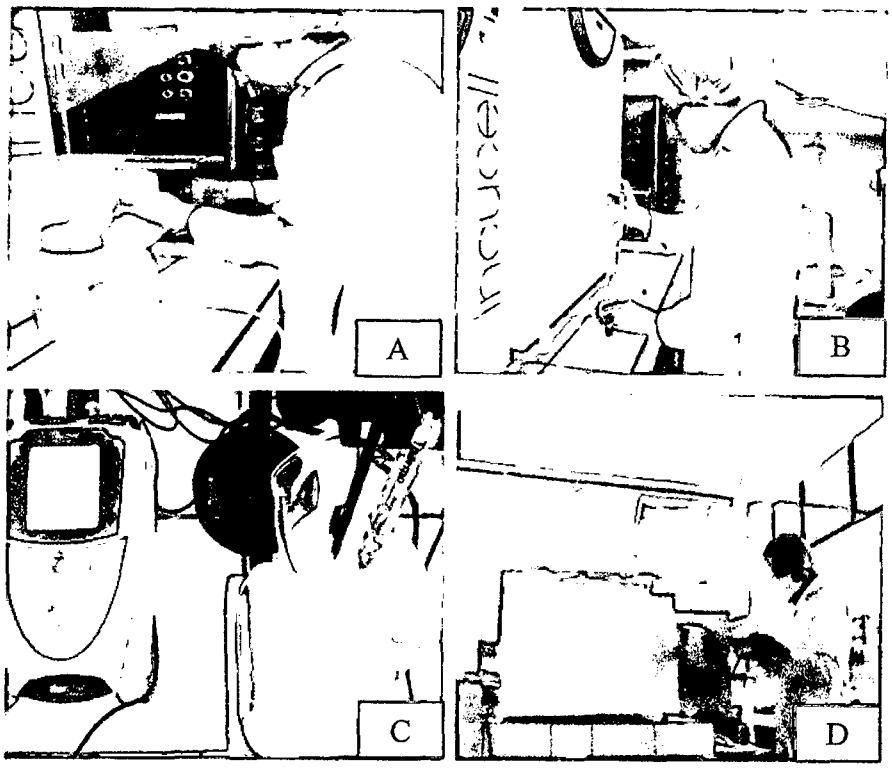


Figura 03. Preparación de medio de cultivo con y sin hormonas. A) Pesado de sacarosa, MS/2 y Phytagel. B) Incorporacion de hormona a la solución de sacarosa y MS/2. C) Medición de pH del medio de cultivo D) Medios de cultivo esterilizados.

c. Siembra *in vitro*

Se utilizaron 200 explantos (vitroplantas) de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en la fase final del subcultivo de la etapa de multiplicación y mantenidas en MS/2 por 45 días.

Los explantos de Chacpá se seleccionaron en función del tamaño, grosor del tallo y edad con el fin de disminuir la variabilidad de respuesta a enraizamiento.

En la cámara de flujo laminar, se sembró los explantos (la parte juvenil de las vitroplantas) de 2 cm de altura aproximadamente, con la ayuda de una pinza y una tijera quirúrgica, en los tubos de ensayo que contenían el medio Murashige y Skoog a mitad de sales, más las dosis hormonal de ANA; del mismo modo se trabajó para el AG_3 (200 tubos/día).

Se utilizó una vitroplanta por cada tubo de ensayo.

Figura 04. Siembra *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. A) Corte del explanto deseado. B) Siembra del explanto en tubo de ensayo con medio de cultivo.

d. Incubación *in vitro*

Se incubaron los explantos sembrados en tubo de ensayo durante 90 días para el caso del AG_3, y 60 días para el caso del ANA con un fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad, una intensidad lumínica de 1300 lux y una temperatura constante a 20 ± 2 °C, durante el cual se evaluó cada 30 días las variables de interés.

Figura 05. Incubación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. A) Incubación de los explantos sembrados. B) Evaluación de las variables de interes.

3.3.2. Aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en condiciones de invernadero.

a. Preparación y esterilización de sustratos

Se preparó 5 sustratos diferentes (cuadro 04). Los sustratos fueron distribuidos en cada envase de plástico (de 8 × 10 cm), humedecidos con la ayuda de un pulverizador de mano y puestos en bandejas de plástico, para luego ser llevados a esterilizar en el autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de 120 °C y 1 atm de presión.

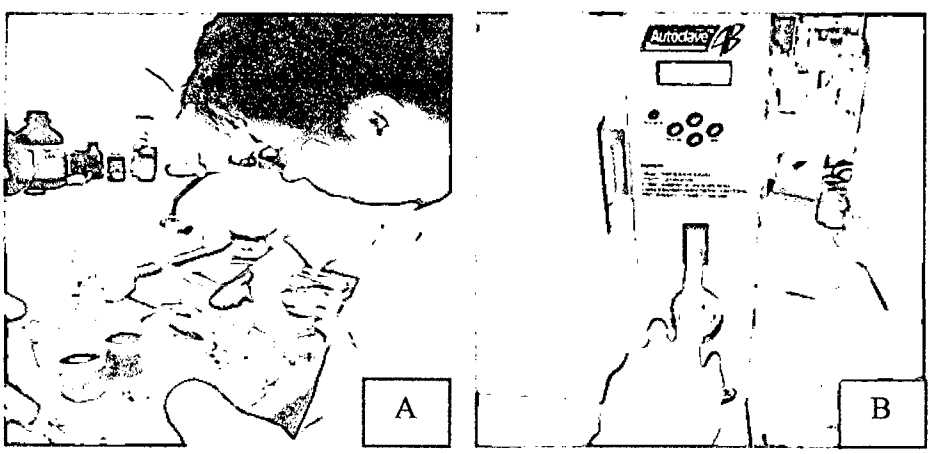


Figura 06. Preparación y esterilización de los sustratos. A) Humedecimiento de los sustratos. B) Encendido de autoclave para la esterilización de los sustratos.

b. Prueba previa para la transferencia de vitroplantas de la etapa III a la etapa IV.

Se realizó esta prueba previa para la aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en condiciones de invernadero, para establecer el mejor sustrato de los 5 sustratos diferentes (cuadro 04). Siendo de estos sustratos, los 4 tipos de sustratos los más utilizados en viveros y de mayor acceso en nuestra localidad como: arena, musgo, turba y tierra agrícola.

Las vitroplantas enraizadas (sin hormona) fueron extraídas de cada tubo de ensayo con la ayuda de pinzas. Luego se lavaron muy bien con agua de caño para remover los residuos del medio de cultivo. Seguidamente se sembraron en los envases de plásticos que contenían los diferentes sustratos (cuadro 04), que fueron previamente

esterilizados. Finalmente fueron puestos en cámara humedad durante una semana (humedad de 80-90 %), hasta bajar la humedad gradualmente en un 70 % (condiciones de invernadero) al terminar el mes, donde se observó el mejor sustrato para el prendimiento de Chacpá.

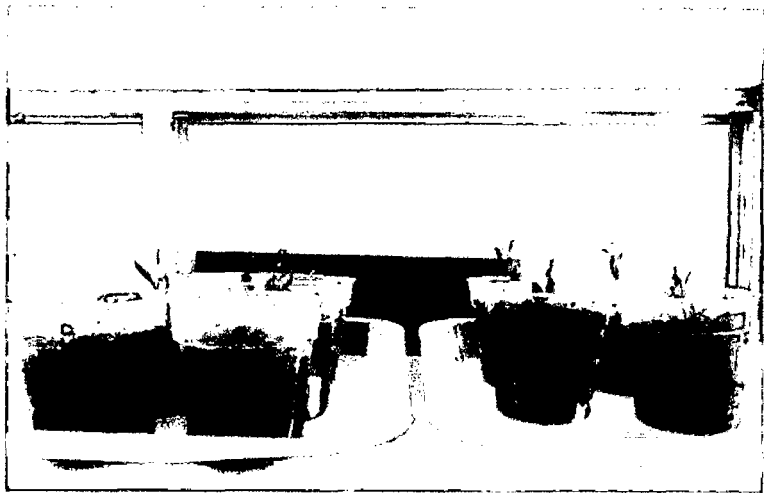


Figura 07. Vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., transferidas a 5 sustratos diferentes en condiciones de invernadero.

c. Transferencia de vitroplantas de la etapa III a la etapa IV

Una vez establecido el mejor sustrato (turba + arena en una proporción de 1:1), las vitroplantas enraizadas *in vitro* con las mejores condiciones fueron extraídas de cada tubo de ensayo con la ayuda de una pinza, lavadas muy bien con agua de caño para remover los residuos del medio de cultivo, sembradas en vasos descartables (con el sustrato esterilizado) y cubiertos con estos (Figura 08), para luego ser puestos en cámara húmeda, después de dos semanas los vasos (que cubren a las plantitas) se retiraron . El riego se realizó con la ayuda de un pulverizador de mano, la frecuencia de riego fue cada 48 horas la primera semana y la siguiente de una por semana (durante siete semanas). Siendo evaluado el porcentaje de supervivencia en condiciones de invernadero cada mes durante 2 meses.

Figura 08. Plántulas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., transferidas a un sustrato estéril (turba y arena en una proporción de 1:1).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TRATAMIENTO HORMONAL CON ÁCIDO NAFTALENACÉTICO - ANA EN LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

4.1.1. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de ANA

Cuadro 05: Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	0,3844	0,0961	7,28 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	1,2577	0,0132	
TOTAL	99	1,6421		

En el Cuadro 05, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 11,14 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 06: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio	Significancia
T0 (Testigo)	0,4	A
T1	0	B
T2	0	B
T3	0	B
T4	0	B

La prueba de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., muestra que el tratamiento T0 (Testigo), con un promedio de 0,4 raíces adventicias, presento diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás tratamientos: T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA), los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

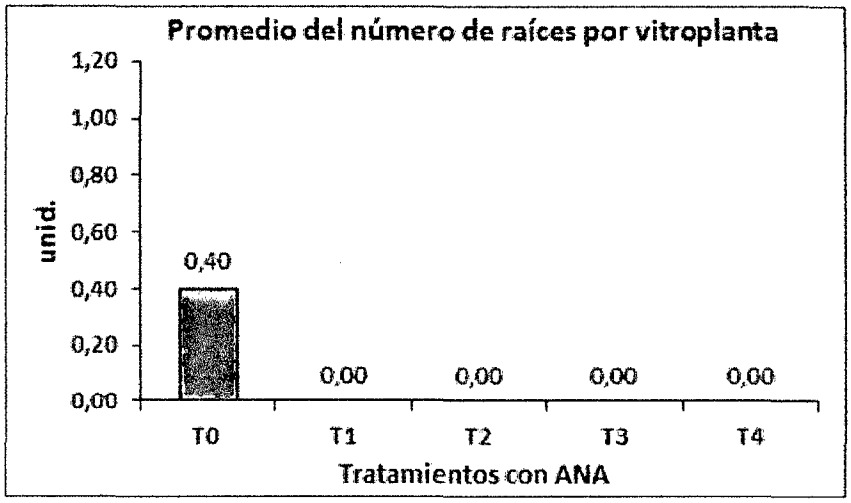


Figura 09: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

Cuadro 07: Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 30 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Total de vitroplantas enraizadas	Vitroplantas enraizadas (%)
T0	6	30
T1	0	0
T2	0	0
T3	0	0
T4	0	0

En el cuadro 07, se observa que T0 (Testigo), con un porcentaje de 30 % presenta el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas en comparación con T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %; T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %; T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 % y T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %.

4.1.2. Número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA

Cuadro 08: Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	1,8934	0,4733	9,23 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	4,8721	0,0513	
TOTAL	99	6,7655		

En el Cuadro 08, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 21,19 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 09: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio	Significancia
T0 (Testigo)	1,05	A
T1	0	B
T2	0	B
T3	0	B
T4	0	B

La prueba de Tukey, para el número de raíces adventicias por vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., muestra que el tratamiento T0 (Testigo), con un promedio de 1,05 raíces adventicias, presento diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás tratamientos: T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA), los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

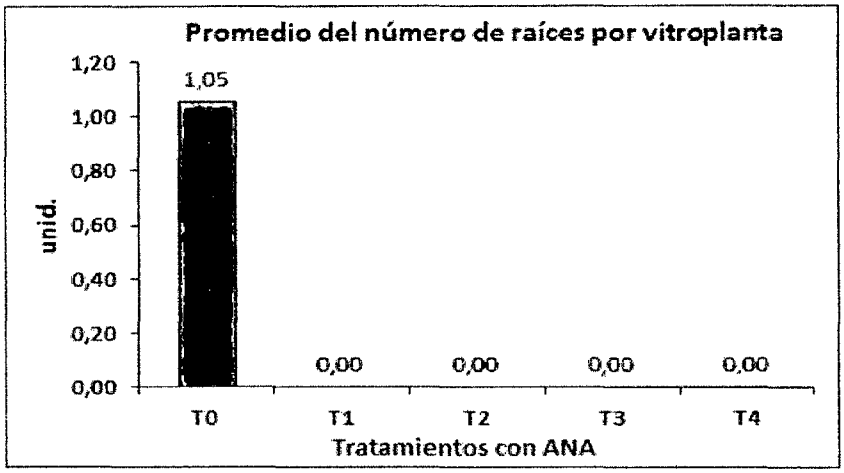


Figura 10: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

Cuadro 10: Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 60 días de aplicación de ANA

Tratamientos	Total de vitroplantas enraizadas	Vitroplantas enraizadas (%)
T0	7	35
T1	0	0
T2	0	0
T3	0	0
T4	0	0

En el cuadro 10, se observa que T0 (Testigo), con un porcentaje de 35 % presenta el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas en comparación con T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %; T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %; T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 % y T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de ANA), con un porcentaje de 0 %.

Los resultados del presente estudio muestran que en el tratamiento T0 (testigo) se observa presencia de raíces adventicias, esto se debe a la presencia de auxinas naturales propia de la especie (auxina endógena) y a la relación alta de estas frente a las citoquininas (Taiz y Zeiger, 2006), mientras que por otro lado no hubo respuesta al enraizamiento por parte de las vitroplantas tratadas con las concentraciones de 0,25 $mg.L^{-1}$; 0,50 $mg.L^{-1}$; 0,75 $mg.L^{-1}$ y 1,00 $mg.L^{-1}$ de ANA, esto es debido al desbalance hormonal en la vitroplanta que produjeron las concentraciones de ANA

inhibiendo el desarrollo de las raíces adventicias, lo cual no coincide con lo mencionado por Suarez et al. (2006), quienes indican que obtuvieron en un tiempo de 4 semanas el 100 % de vitroplantas enraizadas de *Tabebuia rosea* Bertol DC (Roble) por cada tratamiento con ANA, con excepción del control (con 52 % de vitroplantas enraizadas), resaltando el mejor de ellos el T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de ANA). Cabe resaltar que estos tratamientos fueron suplementados en medio de cultivo semisólido a 1/2 MS con agar, tiamina (sustancia vitamínica) en recipientes de vidrio de capacidad de 125 cc conteniendo aproximadamente 30 mL de medio de cultivo, a 25 °C.

4.1.3. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de ANA

Cuadro 11: Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	3,5066	0,8766	14,65 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	5,6850	0,0598	
TOTAL	99	9,1916		

En el Cuadro 11, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 8,37 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 12: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T2	3,16	A
T1	3,13	A
T0 (Testigo)	2,86	B
T3	2,79	B
T4	2,68	B

La prueba de Tukey, para la altura de vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre T2 (0,50 $mg.L^{-1}$

de ANA) y T1 (0,25 mg.L^{-1} de ANA), con promedios de 3,16 cm y 3,13 cm; así mismo, no existen diferencias estadísticas significativas entre T0 (Testigo); T3 (0,75 mg.L^{-1} de ANA) y T4 (1,00 mg.L^{-1} de ANA), con promedios de 2,86 cm; 2,79 cm y 2,68 cm.

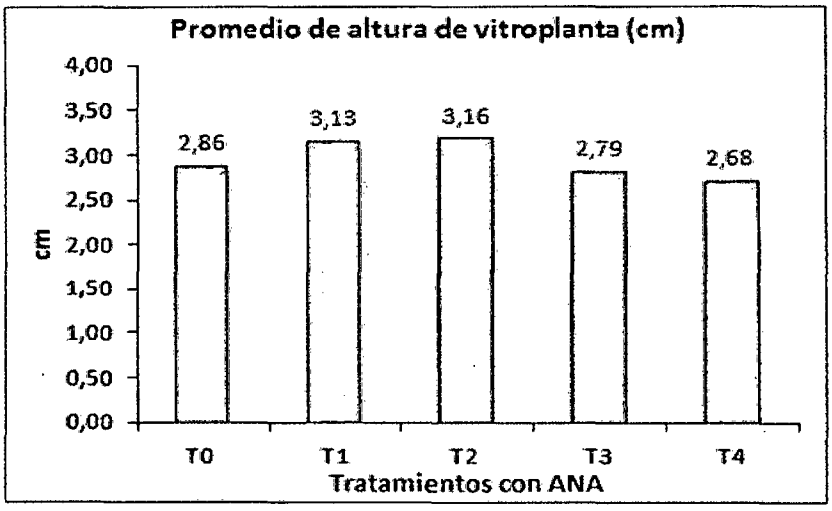


Figura 11: Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

4.1.4. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA

Cuadro 13: Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	13,2066	3,3017	44,68 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	7,0190	0,0739	
TOTAL	99	20,2256		

En el Cuadro 13, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 9,34 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 14: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T0 (Testigo)	3,34	A
T1	3,20	A B
T2	3,03	B
T3	2,64	C
T4	2,36	D

La prueba de Tukey, para la altura de vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T0 (Testigo) y T1 (0,25 mg.L^{-1} de ANA), con promedios de 3,34 cm y 3,20 cm; así mismo, no existen diferencias estadísticas significativas entre T1 (0,25 mg.L^{-1} de ANA) y T2 (0,50 mg.L^{-1} de ANA), con promedios de 3,20 cm y 3,03 cm. Además, se observa que T3 (0,75 mg.L^{-1} de ANA) y T4 (1,00 mg.L^{-1} de ANA), con promedios 2,64 cm y 2,36 cm son estadísticamente significativos entre sí y los demás tratamientos (T0; T1 y T2).

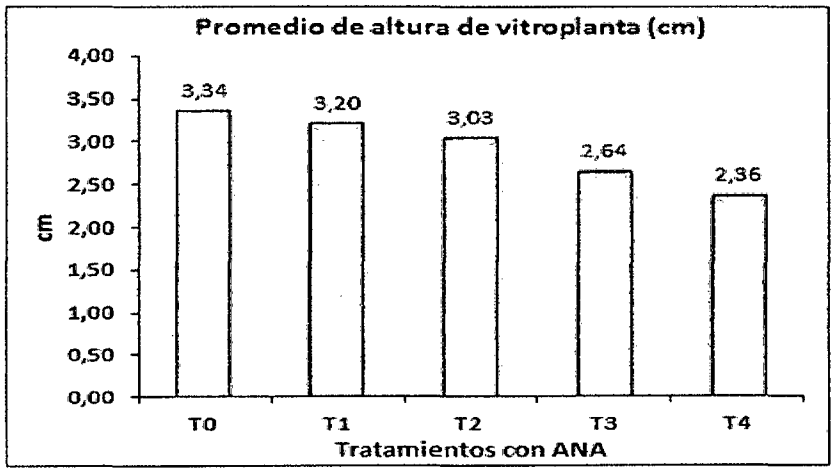


Figura 12: Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

Los resultados del presente estudio muestran un decaimiento en cuanto a la altura de la vitroplanta a medida que se incrementa la concentración de ANA, esto es debido a una acción indirecta por parte de la auxina, ya que esta es responsable de la dominancia apical, crecimiento y diferenciación de las células, y en el caso de tallos estimula el

crecimiento, más no es un retardador del crecimiento vegetal como el etileno debido a que este produce cambios en el crecimiento de la planta al reducir la tasa de elongación (Santos et al., 2010). El autor ha encontrado que la relación de concentración de Ácido Naftalenacético es inversamente proporcional a la altura de vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., esto se debe a que los callos formados en la base de las vitroplantas, conducen al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre el medio y las vitroplantas (Olmos et al., 2010), el cual es responsable de que el agua y nutrientes no sean asimilados por la vitroplanta y esta pueda desarrollarse adecuadamente.

4.1.5. Vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de ANA

Cuadro 15: Análisis de varianza de vitroplanta con callo a los 30 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	13,6400	3,4100	41,80 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	7,7500	0,0816	
TOTAL	99	21,3900		

En el Cuadro 15, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 41,40 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 16: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para vitroplanta con callo a los 30 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio	Significancia
T4	1,00	A
T3	1,00	A
T2	0,80	A B
T1	0,65	B
T0 (Testigo)	0,00	C

La prueba de Tukey, para vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T4 (1,00 mg.L^{-1} de ANA), con promedio de 1,00 vitroplanta con callo; T3 (0,75 mg.L^{-1} de ANA), con promedio de 1,00 vitroplanta con callo y T2 (0,50 mg.L^{-1} de ANA), con promedio de 0,80 vitroplanta con callo; así mismo no existe diferencias estadísticas significativas entre T2 (0,50 mg.L^{-1} de ANA), con promedio de 0,80 vitroplanta con callo y T1 (0,25 mg.L^{-1} de ANA), con promedio de 0,65 vitroplanta con callo. Por otro lado se observa que existe diferencias estadísticas significativas entre T0 (Testigo), con promedio de 0,00 vitroplanta con callo y el resto de los tratamientos.

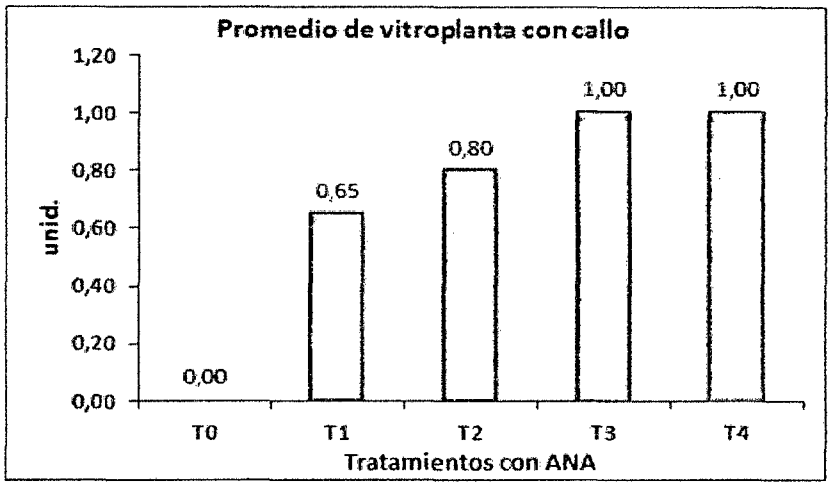


Figura 13: Promedio de vitroplanta con callo a diferentes dosis de ANA a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

4.1.6. Vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de ANA

Cuadro 17: Análisis de varianza de vitroplanta con callo a los 60 días de aplicación de ANA.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	15,6400	3,9100	391,00 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	0,9500	0,0100	
TOTAL	99	16,5900		

En el Cuadro 17, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 12,66 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 18: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para vitroplanta con callo a los 60 días de aplicación de ANA.

Tratamientos	Promedio	Significancia
T4	1,00	A
T3	1,00	A
T2	1,00	A
T1	0,95	A
T0 (Testigo)	0,00	B

La prueba de Tukey, para vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de ANA); T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de ANA); T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de ANA) y T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de ANA), los que presentan promedios de 1,00; 1,00; 1,00 y 0,95 vitroplanta con callo respectivamente. Por otro lado se observa que existe diferencias estadísticas significativas entre T0 (Testigo), con promedio de 0,00 vitroplanta con callo y el resto de los tratamientos.

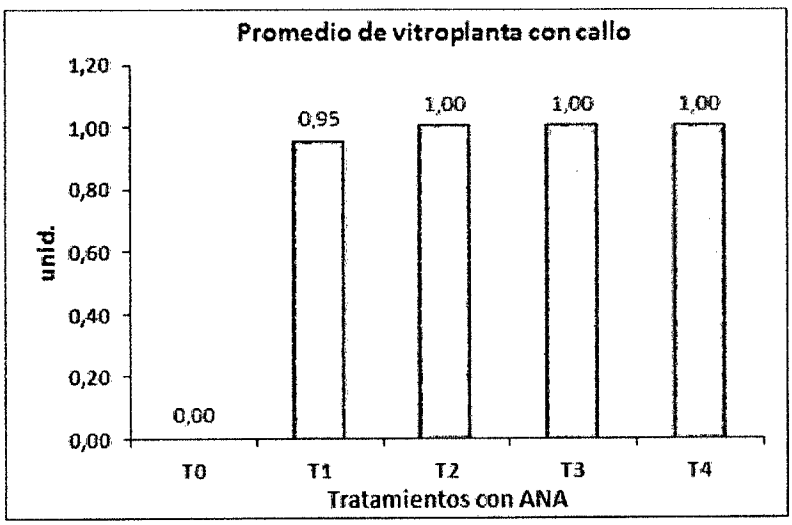


Figura 14: Promedio de vitroplanta con callo a diferentes dosis de ANA a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L ANA); T2 (0,50 mg/L ANA); T3 (0,75 mg/L ANA) y T4 (1,00 mg/L ANA).

Al evaluar los tratamientos T1 (0,25 mg.L^{-1} de ANA); T2 (0,50 mg.L^{-1} de ANA); T3 (0,75 mg.L^{-1} de ANA) y T4 (1,00 mg.L^{-1} de ANA), se observó presencia de callo en la base de las vitroplantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., esto es debido a la relación auxinas/citoquininas que se da en la vitroplanta a niveles intermedios mencionado por Taiz y Zeiger (2006), los cuales son responsables de la regulación de la morfogénesis.

Las concentraciones de auxina (en especial 0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L y 1,00 mg/L de ANA) que se utilizaron durante todo el enraizamiento estuvieron dentro de las concentraciones de 0,2-3 mg/L del cual hay reporte que a esas concentraciones algunos patrones de especies leñosas (vitroplantas para este caso) forman callos, especialmente con ANA en su lugar es recomendable aplicar tratamientos solo durante los primeros 4-8 días, pasándolos después a un medio sin reguladores de crecimiento para disminuir el riesgo de variación somaclonal (Marín, 1997, Olmos, 2010).

4.2. TRATAMIENTO HORMONAL CON ÁCIDO GIBERÉLICO - AG_3 EN LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

4.2.1. Número de raíces adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3

Cuadro 19: Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	0,5903	0,1476	2,71 N.S.
ERROR EXPERIMENTAL	95	5,1800	0,0545	
TOTAL	99	5,7703		

En el Cuadro 19, se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 20,48 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 20: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio
T4	0,55
T3	0,50
T2	0,45
T0 (Testigo)	0,30
T1	0,00

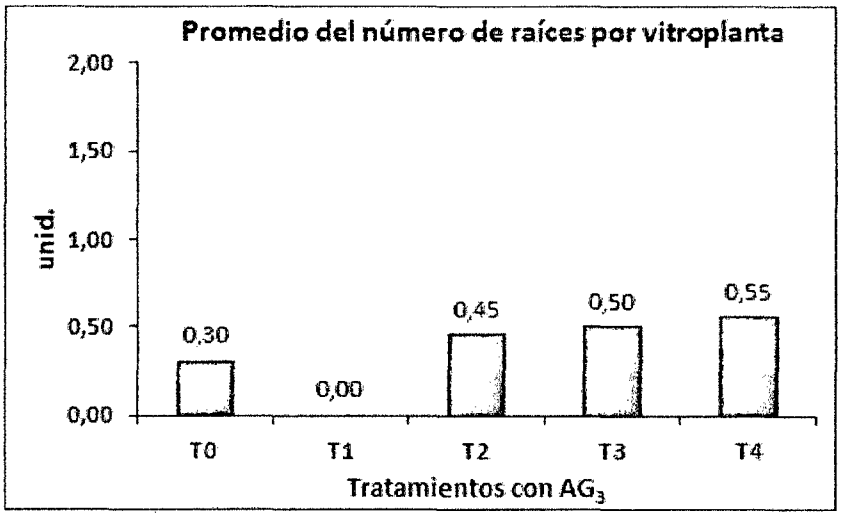


Figura 15: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

Cuadro 21: Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 30 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Total de vitroplantas enraizadas	Vitroplantas enraizadas (%)
T0	5	25
T1	0	0
T2	6	30
T3	9	45
T4	8	40

En el cuadro 21, se observa que el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas lo presenta T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 45 %; por otro lado el menor porcentaje de enraizamiento lo presenta T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 0 %.

4.2.2. Número de raíces adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de AG_3

Cuadro 22: Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	0,9567	0,2392	1,24 N.S.
ERROR EXPERIMENTAL	95	18,2831	0,1925	
TOTAL	99	19,2398		

En el Cuadro 22, se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 33,39 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 23: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio
T4	1,20
T3	1,05
T0 (Testigo)	1,05
T2	0,95
T1	0,35

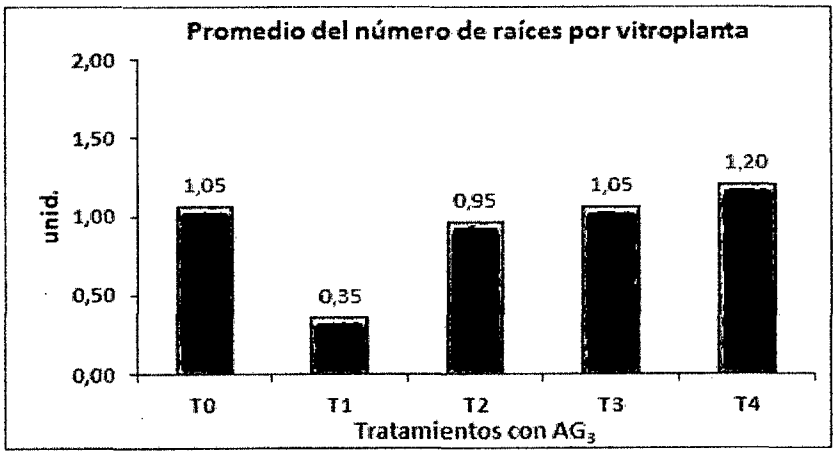


Figura 16: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

Cuadro 24: Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 60 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Total de vitroplantas enraizadas	Vitroplantas enraizadas (%)
T0	8	40
T1	4	20
T2	7	35
T3	11	55
T4	10	50

En el cuadro 24, se observa que el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas lo presenta T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 55 %; por otro lado el menor porcentaje de enraizamiento lo presenta T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 20 %.

4.2.3. Número de raíces adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días de aplicación de AG_3

Cuadro 25: Análisis de varianza del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	1,2768	0,3192	0,98 N.S.
ERROR EXPERIMENTAL	95	30,8420	0,3247	
TOTAL	99	32,1187		

En el Cuadro 25, se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 38,96 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 26: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio
T4	1,75
T3	1,70
T2	1,60
T0 (Testigo)	1,55
T1	0,70

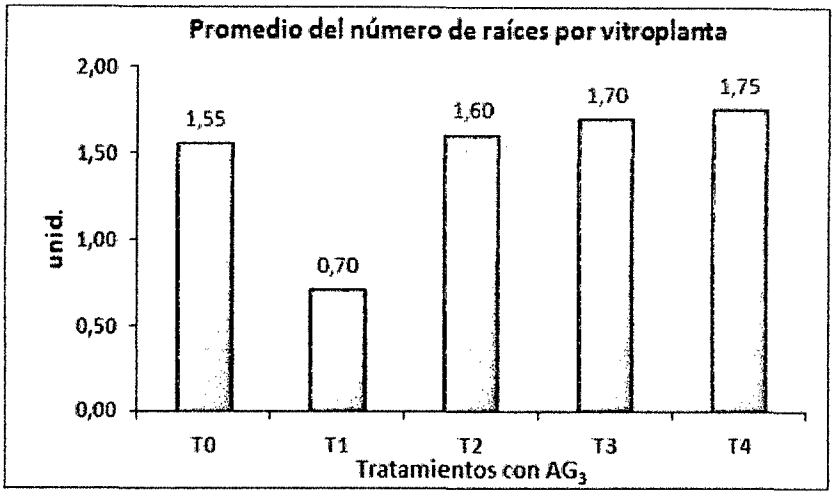


Figura 17: Promedio del número de raíces adventicias por vitroplanta con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

Cuadro 27: Porcentaje de vitroplantas enraizadas a los 90 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Total de vitroplantas enraizadas	Vitroplantas enraizadas (%)
T0	9	45
T1	7	35
T2	11	55
T3	12	60
T4	10	50

En el cuadro 27, se observa que el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas lo presenta T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 60 %; por otro lado el menor porcentaje de enraizamiento lo presenta T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un 35 %.

Los resultados del presente estudio muestran que a pesar que no se encontraron diferencias estadísticas significativas para el número de raíces adventicias entre los tratamientos, hay una respuesta por parte de la vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a enraizar con las diferentes concentraciones de AG_3: T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un porcentaje de enraizamiento del 35 %; 55 %; 60 % y 50 % respectivamente, esto puede explicar lo mencionado por Evans (1984) citado por Zolla y Calderón (1999), quien menciona que la aplicación de Ácido Giberélico produce un incremento

en los niveles de auxina; ya sea por un aumento en su biosíntesis o por un retardo en su destrucción, que afectaría también a la longitud de raíces adventicias, otro factor que estaría involucrado es la concentración de AG_3, debido que a concentraciones bajas de AG_3 se promueve la formación de raíces; por otro lado si la concentración es alta inhibiría la formación de raíces (Rico, 2013). Se observa también claramente que el número de raíces adventicias, y el porcentaje de vitroplantas enraizadas de T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3) es inferior al de T0 (Testigo); lo que nos indicaría una posible reducción de transporte de auxinas (Zolla y Calderón, 1999).

4.2.4. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3

Cuadro 28: Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	3	0,0011	0,0004	0,36 N.S.
ERROR EXPERIMENTAL	24	0,0256	0,0011	
TOTAL	27	0,0268		

En el Cuadro 28, se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 29,52 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 29: Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)
T0	0,12
T4	0,11
T3	0,11
T2	0,10
T1	0,00

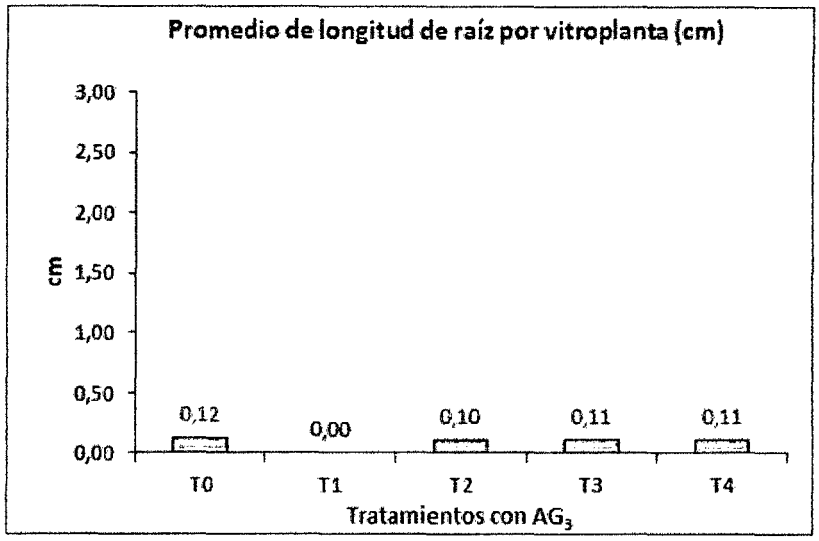


Figura 18: Promedio de longitud de raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

4.2.5. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicación de AG_3

Cuadro 30: Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia a los 60 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	2,7787	0,6947	8,95 *
ERROR EXPERIMENTAL	35	2,7173	0,0776	
TOTAL	39	5,4960		

En el Cuadro 30, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 24,02 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 31: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T4	1,50	A
T3	1,25	A B
T0 (Testigo)	1,10	B C
T2	0,90	B C
T1	0,65	C

La prueba de Tukey, para longitud de raíz de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 1,50 cm y 1,25 cm respectivamente, superando estadísticamente a T0 (Testigo); T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 1,10; 0,90 y 0,65 cm respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas significativas entre estos últimos tratamientos.

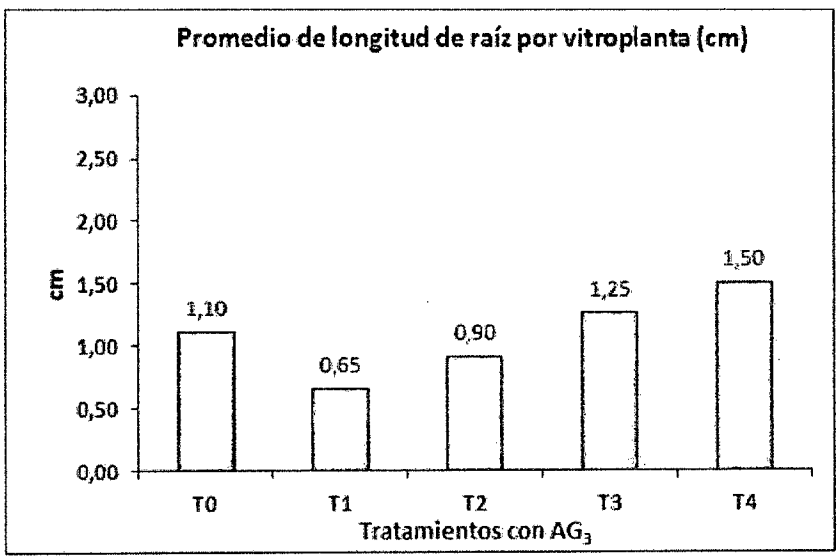


Figura 19: Promedio de longitud raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

4.2.6. Longitud de raíz adventicia de las vitroplantas enraizadas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días de aplicación de AG_3

Cuadro 32: Análisis de varianza de longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	15,3745	3,8436	16,52 *
ERROR EXPERIMENTAL	44	10,2365	0,2326	
TOTAL	48	25,6110		

En el Cuadro 32, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 22,28 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 33: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para longitud de raíz adventicia por vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T4	2,89	A
T3	2,39	A
T0 (Testigo)	2,34	A B
T2	1,77	B
T1	1,13	C

La prueba de Tukey, para longitud de raíz de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., indica que no existe diferencias estadísticas significativas de T0 (Testigo), con promedio de 2,34 cm con respecto a T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 2,89; 2,39 y 1,77 cm. Por otro lado, se observa que existe diferencias estadísticas significativas entre T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con el menor promedio de 1,13 cm, y los demás tratamientos.

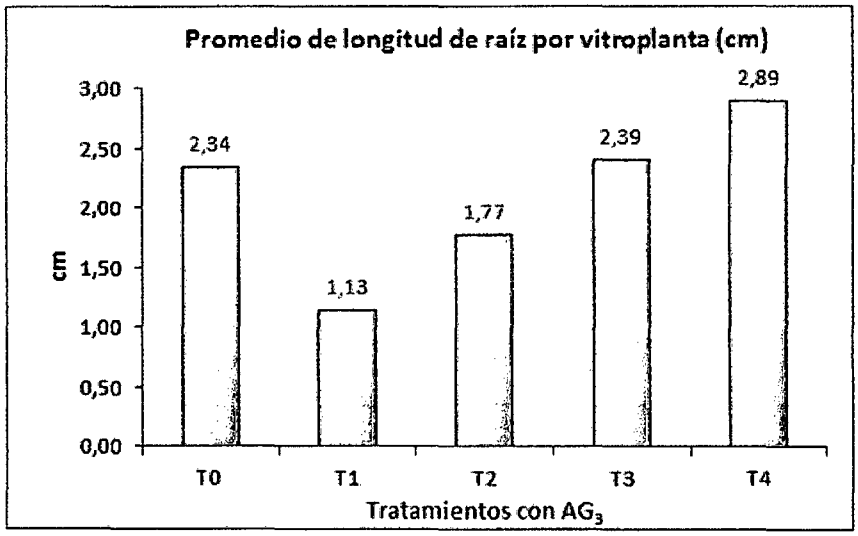


Figura 20: Promedio de longitud raíz adventicia por vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

Los resultados del presente estudio muestran que a pesar que el tratamiento T4 (1,00 mg/L AG_3) muestra la mayor longitud de raíz adventicia frente a los demás tratamientos, debido a un incremento en los niveles de auxina por la acción indirecta de la giberelina, de acuerdo a Evans (1984) citado por Zolla y Calderón (1999), este no resultó significativo con respecto al T0 (Testigo), debido a que las giberelinas tienen un escaso efecto directo sobre la raíz. Esto se debe a que la acción del ácido giberélico sobre la elongación radicular es dependiente de otros factores tales como: luz, contenido de auxinas, el envase a sembrar la vitroplanta, etc. (Taiz y Zeiger, 2006).

4.2.7. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicación de AG_3

Cuadro 34: Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	10,5230	2,6308	31,86 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	7,8445	0,0826	
TOTAL	99	18,3675		

En el Cuadro 34, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 8,20 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 35: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de Vitroplanta a los 30 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T4	3,85	A
T3	3,67	A B
T1	3,57	B
T2	3,56	B
T0 (Testigo)	2,89	C

Con la prueba de Tukey, para la altura de vitroplanta, el lector puede constatar que los tratamientos, T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un promedio de 3,85 cm y T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con un promedio de 3,67 cm, no presentaron diferencias estadísticas significativas. Por otro lado se observa que no existe diferencia estadística significativa entre el T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 3,67; 3,57 y 3,56 cm. Además, se observa que el T0 (Testigo), con promedio 2,89 cm presentó diferencias estadísticas significativas con los demás tratamientos.

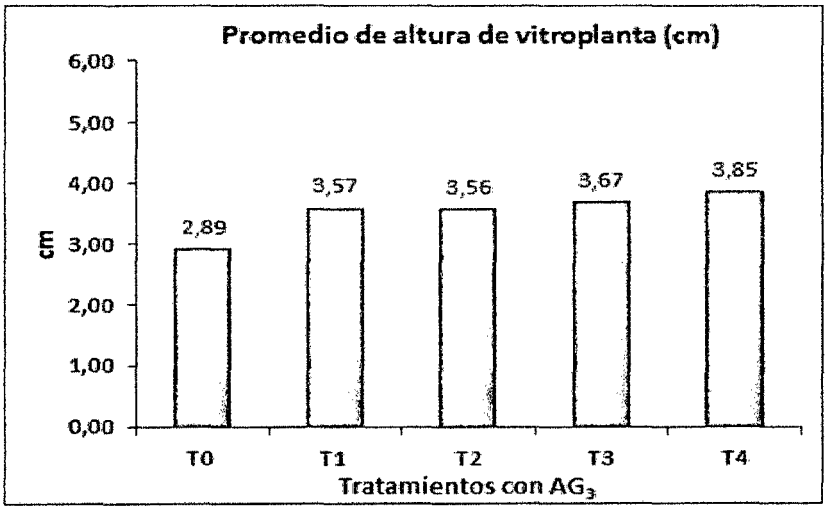


Figura 21: Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de Ácido Giberélico (AG_3) a los 30 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

4.2.8. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días aplicación de AG_3

Cuadro 36: Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 60 días aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	40,0550	10,0138	60,70 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	15,6725	0,1650	
TOTAL	99	55,7275		

En el Cuadro 36, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 9,02 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 37: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de vitroplanta a los 60 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T4	5,11	A
T2	4,90	A
T3	4,84	A
T1	4,34	B
T0 (Testigo)	3,35	C

La prueba de Tukey, para la altura de vitroplanta, indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 5,11; 4,90 y 4,84 cm. Por otro lado, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre el T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedio de 4,34 cm y T0 (Testigo), con promedio de 3,35 cm, y a su vez existen diferencias estadísticas significativas de estos últimos con los demás tratamientos.

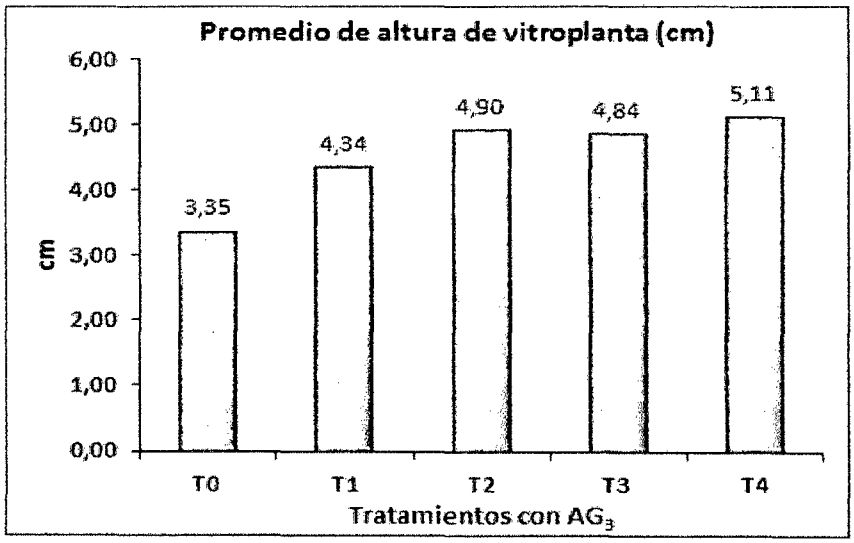


Figura 22: Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 60 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

4.2.9. Altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 90 días aplicación de AG_3

Cuadro 38: Análisis de varianza de altura de vitroplanta a los 90 días aplicación de AG_3.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F
TRATAMIENTOS	4	70,4056	17,6014	58,90 *
ERROR EXPERIMENTAL	95	28,3875	0,2988	
TOTAL	99	98,7931		

En el Cuadro 38, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad es de 11,01 %, lo que indica que la estimación es precisa.

Cuadro 39: Prueba de Comparación de Medias de Tukey, para la altura de Vitroplanta a los 90 días de aplicación de AG_3.

Tratamientos	Promedio (cm)	Significancia
T4	5,73	A
T2	5,57	A
T3	5,46	A
T1	4,57	B
T0 (Testigo)	3,49	C

La prueba de Tukey, para la altura de vitroplanta, indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre T4 (1,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3); T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3) y T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedios de 5,73; 5,57 y 5,46 cm. Por otro lado, se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre el T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3), con promedio de 4,57 cm y T0 (Testigo), con promedio de 3,49 cm, y a su vez existen diferencias estadísticas significativas de estos últimos con los demás tratamientos.

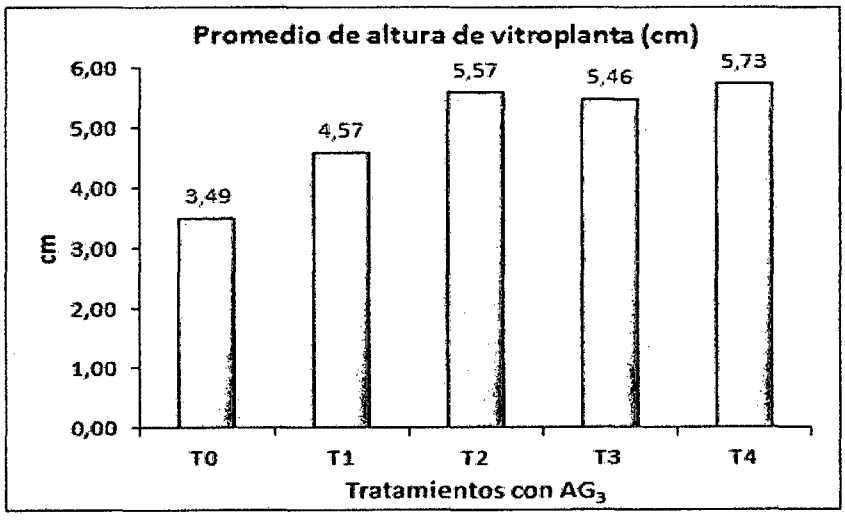


Figura 23: Promedio de altura de vitroplanta (cm) con diferentes dosis de AG_3 a los 90 días después de la siembra: T0 (Testigo); T1 (0,25 mg/L AG_3); T2 (0,50 mg/L AG_3); T3 (0,75 mg/L AG_3) y T4 (1,00 mg/L AG_3).

Los resultados del presente estudio muestran en cuanto a la altura de vitroplanta (Cuadro 35; 37 y 39), diferencias estadísticas significativas entre T0 (Testigo) y los demás tratamientos que contienen AG_3, asemejándose con lo mencionado por

Calderón (1994), el cual no encontró diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de AG_3 ensayadas, pero sí de estas con el control (Testigo en este caso). Esto es debido al efecto del AG_3 que produce a la vitroplanta, induciendo la elongación al actuar sobre el meristemo intercalar, que se encuentra cerca de la base del entrenudo (Pierik, 1990, Taiz y Zeiger, 2006, Santos et al., 2010).

4.3. ACLIMATACIÓN DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. EN CONDICIONES DE INVERNADERO

En esta etapa se realizó una prueba previa para evaluar el mejor sustrato para el prendimiento de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., para optimizar la transferencia del ambiente *in vitro* a condiciones de invernadero, los resultados mismos que se muestran en el Cuadro 40.

4.3.1. Prueba previa para el prendimiento de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato en condiciones de invernadero evaluado al mes

Cuadro 40: Prendimiento porcentual de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por sustrato evaluado al mes.

Sustratos	A Musgo + Tierra (1:1)	B Musgo + Arena (1:1)	C Turba + Arena (1:1)	D Arena	E Turba + Tierra (1:1)
Prendimiento Porcentual (%)	0	0	100	50	50

El cuadro 40, muestra que el mejor sustrato para el prendimiento de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., de los cinco sustratos es turba + arena en proporciones 1:1, con un porcentaje de 100 % de prendimiento, lo cual coincide con Infoagro (2014), Alvarado (2002), quienes mencionan lo bastante frecuente la mezcla de turba con arena como sustrato de enraizamiento; ya que la arena (con granulometría de 0,5 y 2 mm de diámetro) produce una suficiente retención de agua con una buena aireación a igual que la turba que provee buena capacidad de retención de humedad y una buena aireación (si es gruesa). Además la turba es un tipo de sustrato biológicamente estéril (Serrada, 2000), esto es favorable ya que reduce los daños ocasionados por hongos, y

con un pH ácido (Alvarado, 2002), el cual es requerido por *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

4.3.2. Aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con turba y arena en proporciones 1:1 en condiciones de invernadero

Una vez establecido el sustrato óptimo (arena + turba en proporciones 1:1) se procedió con las respectivas evaluaciones mensuales en condiciones de invernadero durante dos meses, los resultados se muestran en el Cuadro 41.

Cuadro 41: Porcentaje de supervivencia de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. en condiciones de invernadero.

Días	Porcentaje de supervivencia (%)	
	Sobrevivieron	No sobrevivieron
30	86	14
60	46	54

En la aclimatación se observó a los dos meses de ser transferidas las vitroplantas de *in vitro* a *ex vitro* (bajo condiciones de invernadero) un descenso alto de supervivencia por parte de las vitroplantas, esto es debido a la deshidratación que sufrieron las vitroplantas muertas, ocasionado por el retraso en el desarrollo de la cutícula, debido a la alta humedad relativa, 90-100 %, que se da *in vitro*; las hojas son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas (Pierik, 1990); la escasa funcionalidad del aparato estomático que presentan las hojas de la mayoría de las especies cultivadas *in vitro* (Olmos, 2010); estrés por daños de raíces al momento del trasplante, etc.

Por otro lado al comprobar con otras experiencias realizadas en especies leñosa como *Eucalyptus grandis*; *Eucalyptus urophylladon* y *Tabebuia rosea* Bertol DC (Roble), se observó en la etapa de aclimatación a la octava semana (dos meses) un 75 %; 85 % y 12 % respectivamente de supervivencia mostrando una apariencia normal en términos morfológicos (Ruíz, et al. 2005, Suarez, et al. 2006). Lo cual indica que la supervivencia de las plantas *in vitro*, regeneradas durante el período de aclimatación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

- Los tratamientos T1 (0,25 mg/L de ANA); T2 (0,50 mg/L de ANA); T3 (0,75 mg/L de ANA) y T4 (1,00 mg/L de ANA) manifestaron la mayor presencia de callo en la base de las vitroplantas, los cuales afectaron el desarrollo de la raíz adventicia de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br.

- La longitud de raíz fue mayor con el tratamiento T4 (1,00 mg/L AG_3), con un promedio de 2,89 cm de longitud de raíz adventicia en *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br.

- Asimismo, en altura por vitroplanta se obtuvo el mejor resultado con el tratamiento T4 (1,00 mg/L AG_3), con un promedio de 5,73 cm de altura; mientras que el tratamiento T0 (0,00 mg/L AG_3), presentó el promedio más bajo con 3,49 cm de altura en *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br.

- La concentración de 0,75 mg/L de Ácido Giberélico (AG_3), presentó el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas con un porcentaje del 60 % de vitroplantas enraizadas.

- El mejor sustrato para la aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en condiciones de invernadero fue turba + arena en proporciones 1:1.

- Las vitroplantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. sembradas en turba + arena (1:1) en condiciones de invernadero, mostraron a los 2 meses un 46 % de supervivencia.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas para el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. exponiéndolos con las hormonas a diferentes tiempos.

- Realizar más pruebas para el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en envases de mayor tamaño (Magentas, frascos de papilla, etc.).

- Implementar invernaderos automatizados para trabajar con plantas provenientes de *in vitro* para su aclimatación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, M. (2002). Producción de sustratos para viveros. Costa Rica: VIFINEX. 46 pp.

Brown, R. (1811). On the Proteaceae of Jussieu. Transactions of the Linnean Society of London.

Bunn, E. y Dixon, K. (1992). La propagación *in vitro* de la *Grevillea scapigera* rara y en peligro de extinción (Proteaceae). HortScience, 27 (3), pp. 261-262.

Calderón, X. (1994). Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. Bosque, 15 (1), pp. 33-38.

Campbell, N. y Reece, J. (2007). Biología. Séptima Edición. 1231 pp. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 580-583.

Castillo, A. (2007). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay.

Cruzat, R. y Barrios, E. (2010). Resultados y Lecciones en Propagación *in vitro* de Especies Ornamentales. Proyecto de Innovación en las regiones de Valparaíso, de Magallanes y Metropolitana. Ed. Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Ministerio de Agricultura. Chile. 56 pp.

Condori, D., Piñatelli, M., Elías, R. y Rojas, R. (2012). Análisis proximal, características fisicoquímicas y actividad antimicrobiana del musgo blanco (*Sphagnum maguellanicum* Brid.) proveniente de Junín, Perú. Revista de la Sociedad Química del Perú, 78(1), pp. 37-42.

Cortina, J., Peñuelas, J., Puertolas, J., Savé, R. y Villagrosa, A. (2006). Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Madrid, España. Estado actual de conocimientos. Editores. Serie Forestal. Ministerio de Medio Ambiente. ISBN-13, pp. 978-84.

DICYT (2007). Una Investigadora de la Universidad de Salamanca Desarrolla Cultivos de Plantas Medicinales *In vitro* (en línea). Salamanca. España
Consultado: 14 de Setiembre del 2014.
Disponible en:
http://www.dicyt.com/noticias/una-investigadora-de-la-universidad-de-salamanca-desarrolla-cultivos-de-plantas-medicinales-in-vitro

Efloras (2008). Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador.
Consultado: 05 de Abril del 2014.
Disponible en:
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=123101

Hartman, H. y Kester, D. (1997). Propagación de plantas. Editorial Continental. México. 760 pp.

Hermann, S. (1954). Proteaceae americanae. Bot. Jahrb. Syst. 76 (2): 139-211.
Consultado: 03 de Abril del 2014.
Disponible en:
http://www.tropicos.org/Name/26500121?projectid=5

Hermoso, J., Otaño, A., Pando, V. y Sierra, R. (2013). Estudio de la influencia de IBA (ácido indolbutírico) en la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Populus tremula* L. Congresos Forestales, España.

Inforegión (2010). Importancia del Biocomercio en el Perú.
Consultado: 03 de Abril del 2014.
Disponible en:
http://www.inforegion.pe/portada/79137/importancia-del-biocomercio-en-el-peru/

Infoagro (2014). Tipos de sustratos de cultivo.
Consultado: 01 de Noviembre del 2014.
Disponible en:
http://www.infoagro.com/industria_auxiliar/tipo_sustratos2.htm

Jaramillo, D. (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo.
Consultado: 02 de Noviembre del 2014.
Disponible en:
http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf

Marín, J. (1997). La micropropagación y la mejora de especies frutales. Zaragoza, España: Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales. 35 pp.

Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2010). Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. eds. Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Ciara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski, pp. 17-23. Buenos Aires: Ediciones INTA.

Olivera, P. (2011). Validación de una Metodología Especifica para la Propagación *In vitro* de *Perezia coerulescens*, Especie Medicinal Altoandina, Huaraz, Perú Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 86 pp.

Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2010). Micropropagación. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal II. eds. Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Ciara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski, pp. 353-362. Buenos Aires: Ediciones INTA.

Oxford-Complutense (1998). Diccionario de Biología. Madrid: Complutense.

Pierik, R. (1990). Cultivo *In vitro* de Plantas Superiores. Trad. L. Eyerbe. Tercera Edición. Madrid, España: Mundi – Prensa. 325 pp.

Pretell, J., Ocaña, D., Jon, R. y Barahona, E. (1985). Apuntes Sobre Algunas Especies Forestales de la Sierra Peruana. Lima: FAO. 117 pp.

Pristley, J. (2006). El transporte en las plantas. En: Invitación a la Biología, eds. Helena Curtis, N. Sue Barnes, Adriana Schnek y Graciela Flores. Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 586-614.

Reynel, C. y Marcelo, J. (2009). Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos. Manual de Identificación de especies. Serie Investigación y Sistematización N° 09. Primera edición. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERACIÓN. Lima. pp. 123-127.

Rico, F. (2013). Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de *Acacia angustíssima* vía organogénesis indirecta. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 63 pp.

Ríos, L. y Acevedo, G. (2007). Ecología, Utilización e Impactos Producidos por el Aprovechamiento del Cucharillo *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. En las Parroquias de Taquil, Chantaco, Chuquiribamba y Gualel de la Provincias de Loja. Tesis para optar el Título de Ingeniero Manejo y Conservación del Medio Ambiente. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. 158 pp.

Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. 953 pp.

Rojas, S., García, J. y Alarcón, M. (2004). Propagación asexual de plantas: Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. CORPOICA. Colombia. 55 pp.

Rosales, M. (2014). Propagación *In vitro* de la Planta Medicinal Alto Andina *Valeriana sp.* "Siete Sabios" Hasta la Fase de Brotación. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Huaraz, Perú. 70 pp.

Ruiz, R., Rivero, H., De La, J. L. R. y Cetina, V. (2005). Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Ra ximhai, 1(3), pp. 591-597.

Saavedra, J. (1995). Plantas Medicinales de la Sierra Central de Piura: Chalco, Pacaypampa y Santo Domingo. Espacio y Desarrollo, (7), pp. 43-92.

Santos, F., Guitarte, J. y Carro, M. (2010). Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal. Pearson Educación. Madrid, España, pp. 57-77.

Serrada, R. (2000). Apuntes de Repoblaciones Forestales. FUCOVASA. Madrid. Consultado: 01 de Noviembre del 2014. Disponible en: http://www.secforestales.org/web/images/serrada/z11texto.pdf

Solé, A. (2012). Caracterización de genes GRAS en" *Pinus radiata*" D. Don y su expresión durante el enraizamiento adventicio. Tesis Doctoral en Biomedicina. Universidad de Alcalá. Alcalá de Hernández, España. 127 pp.

Suarez, I., Jamanca, A. y Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios, 11(2).

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Valencia, España: Universitat Jaume I, 2(1), pp. 1129-1130.

Tamariz, C. (1999). Estudio de algunas plantas medicinales del Parque Nacional Huascarán, Ancash: Pruebas Biológicas y Fotoquímicas. Tesis para optar el Título de Bióloga. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. 79 pp.

Tamariz, C., Olivera, P. y Castillo, P. (2011). Características de suelo y usos tradicionales de especies vegetales en la Provincia de Huaraz, Ancash, Perú: ECIPerú, 8(1), pp. 45-46.

Vidalie, H. (1986). Cultivo *in vitro*. Editorial Científica, México.

Watt, M. y John R. (1999). Proteoid roots. Physiology and development. Pant Physiology 121: pp. 317-323.

Yldefonzo, M. (2013). Influencia de la Bencilaminopurina (BAP) en la Multiplicación *In vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. (Chacpá).Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Huaraz, Perú. 45 pp.

Zolla, G. y Calderón, A. (1999). El efecto del ácido giberélico en el proceso de rizogénesis de *Cattleya triumphans* Ch. Maron. ANALES CIENTIFICOS-Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. (40), pp. 123-127.

VIII. ANEXOS

Cuadro 42: Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
2	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
3	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
4	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
5	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
6	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
7	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
8	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
9	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
10	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
11	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
12	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
13	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
14	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
15	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
16	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
17	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
18	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
19	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
20	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)

- Los números dentro del paréntesis son los datos transformados.

Cuadro 43: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{j.} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0257	0,0953	0,16	*
T_0T_2	20 y 20	0,0257	0,0953	0,16	*
T_0T_3	20 y 20	0,0257	0,0953	0,16	*
T_0T_4	20 y 20	0,0257	0,0953	0,16	*
T_1T_2	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.
T_1T_4	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.
T_2T_3	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,0257	0,0953	0,00	n.s.

Cuadro 44: Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
2	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
3	3 (2,00)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
4	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
5	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
6	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
7	4 (2,24)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
8	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
9	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
10	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
11	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
12	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
13	5 (2,45)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
14	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
15	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
16	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
17	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
18	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
19	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
20	3 (2,00)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)

- Los números dentro del paréntesis son los datos transformados.

Cuadro 45: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{j.} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0506	0,1879	1,34	*
T_0T_2	20 y 20	0,0506	0,1879	1,34	*
T_0T_3	20 y 20	0,0506	0,1879	1,34	*
T_0T_4	20 y 20	0,0506	0,1879	1,34	*
T_1T_2	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.
T_1T_4	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.
T_2T_3	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,0506	0,1879	0,00	n.s.

Cuadro 46: Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	2,8	3,4	3,6	2,7	2,7
2	2,5	3,4	3,4	3,1	2,5
3	2,8	3,5	3,0	2,6	2,7
4	3,0	3,3	2,8	2,7	2,5
5	2,8	3,6	3,1	2,5	2,6
6	2,9	3,5	3,0	2,8	2,5
7	2,9	2,9	3,3	3,0	2,3
8	2,7	3,0	3,5	2,9	3,0
9	2,9	2,9	3,2	3,2	2,4
10	2,9	3,0	3,3	2,9	2,8
11	2,7	3,7	2,9	2,8	2,7
12	2,9	3,1	3,0	2,7	2,5
13	2,8	3,2	2,8	2,8	3,1
14	2,9	3,0	3,0	2,8	2,5
15	2,7	2,7	3,3	3,0	3,3
16	2,6	2,5	3,2	2,7	2,8
17	3,0	2,9	3,4	2,3	2,5
18	3,0	3,2	3,4	2,7	2,6
19	3,2	2,7	2,9	2,6	2,7
20	3,2	3,0	3,0	3,0	2,9

Cuadro 47: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0547	0,2029	0,27	*
T_0T_2	20 y 20	0,0547	0,2029	0,30	*
T_0T_3	20 y 20	0,0547	0,2029	0,07	n.s.
T_0T_4	20 y 20	0,0547	0,2029	0,18	n.s.
T_1T_2	20 y 20	0,0547	0,2029	0,03	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0547	0,2029	0,34	*
T_1T_4	20 y 20	0,0547	0,2029	0,45	*
T_2T_3	20 y 20	0,0547	0,2029	0,37	*
T_2T_4	20 y 20	0,0547	0,2029	0,48	*
T_3T_4	20 y 20	0,0547	0,2029	0,11	n.s.

Cuadro 48: Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	3,3	3,7	3,4	2,5	2,4
2	3,3	3,4	3,3	3,0	2,0
3	3,2	3,2	3,0	2,5	2,2
4	3,5	3,4	2,5	2,4	2,4
5	3,3	3,7	2,8	2,5	2,0
6	3,4	3,6	3,2	2,8	2,0
7	3,1	2,7	2,9	2,6	2,3
8	3,4	2,8	3,4	2,9	2,7
9	3,6	3,2	3,1	3,0	2,3
10	3,3	3,0	3,3	2,7	2,4
11	2,8	3,6	3,4	2,6	2,3
12	3,5	3,0	2,9	2,3	2,2
13	3,2	3,0	2,9	2,4	2,9
14	3,5	2,9	3,1	2,5	2,5
15	3,1	2,6	3,0	2,9	2,7
16	3,0	2,8	3,0	2,7	2,6
17	3,3	3,2	2,7	2,4	2,2
18	3,7	3,9	3,0	2,5	2,3
19	3,7	3,1	2,8	2,5	2,1
20	3,6	3,2	2,8	3,0	2,7

Cuadro 49: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{j.} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0608	0,2255	0,14	n.s.
T_0T_2	20 y 20	0,0608	0,2255	0,31	*
T_0T_3	20 y 20	0,0608	0,2255	0,70	*
T_0T_4	20 y 20	0,0608	0,2255	0,98	*
T_1T_2	20 y 20	0,0608	0,2255	0,17	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0608	0,2255	0,56	*
T_1T_4	20 y 20	0,0608	0,2255	0,84	*
T_2T_3	20 y 20	0,0608	0,2255	0,39	*
T_2T_4	20 y 20	0,0608	0,2255	0,67	*
T_3T_4	20 y 20	0,0608	0,2255	0,28	*

Cuadro 50: Datos tomados de vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 30 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0	0	1	1	1
2	0	1	1	1	1
3	0	1	1	1	1
4	0	0	0	1	1
5	0	1	1	1	1
6	0	1	0	1	1
7	0	1	1	1	1
8	0	1	1	1	1
9	0	1	1	1	1
10	0	0	1	1	1
11	0	1	1	1	1
12	0	0	0	1	1
13	0	0	1	1	1
14	0	0	1	1	1
15	0	0	1	1	1
16	0	1	0	1	1
17	0	1	1	1	1
18	0	1	1	1	1
19	0	1	1	1	1
20	0	1	1	1	1

Cuadro 51: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0639	0,2370	0,65	*
T_0T_2	20 y 20	0,0639	0,2370	0,80	*
T_0T_3	20 y 20	0,0639	0,2370	1,00	*
T_0T_4	20 y 20	0,0639	0,2370	1,00	*
T_1T_2	20 y 20	0,0639	0,2370	0,15	n.s
T_1T_3	20 y 20	0,0639	0,2370	0,35	*
T_1T_4	20 y 20	0,0639	0,2370	0,35	*
T_2T_3	20 y 20	0,0639	0,2370	0,20	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0639	0,2370	0,20	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,0639	0,2370	0,00	n.s.

Cuadro 52: Datos tomados de vitroplanta con callo de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días de aplicados los tratamientos de ANA.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0	1	1	1	1
2	0	1	1	1	1
3	0	1	1	1	1
4	0	1	1	1	1
5	0	1	1	1	1
6	0	0	1	1	1
7	0	1	1	1	1
8	0	1	1	1	1
9	0	1	1	1	1
10	0	1	1	1	1
11	0	1	1	1	1
12	0	1	1	1	1
13	0	1	1	1	1
14	0	1	1	1	1
15	0	1	1	1	1
16	0	1	1	1	1
17	0	1	1	1	1
18	0	1	1	1	1
19	0	1	1	1	1
20	0	1	1	1	1

Cuadro 53: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0224	0,0830	0,95	*
T_0T_2	20 y 20	0,0224	0,0830	1,00	*
T_0T_3	20 y 20	0,0224	0,0830	1,00	*
T_0T_4	20 y 20	0,0224	0,0830	1,00	*
T_1T_2	20 y 20	0,0224	0,0830	0,05	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0224	0,0830	0,05	n.s.
T_1T_4	20 y 20	0,0224	0,0830	0,05	n.s.
T_2T_3	20 y 20	0,0224	0,0830	0,00	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0224	0,0830	0,00	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,0224	0,0830	0,00	n.s.

Cuadro 54: Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	0 (1)
2	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)
3	1 (1,41)	0 (1)	1 (1,41)	1 (1,41)	0 (1)
4	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
5	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)
6	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	1 (1,41)
7	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	3 (2,00)
8	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)
9	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
10	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
11	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
12	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	0 (1)
13	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
14	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	1 (1,41)	0 (1)
15	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	0 (1)	1 (1,41)
16	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
17	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	1 (1,41)	1 (1,41)
18	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	1 (1,41)
19	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	1 (1,41)	1 (1,41)
20	0 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	0 (1)

- Los números dentro del paréntesis son los datos transformados.

Cuadro 55: Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	1 (1,41)
2	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	3 (2,00)
3	3 (2,00)	0 (1)	2 (1,73)	3 (2,00)	0 (1)
4	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
5	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)
6	4 (2,24)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	2 (1,73)
7	0 (1)	1 (1,41)	0 (1)	2 (1,73)	5 (2,45)
8	0 (1)	0 (1)	3 (2,00)	0 (1)	0 (1)
9	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
10	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)
11	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
12	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	0 (1)
13	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	4 (2,24)
14	4 (2,24)	3 (2,00)	6 (2,65)	2 (1,73)	0 (1)
15	0 (1)	2 (1,73)	3 (2,00)	0 (1)	1 (1,41)
16	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
17	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	1 (1,41)	1 (1,41)
18	4 (2,24)	1 (1,41)	0 (1)	2 (1,73)	4 (2,24)
19	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	3 (2,00)	1 (1,41)
20	0 (1)	0 (1)	0 (1)	3 (2,00)	0 (1)

- Los números dentro del paréntesis son los datos transformados.

Cuadro 56: Datos reales y transformados para el número de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	3 (2,00)	2 (1,73)
2	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	5 (2,45)
3	4 (2,24)	0 (1)	3 (2,00)	5 (2,45)	0 (1)
4	2 (1,73)	0 (1)	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)
5	3 (2,00)	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	3 (2,00)
6	7 (2,83)	0 (1)	0 (1)	1 (1,41)	4 (2,24)
7	0 (1)	2 (1,73)	0 (1)	5 (2,45)	6 (2,65)
8	0 (1)	0 (1)	6 (2,65)	0 (1)	0 (1)
9	0 (1)	0 (1)	1(1,41)	0 (1)	0 (1)
10	0 (1)	0 (1)	4(2,24)	0 (1)	0 (1)
11	2 (1,73)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
12	1 (1,41)	1 (1,41)	1 (1,41)	1 (1,41)	0 (1)
13	0 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	4 (2,24)
14	4 (2,24)	4 (2,24)	7 (2,83)	2 (1,73)	0 (1)
15	0 (1)	4 (2,24)	4 (2,24)	0 (1)	1 (1,41)
16	2 (1,73)	1 (1,41)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
17	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	2 (1,73)	4 (2,24)
18	6 (2,65)	1 (1,41)	0 (1)	6 (2,65)	5 (2,45)
19	0 (1)	0 (1)	2 (1,73)	3 (2,00)	1 (1,41)
20	0 (1)	0 (1)	0 (1)	3 (2,00)	0 (1)

- Los números dentro del paréntesis son los datos transformados.

Cuadro 57: Datos tomados de longitud de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
3	0,10	0,00	0,10	0,10	0,00
4	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,10	0,00	0,00	0,00	0,10
6	0,10	0,00	0,00	0,10	0,10
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
8	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
15	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
18	0,20	0,00	0,00	0,10	0,10
19	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
20	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00

Cuadro 58: Datos tomados de longitud de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0,00	0,00	0,00	1,40	0,90
2	0,00	0,00	0,00	0,80	1,50
3	1,30	0,00	1,00	1,30	0,00
4	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,20	0,00	0,00	0,00	1,60
6	1,30	0,00	0,00	1,30	1,80
7	0,00	0,70	0,00	0,70	1,70
8	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00
11	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70
14	0,80	0,70	0,80	1,40	0,00
15	0,00	0,50	0,90	0,00	1,80
16	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	1,30	1,30	1,80
18	1,30	0,70	0,00	1,30	1,60
19	0,00	0,00	0,90	1,20	1,60
20	0,00	0,00	0,00	1,40	0,00

Cuadro 59: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	8 y 4	0,1206	0,4607	0,45	n.s.
T_0T_2	8 y 7	0,1019	0,3893	0,20	n.s.
T_0T_3	8 y 11	0,0915	0,3495	0,15	n.s.
T_0T_4	8 y 10	0,0934	0,3568	0,40	*
T_1T_2	4 y 7	0,1235	0,4718	0,25	n.s.
T_1T_3	4 y 11	0,1150	0,4393	0,60	*
T_1T_4	4 y 10	0,1165	0,4450	0,85	*
T_2T_3	7 y 11	0,0952	0,3637	0,35	n.s.
T_2T_4	7 y 10	0,0971	0,3709	0,60	*
T_3T_4	11 y 10	0,0861	0,3289	0,25	n.s

Cuadro 60: Datos tomados de longitud de raíces adventicias de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	0,00	0,00	0,90	2,70	2,10
2	0,00	0,00	0,00	2,10	2,90
3	2,60	0,00	2,30	2,90	0,00
4	2,60	0,00	1,20	0,00	0,00
5	2,50	0,80	0,00	0,00	3,10
6	2,60	0,00	0,00	2,80	3,00
7	0,00	1,50	0,00	1,90	3,00
8	0,00	0,00	2,20	0,00	0,00
9	0,00	0,00	1,20	0,00	0,00
10	0,00	0,00	1,90	0,00	0,00
11	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,90	0,70	1,20	2,60	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,90	2,70
14	2,40	1,40	2,20	2,60	0,00
15	0,00	1,30	2,20	0,00	3,10
16	2,40	0,70	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	2,20	2,50	3,20
18	2,60	1,50	0,00	2,50	2,90
19	0,00	0,00	2,00	2,50	2,90
20	0,00	0,00	0,00	2,70	0,00

Cuadro 61: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	9 y 7	0,1719	0,6480	1,22	*
T_0T_2	9 y 11	0,1533	0,5779	0,57	n.s.
T_0T_3	9 y 12	0,1504	0,5670	0,05	n.s.
T_0T_4	9 y 10	0,1567	0,5908	0,55	n.s.
T_1T_2	7 y 11	0,1649	0,6217	0,64	*
T_1T_3	7 y 12	0,1622	0,6115	1,26	*
T_1T_4	7 y 10	0,1681	0,6337	1,76	*
T_2T_3	11 y 12	0,1424	0,5367	0,62	*
T_2T_4	11 y 10	0,1490	0,5618	1,12	*
T_3T_4	12 y 10	0,1460	0,5505	0,50	n.s

Cuadro 62: Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 30 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	3,1	4,0	3,6	3,5	3,8
2	3,1	3,7	4,1	3,9	3,5
3	2,6	3,8	3,3	3,5	3,5
4	2,7	3,3	3,7	3,9	4,3
5	3,0	3,5	3,8	4,1	3,4
6	2,7	3,0	3,6	3,3	3,7
7	2,8	3,2	3,7	3,7	3,5
8	2,9	3,5	3,4	3,5	4,0
9	2,9	3,1	3,6	4,2	4,0
10	2,7	3,7	3,8	3,6	4,3
11	3,1	3,6	3,7	3,5	3,9
12	2,9	3,8	3,9	3,8	4,2
13	2,7	3,4	3,6	3,8	4,0
14	2,9	3,9	3,1	3,7	3,8
15	3,2	3,8	3,2	4,1	3,5
16	3,1	3,5	3,6	3,3	4,6
17	2,7	3,9	3,1	3,6	3,8
18	2,7	3,4	3,4	3,6	3,5
19	3,2	3,9	3,0	2,9	3,6
20	2,8	3,4	3,9	3,8	4,0

Cuadro 63: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0643	0,2384	0,68	*
T_0T_2	20 y 20	0,0643	0,2384	0,67	*
T_0T_3	20 y 20	0,0643	0,2384	0,78	*
T_0T_4	20 y 20	0,0643	0,2384	0,96	*
T_1T_2	20 y 20	0,0643	0,2384	0,01	n.s.
T_1T_3	20 y 20	0,0643	0,2384	0,10	n.s.
T_1T_4	20 y 20	0,0643	0,2384	0,28	*
T_2T_3	20 y 20	0,0643	0,2384	0,11	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0643	0,2384	0,29	*
T_3T_4	20 y 20	0,0643	0,2384	0,18	n.s

Cuadro 64: Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 60 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	3,2	4,5	5,3	4,4	4,6
2	3,5	4,6	5,5	5,2	4,9
3	3,0	4,7	4,8	4,6	5,1
4	3,3	4,3	5,2	5,2	5,9
5	3,5	4,4	5,0	5,3	4,6
6	3,1	3,7	4,6	4,2	4,9
7	3,3	4,0	4,9	5,3	4,4
8	3,0	4,1	4,9	4,5	5,4
9	3,4	3,5	5,1	5,0	5,3
10	3,0	4,2	5,3	4,6	5,7
11	3,6	4,5	5,2	4,5	5,1
12	3,8	4,9	5,3	4,4	5,5
13	2,9	4,1	4,4	5,1	5,3
14	3,5	4,7	4,4	5,1	4,7
15	3,7	4,4	4,3	5,7	4,4
16	3,6	4,5	4,9	4,1	5,9
17	3,2	4,7	4,5	5,3	5,6
18	3,3	4,5	4,7	4,7	4,8
19	3,8	4,6	4,2	4,3	4,5
20	3,2	3,8	5,5	5,3	5,5

Cuadro 65: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{j.} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,0908	0,3370	0,99	*
T_0T_2	20 y 20	0,0908	0,3370	1,55	*
T_0T_3	20 y 20	0,0908	0,3370	1,49	*
T_0T_4	20 y 20	0,0908	0,3370	1,76	*
T_1T_2	20 y 20	0,0908	0,3370	0,57	*
T_1T_3	20 y 20	0,0908	0,3370	0,51	*
T_1T_4	20 y 20	0,0908	0,3370	0,77	*
T_2T_3	20 y 20	0,0908	0,3370	0,06	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,0908	0,3370	0,21	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,0908	0,3370	0,27	n.s.

Cuadro 66: Datos tomados de altura de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. por vitroplanta a los 90 días de aplicados los tratamientos de AG_3.

Repetición	Tratamientos (cm)				
	T0	T1	T2	T3	T4
1	3,3	4,8	5,9	4,8	5,2
2	3,9	5,0	6,7	6,2	5,4
3	3,5	4,7	5,4	5,2	5,6
4	2,9	4,6	5,6	5,6	6,7
5	4,0	4,7	5,9	6,1	5,3
6	3,8	3,5	5,3	4,6	5,1
7	3,3	4,5	6,0	5,9	4,8
8	3,1	4,4	5,3	5,2	5,9
9	3,7	3,7	5,9	5,6	6,3
10	3,2	3,3	5,8	5,0	6,5
11	3,8	4,8	5,6	5,5	5,5
12	4,0	4,9	6,2	5,0	6,4
13	2,3	4,6	5,2	6,0	5,4
14	3,4	5,3	4,7	6,0	5,4
15	3,9	4,7	4,5	6,5	5,1
16	3,8	5,0	5,6	4,7	6,8
17	3,3	5,0	5,1	5,7	6,1
18	3,3	5,2	5,5	4,8	5,7
19	3,9	4,6	4,8	4,8	5,0
20	3,4	4,1	6,4	6,0	6,3

Cuadro 67: Prueba de Comparación de Medias de Tukey.

Tratamientos comparados	Número de repeticiones	S_d	ALS(T)	$\lvert \bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{j\cdot} \rvert$	Significancia
T_0T_1	20 y 20	0,1222	0,4535	1,08	*
T_0T_2	20 y 20	0,1222	0,4535	2,08	*
T_0T_3	20 y 20	0,1222	0,4535	1,97	*
T_0T_4	20 y 20	0,1222	0,4535	2,24	*
T_1T_2	20 y 20	0,1222	0,4535	1,00	*
T_1T_3	20 y 20	0,1222	0,4535	0,89	*
T_1T_4	20 y 20	0,1222	0,4535	1,16	*
T_2T_3	20 y 20	0,1222	0,4535	0,11	n.s.
T_2T_4	20 y 20	0,1222	0,4535	0,16	n.s.
T_3T_4	20 y 20	0,1222	0,4535	0,27	n.s.

ANEXO 2: FOTOGRAFÍAS

Figura 24: Arbusto de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

Figura 25: Flor y fruto de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

EN EL ENRAIZAMIENTO

Efecto de los tratamientos de Ácido Naftalenacético (ANA) en el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. "Chacpá" a los 90 días

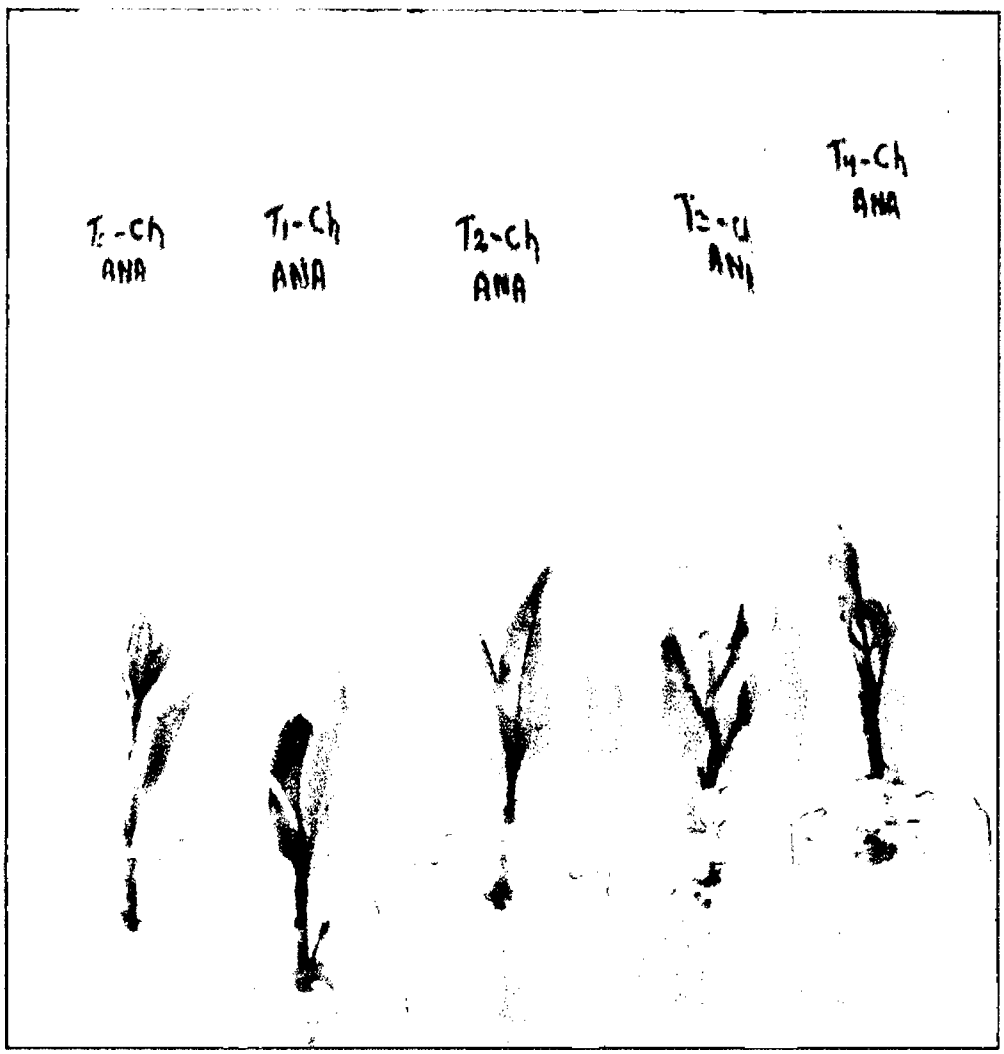


Figura 26: Vitroplantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con diferentes dosis de ANA: T0 (0,00 mg.L^{-1} ANA); T1 (0,25 mg.L^{-1} ANA); T2 (0,50 mg.L^{-1} ANA); T3 (0,75 mg.L^{-1} ANA) y T4 (1,00 mg.L^{-1} ANA).

Efecto de los tratamientos de Ácido Giberélico (AG_3) en el enraizamiento *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. "Chacpá" a los 90 días

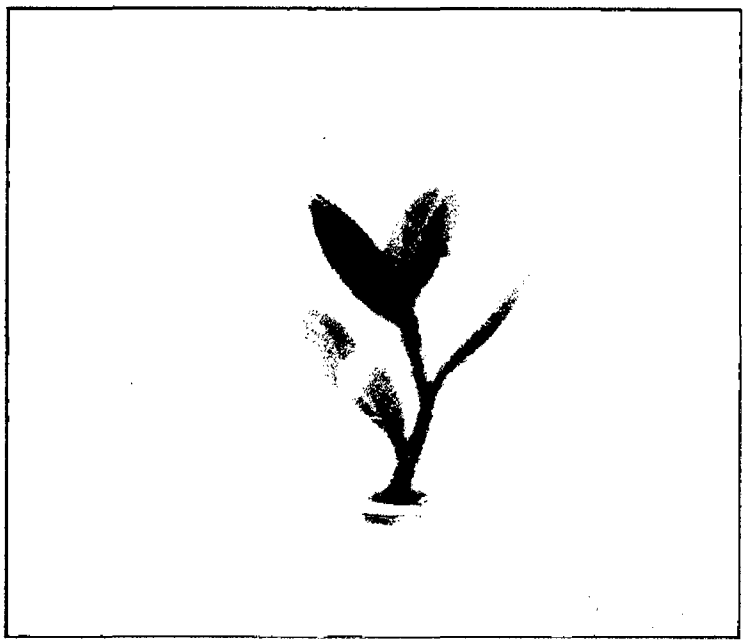


Figura 27: Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T0 (0,00 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días.

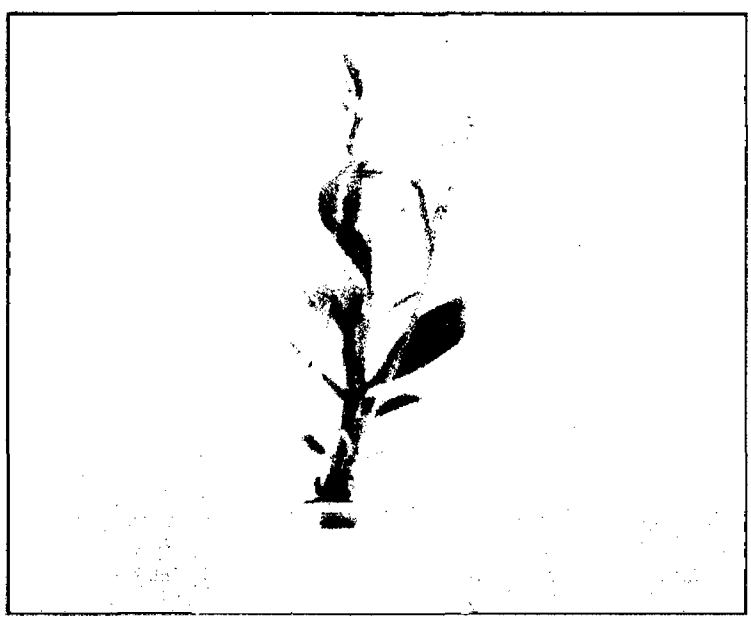


Figura 28: Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T1 (0,25 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días.

Figura 29: Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T2 (0,50 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días.

Figura 30: Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T3 (0,75 $mg.L^{-1}$ de AG_3) a los 90 días.

Figura 31: Vitroplanta de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. con el tratamiento T4 (1,00 mg.L^{-1} de AG_3) a los 90 días.

EN LA ACLIMATACIÓN

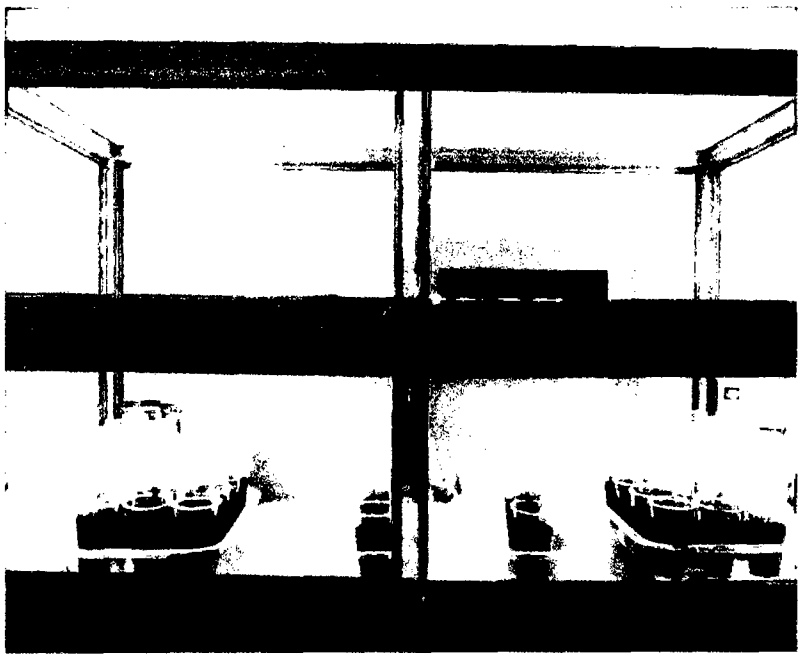


Figura 32: Cámara donde se dio las condiciones de invernadero para la aclimatación de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br.

Figura 33: Plantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 45 días.

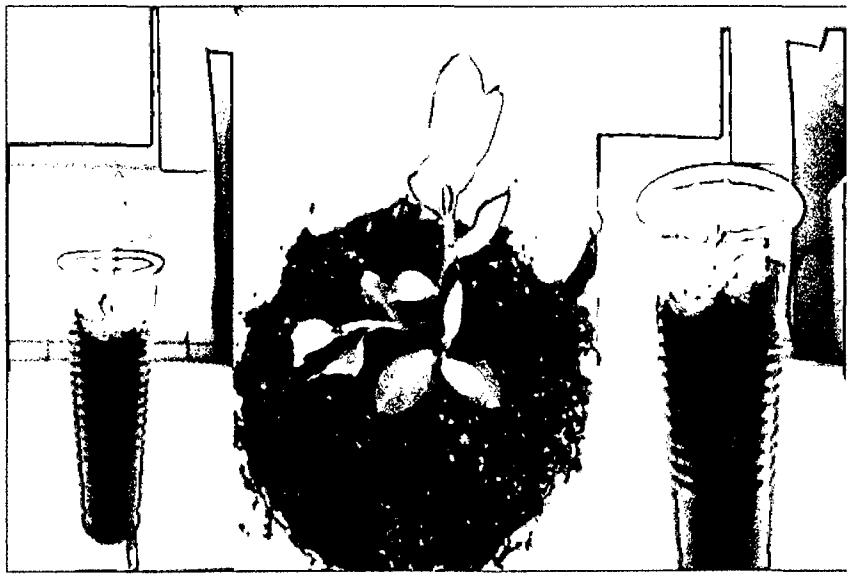


Figura 34: Plantas de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br. a los 60 días.