

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA - PASCO



TÉSIS

Estandarización de protocolo *in vitro* a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia* C.), UNALM - Lima

Para optar el título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Autora: Bach. Dayse Betsi HUAYLLACAYAN SALAZAR

Asesora: Dra. Edith Luz ZEVALLOS ARIAS

Cerro de Pasco – Perú - 2018.

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA -PASCO



TÉSIS

Estandarización de protocolo *in vitro* a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia* C.), UNALM – Lima

Sustentada y aprobada ante los miembros del jurado:

.....

Mg. Manuel LLANOS ZEVALLOS

PRESIDENTE

.....

Mg. Fernando James ALVAREZ RODRIGUEZ

MIEMBRO

.....

Mg. Moisés TONGO PIZARRO

MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto, y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Victoria y Justino

Gracias a ellos por creer en mí, por brindarme todo su amor, quienes con su comprensión, apoyo y esfuerzo lograron que siga adelante en mis estudios y alcance una de mis metas y ser una persona de bien.

A mis Familiares

A mis Hermanas Silvia, Yeni, Herlinda y a mi Hermano Junior, por ser la inspiración y motivación, por su inmenso amor y consejos en la vida; Y a toda mi Familia por su apoyo incondicional.

RECONOCIMIENTO

A Dios por haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir una de mis metas.

A Mi Asesora Dra. Edith Luz Zevallos Arias, por sus sabios consejos, y haber depositado su confianza en mí para elaborar el presente trabajo de la presente tesis.

A los miembros de jurado de tesis por la paciencia, apoyo, amistad, y dedicación que me brindaron al revisar cada capítulo de la presente Tesis.

Al Dr. Hans Nicolás Huamán López, por su apoyo Financiero y por confiar en mi persona para formar parte del equipo de investigación.

Un agradecimiento especial a la Dra. Lourdes Tapia Directora del Instituto de Biotecnología por su paciencia, orientación, dedicación; por haberme apoyado y permitido desarrollar este proyecto, haciendo posible la ejecución.

De la misma manera agradezco haber conocido y formar parte del Instituto de Biotecnología – Área (cultivo de tejidos); Gracias Sra. Milagritos, Sra. Olga, Sra. Gaby, Andrea, Rossana, Raquel, Mayte; por el apoyo durante el desarrollo de mi tesis desarrollada en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

No cesare agradecer a mis padres Victoria y Justino y a mis Familiares; por su apoyo incondicional y creer en mí.

Agradezco a mis amigos, Lucho, Fabiola, Mónica y Charito que siempre me alentaron.

A todas las personas que de forma desinteresada proporcionaron su apoyo en todo momento, mis más sinceros agradecimientos.

RESÚMEN

La Ortiga Colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia* C.) posee propiedades medicinales contra resfrió, asma y artritis y otros, también posee alto porcentaje de alcaloides (metabolitos secundarios); no habiendo investigaciones en esta especie acudimos en las personas que viven en las zonas alto andinas de nuestro país quienes lo consideran una planta valiosa que puede tener varias propiedades medicinales. Los estudios del cultivo *in vitro* de esta especie son escasos, a pesar de las ventajas que este tipo de técnicas presenta en especies de uso medicinal, en este trabajo Se estableció un protocolo de desinfección de semillas y se obtuvo plántulas germinadas *in vitro*, también se logró desarrollar un protocolo para el establecimiento y la reproducción masiva *in vitro*. Se evaluó en la etapa de desinfección el porcentaje de contaminación y porcentaje de sobrevivencia, el mejor resultado obtenido fue el tratamiento D1 con 83.33 % de desinfección mientras que D2 con 75%, D3 con 66.67% a comparación del tratamiento D0 (testigo) con 58.33%. La evaluación en la etapa de multiplicación en medios de cultivo con sales y vitaminas de M & S modificado con hormonas de crecimiento; Los mejores resultados durante las evaluaciones de las variables fue el MM3 compuesto (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3) mostrando diferencias significativas a comparación de otros tratamientos; seguido por MM2 (MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA), MM0 (MS basal + vitaminas (testigo)) y MM1 (MS + 0.5 mg/L BAP). En conclusión, se estableció un protocolo de introducción y multiplicación *in vitro* de Ortiga Colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia* C.) debido a los resultados obtenidos de la planta y con explantes vigorosos.

Palabras clave: Semilla botánica, desinfección, introducción, multiplicación *in vitro*, Ortiga Colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia* C.).

ABSTRACT

The Ortiga Colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia C.*) Possesses medicinal properties against is resfrió, asthma and arthritis and others, also poseand high percentage of alkaloids (metabolites secundarios); nor having investigations in this species attend in the people that live in the high Andean zones of our country those who consider it a valuable plant that it can have several medicinal properties. The studies of the crop *in vitro* of this species are scarce; in spite of the advantages that this type of technical presentto in species of medicinal use, andn this work established a protocol of disinfection of seeds and obtained plántulas germinated *in vitro*, also attained develop a protocol for the establishment and the massive reproduction *in vitro*. It evaluated in the stage of disinfection the percentage of pollution and percentage of sobrevivencia, the best result obtained was the treatment D1 with 83.33 % of disinfection whereas D2 with 75%, D3 with 66.67% to comparison of the treatment D0 (witness) with 58.33%. The evaluation in the stage of multiplication in means of crop with salts and vitamins of & M S modified with hormones of growth; The best results during the evaluations of the variables was the MM3 compound (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3) showing significant differences to comparison of other treatments; gone on down MM2 (MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA), MM0 (MS basal + vitamins (witness)) and MM1 (MS + 0.5 mg/L BAP). In conclusion, it established a protocol of introduction and multiplication *in vitro* of Ortiga colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia C.*) Because of the results obtained of the plant and with explantes vigorosos.

Keywords: Botanic seed, disinfection, introduction, multiplication *invitro* , Ortiga Colorada – Pumaishanca (*Caiophora cirsiifolia C.*).

INTRODUCCIÓN

La Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia* C.), familia (*Loasaceae*, *subfam.Loasoideae*); género de mejor grupo de las angiospermas, está representada en Perú por ocho géneros y alrededor de 60 especies (Brako, L. y Zarucchi, J.L., 1996); es una planta perenne herbácea - trepadora que crecen en el sur de Ecuador, Perú y Chile, su hábitat de crecimiento varía de 2400 hasta 4500 msnm y se encuentra generalmente en el bosque de matorral seco, carretera y muros de piedra (Ackermann y Weigend, 2006).

La *Caiophora*, se encuentra distribuido en los valles interandinos del centro del país, las consideradas aquí están referidas a la forma típica de Huarochirí (Lima), que existen hasta cuatro formas distintas tanto en el sur como en el norte del Perú; se estima que está bien representada encontrándose numerosas poblaciones en Chiquián (Ancash), en Infiernillo (Lima), en Huaytará (Huancavelica), camino Nazca-Puquio (Ayacucho) y cerca de Tarata (Tacna); en algunos poblados, individuos son utilizados con propósitos medicinales. (Eric Rodriguez y Maximilian Weigend., 2006).

Perú es uno de los países con mayor biodiversidad de Flora y Fauna a nivel mundial, donde existe alrededor de 25000 especies de plantas únicas originarias, de los cuales cerca de 1400 tienen propiedades medicinales. (Albán J.A., 1985).

Revalorando la importancia, la etnobotánica es el campo científico que estudia este conocimiento tradicional a través de las interrelaciones que se establecen entre el hombre y la planta. (Harshberger, 1896).

La técnica de micropropagación se desarrolla para la producción masiva de plántulas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60. La principal ventaja de esta técnica estriba en la multiplicación rápida de material clonal libre de

enfermedades; servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora o manipulación genética. Sin embargo, la industria de la micropropagación presenta serias limitaciones debido a los elevados costes de producción, reduciéndose la mayor parte de su actividad al sector de plantas ornamentales (Holdgate, D.P y Zandvoort, E.A., 1992).

ÍNDICE

DEDICATORIA

RECONOCIMIENTO

RESÚMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I.....	18
PROBLEMA DE INVESTIGACION	18
1.1. Identificación y determinación del problema	18
1.2. Formulación del problema.....	19
1.2.1. Problema principal	19
1.2.2. Problemas específicos	19
1.3. Formulación de objetivos	19
1.3.1. Objetivo general	19
1.3.2. Objetivos específicos	19
1.4. Justificación de la investigación.....	20
1.5. Limitaciones de la investigación	20
CAPITULO II.....	21
MARCO TEÓRICO	21
2.1. Importancia de las plantas medicinales	21
2.2. Aspectos generales de la ortiga colorada	22
2.2.1. Antecedentes	22
2.2.2. Origen y distribución geográfica.....	23
2.2.3. Clasificación taxonómica.....	24

2.2.4.	Descripción botánica.....	24
2.2.5.	Características de las semillas dormantes	25
2.2.6.	Condiciones agroclimáticas	26
2.2.7.	Valor medicinal.....	26
2.3.	Aspectos generales del cultivo <i>in vitro</i>	27
2.3.1.	Definición.....	27
2.3.2.	Micropropagación	28
2.3.3.	Fases de micropropagación según (Castillo., 2004)	29
2.4.	Ventajas y desventajas de la micropropagación.....	31
2.4.1.	Ventajas:.....	31
2.4.2.	Desventajas:	31
2.5.	Medios de cultivo	31
2.5.1.	Componentes del medio de cultivo	33
2.5.2.	Efectos del medio de cultivo	34
2.6.	Componentes orgánicos	34
2.6.1.	Carbohidratos	34
2.6.2.	Vitaminas	34
2.6.3.	Reguladores de Crecimiento	35
2.6.4.	Agentes Gelificantes	37
2.6.5.	Agar - agar	37
2.6.6.	Ajuste de pH.....	38
2.7.	Factores que afectan a la micropropagación	38
2.7.1.	Genotipo.....	38
2.7.2.	Factores Físicos.....	38
2.7.3.	Asepsia.....	39
2.8.	Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i>	39
2.8.1.	Contaminación	39

2.8.2.	Oxidación o fenolización	40
2.8.3.	Prevención.....	40
2.9.	Bancos de germoplasma	41
2.10.	Definición de términos	43
CAPITULO III.....		45
METODOLOGIA Y TECNICAS DE INVESTIGACIÓN		45
3.1.	Lugar de ejecución	45
3.1.1.	El área experimental está ubicada en:	45
3.1.2.	Ubicación Geográfica:	45
3.2.	Materiales	46
3.2.1.	Material vegetal de Ortiga Colorada (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>).....	46
3.2.2.	Materiales y reactivos del laboratorio	47
3.3.	Métodos	48
3.3.1.	Población y muestra en la fase de introducción	48
3.3.2.	Fase preliminar de selección de semilla de la planta madre	49
3.3.3.	Selección de Semilla de (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>)	49
3.3.4.	Desinfección del material vegetal	50
3.3.5.	Proceso de desinfección de las semillas.....	52
3.3.6.	Ensayo de desinfección y germinación	54
3.3.7.	Preparación de medio de cultivo	54
3.4.	Introducción o fase de inicio	57
3.4.1.	Población y muestra para la fase de inicio	57
3.4.2.	Planteamiento de medios de cultivo para la fase de Inicio	58
3.4.3.	Ensayo preliminar de medios de inicio	58
3.5.	Multiplicación <i>in vitro</i>	59
3.5.1.	Población y muestra para la fase de multiplicación	59
3.5.2.	Planteamiento de medios de cultivo para la fase de multiplicación	59

3.5.3.	Ensayo preliminar de medios de multiplicación	60
3.5.4.	Peso fresco y seco de las plántulas de (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>)	61
3.6.	Parámetros de evaluación	62
3.6.1.	Tratamiento de desinfección	62
3.6.2.	Tratamiento de inicio	62
3.6.3.	Tratamiento de Multiplicación	62
3.7.	Diseño de investigación.....	63
3.7.1.	Tipos de Investigación	63
3.7.2.	Modelo estadístico línea.....	64
3.7.3.	Formulación de Hipótesis	65
CAPITULO IV		66
RESULTADOS Y DISCUSIONES		66
4.1.	Tratamiento de desinfección	66
4.1.1.	Contaminación de las plántulas.....	66
4.1.2.	Germinación de semillas	69
4.1.3.	Eficiencia de desinfección	70
4.2.	Tratamiento de inicio o introducción	72
4.2.1.	Porcentaje de germinación y contaminación	72
4.3.	Tratamiento de multiplicación.....	75
4.3.1.	Altura de las plántulas	76
4.3.2.	Número de hojas	78
4.3.3.	Número de Raíz	80
4.3.4.	Número de Brotes	82
4.3.5.	Porcentaje de pelos urticantes en las raíces	84
4.3.6.	Porcentaje de pelos urticantes en los tallos	86
4.3.7.	Porcentaje de pelos urticantes en las hojas	89
4.3.8.	Peso fresco y peso seco de las plántulas <i>in vitro</i>	91

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de(<i>Caiophora Cirsiiifolia C.</i>).....	24
Cuadro 2: Valor medicinal de (<i>Caiophora cirsiiifolia C.</i>).....	27
Cuadro 3: Materiales, equipos e instrumentos del laboratorio.....	47
Cuadro 4: Reactivos, Materiales de Gabinete y otros.	47
Cuadro 5: Tratamientos de desinfección.....	50
Cuadro 6: Descripción de tratamientos de desinfección.	53
Cuadro 7: Composición de Medio de Cultivo de Murashige Skoog (1962).....	56
Cuadro 8: Concentración de Vitaminas, agar y azúcar.	56
Cuadro 9: Tratamiento planteado para la fase de inicio.....	58
Cuadro 10: Tratamiento planteado para la fase de multiplicación.....	60
Cuadro 11: Análisis de varianza del Diseño Completamente al Azar (DCA).	64
Cuadro 12: Porcentaje de contaminación y desinfección.....	66
Cuadro 13: Porcentaje Germinación de las semillas de Ortiga Colorada	69
Cuadro 14: Porcentaje de germinación y contaminación de (<i>Caiophora cirsiiifolia C.</i>).....	71
Cuadro 15: Porcentaje de Contaminación y Germinación de semillas	72
Cuadro 16: ANOVA para número de semillas germinadas en la fase de inicio.	73
Cuadro 17: ANOVA ajustado para número de semillas germinadas en la fase de inicio.....	74
Cuadro 18: Prueba de Tukey de numero de semillas germinadas.....	74
Cuadro 19: ANOVA para altura de plantas en la fase de multiplicación.	76
Cuadro 20: Prueba de Tukey para longitud promedio de las plántulas.....	77
Cuadro 21: Prueba de Kruskal-Wallis para número de hojas.	79
Cuadro 22: Comparación de medias para número de hojas.....	79
Cuadro 23: Prueba de Kruskal-Wallis para el número de raíces.....	81

Cuadro 24: Comparación de medias para Numero de raíces.	81
Cuadro 25: Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes.	82
Cuadro 26: Comparación de medias para número de brotes.	83
Cuadro 27: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en la raíz.	84
Cuadro 28: ANOVA Ajustado para porcentaje de pelos urticantes en la raíz.	85
Cuadro 29: Prueba de Tukey de porcentaje de pelos urticantes en la raíz.	85
Cuadro 30: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en el tallo.	87
Cuadro 31: Prueba de Tukey para Porcentaje de pelos urticantes en los tallos.	87
Cuadro 32: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en las hojas.	89
Cuadro 33: Prueba de Tukey para Porcentaje de pelos urticantes en las hojas.	89
Cuadro 34: Prueba de Tukey de peso fresco, seco y peso final	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características de la Ortiga Colorada (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>).....	46
Figura 2: Población y Muestra para la fase de desinfección in vitro.....	48
Figura 3: Fase preliminar de selección de la planta Madre.	49
Figura 4: Selección de Semilla Botánica.....	49
Figura 5: Proceso de desinfección de las semillas de ortiga colorada.....	53
Figura 6: Plantas sobrevivientes después de los 2 meses de siembra en medio de cultivo M & S.	54
Figura 7: Preparación de Medio de cultivo.	55
Figura 8: Población y Muestra para la fase de Inicio	57
Figura 9: plantas de los cuatro tratamientos de introducción.	58
Figura 10: Población y Muestra para la Fase de Multiplicación in vitro.	59
Figura 11: Procedimiento de multiplicación in vitro.....	60
Figura 12: Procedimiento del secado de las plántulas.....	61
Figura 13: Tasa de contaminación y desinfección de las semillas introducidas.	67
Figura 14: Plántulas de contaminadas	68
Figura 15: Grafico de barras de Porcentaje de germinación de semillas.....	69
Figura 16: Germinación de semillas de (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>).	70
Figura 17: Grafico de barras de eficiencia de desinfección y germinación de (<i>Caiophora cirsiifolia C.</i>).....	71
Figura 19: Gráfico de barras de Porcentaje de contaminación y germinación en la fase de inicio.	72
Figura 20: Gráfico de barras de Longitud promedio (cm) de plántulas.	77

Figura 21: Plántulas in vitro de (<i>Caiophora cirsiifolia</i> C.) en los 4 tratamientos de medio de cultivo.....	78
Figura 22: Gráfico de barras de promedio de hojas.	79
Figura 23: Gráfico de barras de promedio de número de raíz.	81
Figura 24: Gráfico de barras de promedio de brotes.	83
Figura 25: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en la raíz.	86
Figura 26: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en la raíz.	88
Figura 27: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en las hojas.	90
Figura 28: porcentaje de pelos urticantes en raíces, tallo y hojas de (<i>Caiophora cirsiifolia</i> C.).	91
Figura 29: Gráfico de barras de diferencia de medias de peso fresco, seco y peso final de (<i>Caiophora cirsiifolia</i> C.).....	92

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Identificación y determinación del problema

El género *Caiophora* pertenece a la familia *Loasaceae* mejor grupo de las angiospermas, se les llama plantas floreciendo; distribuidos en los andes de Argentina Chile Ecuador y Perú (Ackermann y Weigend, 2006).

La familia Loasaceae está representada en el Perú por ocho géneros y alrededor de 112 especies como lo menciona (Brako, L. y Zarucchi, J.L., 1996); y (Ulloa Ulloa, C.et al., 2004) menciona estas, 59 especies y 10 taxones sub específicos en cinco géneros son considerados plantas endémicas del Perú también han sido estudiadas por (Weigend, M. 1997)

El género Nasa el más rico en especies, ocupan principalmente las regiones Meso andina, Puna Húmeda-seca y bosques muy húmedos montanos, desde los 1400 hasta los 4700 msnm de altitud diez de los endemismos reconocidos se encuentran representados dentro del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el estado. (Turismo casa de shismay - Huanuco, 2014).

La mayoría de los trabajos en este sentido se han realizado con aquellas especies ya consideradas como cultivadas, y que tienen hábitats más restringidos, han sido descuidadas al grado de que muchas de ellas se encuentran en riesgo de extinción, se reconoce la existencia de 60 especies de *Caiophora* dentro del género cuya supervivencia se ve severamente amenazada en estos momentos; esta situación se debe principalmente a la sobreexplotación de poblaciones silvestres para ser aprovechadas como medicina natural. Por otro lado la destrucción de su hábitat, así como su baja tasa de reproducción sexual, limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas son factores que hacen a la planta difícil de multiplicar.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema principal

- ¿Cómo establecer un protocolo *in vitro* a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*caiophora cirsiifolia C.*), UNALM - Lima?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cómo evaluar la efectividad de la desinfección *in vitro* a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*caiophora cirsiifolia C.*)?.
- ¿Cómo determinar el mejor medio de propagación *in vitro* a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*caiophora cirsiifolia C.*)?.

1.3. Formulación de objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Establecer un protocolo *in vitro* a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*caiophora cirsiifolia C.*).

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad de la desinfección *in vitro* a partir de semilla Botánica.
- Determinar el mejor medio de propagación *in vitro* a partir de semilla Botánica.

1.4. Justificación de la investigación

Perú es uno de los países con mayor biodiversidad de Flora y Fauna a nivel mundial; donde existe alrededor de 25000 especies de plantas únicas originarias, de los cuales cerca de 1400 tienen propiedades medicinales. Las plantas medicinales se han convertido en un importante aporte para la industria farmacológica a nivel mundial, donde los Investigadores Científicos siguen descubriendo nuevos usos y aplicaciones para las sustancias Medicinales que se encuentra en las plantas; Dando de importancia a (*Caiophora cirsiifolia C.*) como ornamento para producir calor para abrigarse, para el cuidado de la salud, para la artritis; entre otros (Albán J.A., 1985).

Los usos de las plantas medicinales están relacionado con las creencias y patrones de comportamiento de los seres humanos de acuerdo a su rol social, ello cobra importancia porque a partir de investigaciones que cuantifiquen el conocimiento tradicional asociado a la flora, se pueden identificar especies vegetales que merecen estudios más profundos, dándole validez y contabilidad a los datos proporcionados por los informantes (Castañeda R.Y. , 2011).

El programa nacional de medicina complementaria del Perú, la organización panamericana de la salud recientemente comparó a la medicina complementaria con medicina alopática en clínicas y hospitales trabajando dentro del sistema de seguro social de Perú (Es Salud).

1.5. Limitaciones de la investigación

La ortiga colorada (*Caiophora cirsiifolia C.*), es una planta de crucial importancia que podría contribuir en la medicina convencional; a pesar de lo anterior se han hecho relativamente pocos esfuerzos por estudiarlos, mejorarlos y conservarlos; la mayoría de investigaciones son en especies cultivadas.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia de las plantas medicinales

La importancia de las plantas medicinales se hace más patente en la actualidad en los países en vías de desarrollo. En Pakistán se estima que un 80% de las personas dependen de éstas para curarse, y un 40% en China. En países tecnológicamente avanzados como los Estados Unidos la población utiliza habitualmente también plantas medicinales para combatir ciertas dolencias, y en Japón hay más demanda de plantas medicinales que de medicina convencional. (Santillo, H., 2010)

El cultivo *in vitro* de plantas medicinales es una estrategia que permite la conservación del germoplasma de plantas elite. Cuanta mayor diversidad vegetal se conserve y se tenga disponible para su uso, más posibilidades habrán de satisfacer las necesidades futuras del mundo, Se puede afirmar que existe mucho interés en la conservación y utilización de plantas silvestres con propiedades medicinales que están presentes en nuestro ecosistema de forma natural, con el fin de incrementar su utilidad y valor económico. (International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI., 2002).

2.2. Aspectos generales de la ortiga colorada

2.2.1. Antecedentes

No habiendo mucha información publicada sobre esta especie en nuestra Región de Pasco, al hacer un recorrido por las dos provincias ubicadas en las zonas alto andinas; desde los 2800 – 4500 msnm. En la Provincia de Pasco (Huayllay, Paucartambo y Huachon) y en Daniel Alcides Carrión (Tapuc, Pillao, Santa Ana de Tusi), durante el recorrido se pudo observar que la planta está siendo amenazada por su extinción, a vista de ello se plantea la forma más eficaz de propagación *in vitro*; además se indaga la utilidad de esta planta con los pobladores habitantes del lugar.

El material genético obtenido como muestra para esta investigación fue exactamente del Centro Poblado de la Victoria – Paucartambo; allí los pobladores nos informaron que utilizaban para combatir enfermedades respiratorias, dolor reumático, artritis; entre otros.

La familia *Loasaceae* en el Perú está compuesta por ocho géneros con un promedio de 112 especies la mayoría de estas plantas son herbáceas, mientras que el género *Caiophora* está compuesta alrededor de 60 especies cuya distribución está en los andes de Argentina Chile Ecuador y Perú. Son hierbas perennes en forma de cojines, también son considerados como hiervas trepadoras o hiervas rosuladas acaules; *Caiophora cirsiifolia* C. Conocidos por los nombres comunes como ortiga macho, ortiga colorada, pucashinua y se pueden encontrar desde los 2100 – 4000 msnm. (Ackermann y Weigend, 2006).

2.2.2. Origen y distribución geográfica

En Perú se encuentra restringido a la vertiente occidental y valles interandinos del centro del país; presente en varias regiones, las consideradas aquí están referidas a la forma típica de Huarochirí (Lima), existen hasta cuatro formas distintas tanto en el sur como en el norte del Perú; se conocen numerosas poblaciones en Chiquián (Ancash), en Infiernillo (Lima), en Huaytará (Huancavelica), camino Nazca-Puquio (Ayacucho) y cerca de Tarata (Tacna), (Eric Rodriguez y Maximilian Weigend., 2006).

La especie de *Caiophora cirsiifolia* es una especie muy común, por ejemplo en Depto. Arequipa, Moquegua y Tacna, en Perú; es la única especie sinuosa de *Caiophora* en el lado occidental de los Andes al sur de la ciudad de Arequipa, mientras que en Chile esta especie es pobremente documentados sólo hay unas pocas colecciones como, *Caiophora chuquitensis*, *C. cirsiifolia*, *C. coronata*, *C. deserticola sp.* y *C. rosulata*. el material de *Caiophora rosulata* se divide entre dos subespecies, *C. rosulata subsp. Rosulata*, estas cinco especies comprenden el rango completo de hábitos conocido para el género: sufrútices (Markus Ackermann y Maximiliano Weigend , 2007).

En Chile solo se encuentra en las regiones de Arica y Parinacota y Tarapacá, entre 3000 y 4000 msnm, encontrándose en las quebradas de la precordillera asociada a queñoas y otros arbustos depende de las lluvias veraniegas del invierno. (Felipe Orrego Silva., 2013).

Mientras en el centro del Perú está bien representada, presentes en Shimayhuasi (Huanuco), Quero – Jauja (Junín); vive a pleno sol en el pre cordillera y en el altiplano, en terrenos pedregosos, zonas áridas y de lluvias, Crece entre los 2500 y 4500 msnm. (Cerrón, 2015).

2.2.3. Clasificación taxonómica

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de (*Caiophora Cirsiifolia* C.).

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cornales
Familia	Loasaceae
Genero	<i>Caiophora Cirsiifolia</i> C. Presl

Fuente: (Cronquist., 1981).

2.2.4. Descripción botánica

El término *cirsiifolia* hace referencia al parecido de las hojas con los *Cirsium*, un grupo de cardos; esta es una hierba perenne, de tallos tortuosos o espiralados como enredaderas, por lo cual se encarama serpenteando sobre rocas y arbustos vecinos. Una característica de esta especie es que sus largos tallos no están cubiertos de pelos urticantes como el resto de la planta. Tiene flores de gran belleza, solitarias, colgantes o encorvadas; sus pétalos y escamas nectarinas son de color naranja. (Felipe Orrego Silva., 2013).

La Ortiga Colorada es una Hierba perenne, tortuosa de hasta 5m de largo sin roseta basal, tallos esparcidamente cubiertos con pelos urticantes, escabrosos y con gloquidios, hojas con peciolo de hasta 25mm de largo, lamina triangular-ovada, de hasta 35mm de largo, ápice acuminado pinado-pinnatifico, con 6 a 7 lóbulos por lado ovado a triangulares, margen groseramente serrado a pinnatifico, con 2 a 3 lóbulos, cara superior setosa, cara inferior con escasos pelos urticantes, inflorescencias terminales, frondosas, con flores péndulas, pentámeras, cáliz con lóbulos expandidos, ápice reflejo, triangular-ovado de hasta 1mm, setoso y tricomas escábridos, margen aserrado, corola con pétalos profundamente

cimbiformes, hasta 20mm de largo de color naranja, con alas laterales, setosos y con tricomas escábridos y con gloquidios, estambres en 5 fascículos epipetalos, de 20 a 25 por fascículos; escamas nectaríferas fundamente cimbiformes, de hasta 5mm de largo, de color anaranjado; estaminodios libres, con forma L, de 1cm de largo; ovario ínfero, cónico o cilíndrico; fruto una capsula cónica, deflexa, de hasta 4cm de largo, torcidos, con tres aberturas longitudinales, cáliz acrescente. (Alicia M, et al., 2010).

2.2.5. Características de las semillas dormantes

La germinación de la semilla es el procedimiento más frecuente para propagar las plantas superiores, y el que mejor asegura el mantenimiento e incluso el aumento de la biodiversidad; no obstante, en algunas especies hortícolas, árboles, silvestres y plantas con interés medicinal, la germinación es muy escasa y lenta con lo que se dificulta el proceso de propagación convencional; la baja respuesta a la germinación se asocia a fenómenos de dormición seminal. (Upadhyaya, H.D. & Nigam, S.N., 1999).

El fenómeno de la dormancia es común, principalmente en semillas de determinadas hortalizas y forrajeras, algunas fruteras y de especies arbóreas y ornamentales, que no germinan después de la cosecha debido a los mecanismos internos, de naturaleza física o fisiológica, que bloquean la germinación; estos mecanismos son genéticos y acontecen durante el ciclo de vida de la especie, durante la maduración de la semilla, de modo que, después de la dispersión, la semilla todavía no estará apta para germinar. (Ruben Mérola y Saulo Sebastian., 2012).

La relación entre la dormancia y la germinación estaba regulada por un balance entre el inhibidor y el activador; al suprimirse el inhibidor puede la semilla, si

encuentra buenas condiciones germinar, este efecto del inhibidor puede eliminarse con tratamientos químicos, hormonas y almacenado de las semillas. (González, Yolanda et al., 2005).

2.2.6. Condiciones agroclimáticas

El género *Caiophora* en Perú; se distribuye ampliamente en las zonas alto andinas del País, se encuentran en lugares Rivereña, laderas de arbustos, ruderal en clima Frío o muy frío; a una latitud de 4,2 ° - 6,4 ° L.S; temperatura -05 - 22 ° C; precipitación 100 – 1500 mm; Humedad Relativa 40 – 50 % se encuentra distribuido desde los 3500 – 4500 msnm. (Miñano., 2009).

2.2.7. Valor medicinal

Caiophora cirsiifolia, según el análisis preliminar contiene alcaloides, fenoles y carbohidratos en alto porcentaje; los alcaloides son metabolitos secundarios, en su composición contienen nitrógeno en sus moléculas; en su gran mayoría son básicos porque son aminas y también hay alcaloides neutros. Por otro lado también los alcaloides se encuentran en un grupo de productos naturales de mucho interés por la intensidad de los efectos que puede llegar a producir y porque forma la principal fuente de la materia prima de buen número de principios activos que son utilizados actualmente en la acción terapéutica; mientras que los fenólicos están compuesto por un amplio conjunto de sustancias de elemento estructural fundamentales por la presencia de por lo menos un núcleo bencénico que contiene por lo menos un grupo hidroxílico libre. Otros componentes fitoquímicos que también las plantas poseen: quinonas lactonas, flavonoides, saponinas, esteroides, terpenos, triterpenos, entre otros. (Apaza., 2017).

Cuadro 2: Valor medicinal de (*Caiophora cirsiifolia C.*).

Bondades Medicinales	Valor Nutricional	Por cada 100g
Combate la Tos, enfermedades Respiratorias, dolor reumático, artritis y resfrío.	Proteína en materia seca	30-35
	Fibra	9

Fuente: (www.botanical.online.com, 2017).

2.3. Aspectos generales del cultivo *in vitro*

2.3.1. Definición

En su amplia acepción, el cultivo *in vitro* comprende a un grupo de técnicas mediante las cuales un ex plante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: célula, tejidos y órganos), se cultivan asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Rocca, W y Mogrinski, L., 1991).

El cultivo de tejidos *in vitro*, es un grupo heterogéneo de técnicas, mediante las cuales un explante, cualquier parte separada de una planta, células, tejidos, embriones, etc. Con potencial de diferenciación puede ser cultivado bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y fitohormonas que se incuban en condiciones controladas; esta técnica se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa. (Luna, 2002).

2.3.2. Micropropagación

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plantas en un periodo breve, y la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra (Espinoza, N; et al., 1992).

La técnica de multiplicación se realiza después de establecer el mejor medio de cultivo también es denominado sub-cultivos. Las plántulas desarrolladas se multiplica en el mejor medio propuesto, en esta etapa los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxina, citoquininas, ácido giberelico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes. (Johansen, M., 1999).

La micropropagación es un procedimiento que consiste en el cultivo bajo condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro*. Es también una de las aplicaciones del cultivo de tejidos donde ha habido más avances y es aplicada comercialmente a un mayor número de especies (Barba, 2001).

El cultivo *in vitro* se utiliza cada vez más para la propagación de especies amenazadas en peligro de extinción, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo (Manrique., 2008).

2.3.3. Fases de micropropagación según (Castillo., 2004)

A. Fase 0: preparación de la planta madre

Para extraer el material genético a propagar, la planta madre debe ser de buenas características fenotípicas, con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. La planta donadora del material vegetal debe permanecer en un invernadero en un periodo de tres a seis meses bajo condiciones controladas; en otros casos si el material vegetal es silvestre seleccionar las mejores semillas y hacer la prueba de germinación para asegurar la viabilidad.

B. Fase 1: desinfección del material vegetal

Una vez seleccionado la planta madre se extrae el material genético, se puede propagar a partir de cualquier parte de la planta como: yemas, Tallos, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, anteras y meristemas etc; antes de extraer los ex plantas se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los patógenos más comunes de hongos y bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones asépticas; luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluido el % y tiempo dependerá a los protocolos establecidos de acuerdo a las especies de plantas.

C. Fase 2: introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, se traslada el material vegetal a una cámara de flujo laminar, allí se efectúa la desinfección con NaClO y alcohol al 70 °, posteriormente se introduce o siembra en sus respectivos medios de cultivo donde permanecerá por un periodo de 15 a 30 días, denominado también fase de inicio.

D. Fase 3: multiplicación

Durante esta fase se espera que los ex plantas que pasaron la fase 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas, en la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo; periódicamente estos nuevos brotes se deben sub-cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de ensayo u otros recipientes adecuados; estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo.

E. Fase 4: enraizamiento

Para enraizar las plántulas se utilizan principalmente plántulas individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta fase y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

F. Fase 5: aclimatación de los ex plantas enraizados

Las plántulas recién enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales.

2.4. Ventajas y desventajas de la micropropagación

A continuación, se mencionan ventajas y desventajas de la micro propagación (Barba, A. et al., 2001.).

2.4.1. Ventajas:

- Producción de un gran número de plantas
- Obtención de plantas puede ser en cualquier época del año.
- Las plantas pueden almacenarse in vitro ocupando poco espacio.
- Permite la obtención de clones de plantas donadoras de alta calidad.
- En la mayoría de los casos la producción comercial de las especies resulta redituable.
- Nos permite hacer estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, Fito mejoramiento. y ciencias afines.
- Bioconservación y producción de compuestos útiles.
- Incremento de la variabilidad genética.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Conservación e intercambio de germoplasma.
- Permite optimizar el uso de los factores ambientales y nutricionales.

2.4.2. Desventajas:

- No todas las especies responden igual al cultivo in vitro.
- Cada especie requiere de métodos particulares de cultivo.
- La fase de investigación es costosa.

2.5. Medios de cultivo

Uno de los medios de cultivo más usados en la actualidad es el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). Este medio se recomendó para ensayos de médula de tabaco con el fin de obtener una alta tasa de crecimiento y un

aumento en la respuesta a los factores orgánicos de crecimiento con un mínimo de interferencia con otros nutrimentos orgánicos e inorgánicos. Los extractos foliares del tabaco producían un aumento en el crecimiento de tejido medular aislado o en cultivos de callo de *Nicotiana tabacum*; esto se debía, en parte a constituyentes inorgánicos del extracto, especialmente el N y K. Este medio se considera como alto en sales y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones (Roca, W. y Mroginski., 1991).

Los nutrientes y minerales son los componentes básicos del cultivo de tejidos vegetales; determinan cuán rápido crecerá el tejido vegetal utilizado y la respuesta morfológica de este, se verán fuertemente influenciados por la concentración de los nutrientes que se le suministren al medio de cultivo. Además la elección de un medio de cultivo depende, principalmente de la especie a ser trabajada, del tipo de tejido vegetal u órgano vegetal a ser cultivado y del propósito del experimento (Doods, J y Roberts, L., 1995).

La adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un ex plante. Generalmente, los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable. (Perea, M; Tirado,A. , 2011.).

2.5.1. Componentes del medio de cultivo

El medio de cultivo requiere una combinación de macro y micro nutrientes para el correcto desarrollo de la planta; esta combinación de nutrientes va a variar dependiendo de la especie a propagar (Caula, 2011).

Los macronutrientes son requeridos en grandes cantidades en la mayoría de medios. El nitrógeno es usualmente añadido en forma de iones amonio y nitrato aunque también se utilizan formas orgánicas como aminoácidos (Caula, 2011).

Las necesidades totales de N, varían entre 12-60 mmol/L, de los cuales al amonio le corresponden 6-20 y al nitrato 6-40 mmol/L. La mayor parte de las plantas prefieren el nitrato al amonio, aunque en algunos casos puede ocurrir lo contrario. Es necesario encontrar la mejor proporción nitrato/amonio para conseguir un crecimiento y desarrollo óptimos *in vitro*. (Pierik, 1988)

El nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, calcio y azufre son añadidos al medio de cultivo como diferentes compuestos químicos conocidos como macrosales. Algunos de ellos son: $MgSO_4 \cdot H_2O$ magnesio y azufre; $NH_4 H_2PO_4$, KH_2PO_4 fósforo; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ó $Ca (NO_3) \cdot 4H_2O$ calcio y KCl , KNO_3 o KH_2PO_4 potasio (Caula, 2011).

Un explante aislado *in vitro* e inducido a crecer y desarrollarse necesita agua, macro y micro nutrientes, azúcar, como fuente de carbono, y a menudo los reguladores de crecimiento, principalmente auxinas, citoquininas y ácido giberelico; Las concentraciones de estos reguladores son determinantes en el control del crecimiento y morfogénesis. Generalmente, una alta concentración de auxinas y una baja concentración de citoquininas en el medio de cultivo, promueve la proliferación de células que forman callos. De otro lado, bajas

concentraciones de auxinas con altas concentraciones de citoquininas promueven la formación de regenerantes (Thorpe, T., 1981).

2.5.2. Efectos del medio de cultivo

La formación de brotes de algunas especies se logra solamente en agua; en otras plantas el medio sólido necesita contener una adecuada concentración de sales minerales y sacarosa. Así mismo, el tipo de cultivo está influenciado por la naturaleza física del medio. Sin embargo, la morfogénesis depende del medio empleado y es esencial un balance correcto entre las sales inorgánicas, orgánicas y reguladores de crecimiento (Luna, 2002).

2.6. Componentes orgánicos

2.6.1. Carbohidratos

Son compuestos orgánicos como el azúcar y la celulosa (Mejía, 1994). Los carbohidratos no son dados a la planta porque generalmente ellas mismas los generan, sin embargo las plantas en laboratorio son pequeñas o están incompletas para sintetizar todos los compuestos orgánicos que necesitan (Kyte, 1987).

La sacarosa o glucosa son comúnmente usadas en la preparación de medios de cultivo, de 2-5% (p/v). Otras fuentes de carbohidratos como fructosa o almidón, también pueden ser utilizadas (Smith, 2013).

2.6.2. Vitaminas

Para alcanzar el mejor crecimiento de tejidos es comúnmente esencial suplementar el medio con una o más vitaminas y aminoácidos. De estos, la tiamina (vitamina B1), generalmente es el ingrediente esencial. Otras vitaminas, especialmente piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3) y pantetonato de calcio (vitamina B5) y myo-inositol, son también conocidos como mejoradores del desarrollo de plántulas *in vitro* (Mejia, 1994).

Donde el Myo-inositol es un interesante hexitol involucrado en la biosíntesis de cyclitol, almacenamiento de compuestos polihídricos como reservas, germinación de semillas, transporte de azúcares, nutrición mineral, metabolismo de carbohidratos, estructura de la membrana celular, como la formación de la pared celular, en la homeostasis hormonal y en el estrés fisiológico (Loewus, 1993 citado por Smith, 2013).

2.6.3. Reguladores de Crecimiento

A. Auxinas

Las auxinas juegan un rol importante en muchos aspectos del crecimiento y diferenciación. Son agregadas al medio de cultivo con la finalidad de inducir la división celular, el crecimiento de callo, diferenciación vascular y la formación de raíces. Su acción está directamente asociada con el aumento de ARNm. Muchos de ellos responsables del alargamiento celular; las auxinas endógenas se sintetizan en tejidos jóvenes y metabólicamente activos, son transportadas a través de las células mediante rutas de polaridades diferentes, siendo basipetal en regenerantes (brotes) y acropetal en raíces. Existe evidencia de que el Ácido indol-3-acético (AIA) se sintetiza en hojas maduras, es atrapado dentro del floema, debido a su afinidad por el pH ácido (8.0), y luego es transportado a tejidos de alta actividad metabólica como meristemas, desde donde se transportará extravascularmente. “Los meristemas son netamente importadores y no sintetizadores de AIA en plantas superiores” (Baker, 2000). Las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos son: Ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftaleno acético (ANA) y ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D). De las tres, el AIA es la más débil. Se inactiva fácilmente por la luz y por la acción de enzimas celulares. Se ha encontrado, además, que el 2,4-D y

el ANA son más estables que el AIA al incluirse en el medio sales de MS (Medina, 1991).

B. Citoquininas

Las citoquininas inducen la división celular y la formación de órganos en cultivos *in vitro*; su acción está asociada con la regulación del ciclo celular (Werner et al., 2001). La deficiencia endógena de citoquinina produce regenerantes con enanismo, desarrollo retardado, entrenudos cortos y hojas lanceoladas; siendo evidente el rol que juegan las citoquininas en el proceso de morfogénesis. Contrariamente, al promover la aparición de regenerantes meristemáticos, las citoquininas tienen un efecto regulatorio negativo en el crecimiento de raíces; en presencia de bajas concentraciones de citoquininas, las raíces tienen una prolongada fase meristemática y eventualmente repeticiones mitóticas adicionales que permiten un crecimiento radicular principalmente en número y levemente en tamaño celular (Werner et al., 2001).

C. Gibelinas

La giberelina más utilizada en cultivo *in vitro* es el ácido giberelico-3 (AG3). El efecto del AG3 en la formación de estructuras vasculares organizadas y la inducción de raíces depende de las concentraciones utilizadas. Así, la adición en el medio de cultivo de 1 μM de AG3 resulta en la producción de un mayor número de raíces por callo; y su omisión, en la ausencia de formación de raíces (Haddon & Northcote, 1976).

(Pech y AEke, A. et al., 2007). El uso de las giberelinas en el cultivo *in vitro* ha sido discutido. Por lo general se sugiere no emplear AG3 al inicio de los tratamientos, debido a su acción inhibitoria en la acumulación de almidón a

nivel celular. Sin embargo, Medina (1991), reporta que el mejor tratamiento regenerativo para entrenudos esta complementado con 5 mg/l AG3.

D. Agua de coco

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos tiene buena capacidad de amortiguamiento y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2.5%, nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos; de AC se han aislado purinas y fracciones que muestran la presencia de compuestos fenólicos como leucoantocianinas, que pueden promover la división celular. Se han identificado las adenilcitosininas, Zeatina y ribosido de Zeatina. (Roca, W. y M. Mroginski. , 1991).

2.6.4. Agentes Gelificantes

El medio de cultivo usualmente contiene agentes gelificantes, dependiendo del objetivo y de los requerimientos de los explantes. El cultivo de células en suspensión, por ejemplo, es un medio rico en nutrientes y reguladores; carece de estos compuestos debido a que requiere movimiento continuo para la producción constante de oxígeno necesario en el crecimiento celular. En algunos casos el empleo de compuestos gelificantes es importante para brindar a la planta soporte; en estos casos se utiliza una serie de compuestos, los más conocidos son agar-agar y el phytigel o gelrite (Perea, M; Tirado,A. , 2011.).

2.6.5. Agar - agar

El tipo de agar usado para preparar el medio de cultivo puede afectar la respuesta de los experimentos. Si el agar no está puro; generalmente presentará impurezas que

perjudican el medio de cultivo. Como el agar es un producto derivado de las algas, Puede tener actividad fisiológica en contacto con el tejido vegetal (Smith, 2013).

2.6.6. Ajuste de pH

El pH del medio de cultivo se ajusta generalmente entre 5,5 y 6. Debajo de 5,5 el agar no solidificará correctamente y sobre 6, el gel estará muy firme (Smith, 2013).

El pH del medio va a influenciar en que las sales del medio de cultivo se mantengan en forma soluble, en la toma de nutrientes, reguladores de crecimiento y el efecto gelificante del agar (George, 2008).

2.7. Factores que afectan a la micropropagación

2.7.1. Genotipo

El crecimiento del cultivo de tejidos, el desarrollo de órganos y la morfogénesis *in vitro* están probablemente más influenciados por el genotipo que por cualquier otro factor. El medio de cultivo y el ambiente necesitan ser variados dependiendo del género o especie incluso, para variedades estrechamente relacionadas, los requerimientos del medio de cultivo pueden ser diferentes. Algunos cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser suficientes para mejorar la respuesta del genotipo (Luna, 2002).

2.7.2. Factores Físicos

Los principales factores físicos que influyen durante la incubación del cultivo son: la luz, la temperatura y la concentración de gases como Oxígeno, Dióxido de Carbono y el etileno (Calderon, A. et al., 1995).

El fotoperiodo, la longitud de onda y la intensidad lumínica deben ser tomados en cuenta cuando se realiza el cultivo de tejidos; además de alguna forma parece que

existe un reflejo de los requisitos de temperatura de las plantas crecidas en condiciones de campo (Montoya, 1991).

2.7.3. Asepsia

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón es porque en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacteria y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial, alcohol a diferentes porcentajes y otros (Roca, W. y M. Mroginski. , 1991).

2.8. Problemas asociados al cultivo *in vitro*

2.8.1. Contaminación

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo (Debergh, P.; Read, P., 1991).

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistemáticos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto el material, puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistemáticos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia. (Casells., 1991).

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia. (Roca, W. y Mroginski., 1991).

2.8.2. Oxidación o fenolización

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro* como la composición del medio. Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura. (Debergh, P.; Read, P., 1991).

En general, los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar eventos morfo genéticos y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierten en potentes oxidantes (Dixon y Paiva, 1995).

2.8.3. Prevención

El oscurecimiento de los tejidos, especialmente de los explantes recientemente aislados y el medio puede prevenirse generalmente siguiendo estos pasos:

- Removiendo los compuestos fenólicos producidos por dispersión, adsorción o lavado: Adsorción mediante carbón activado (CA), Adsorción por polyvinilpirolidona (PVP).

- Reduciendo la actividad fenolasa y la disponibilidad del sustrato: Bajo pH, Oscuridad., la incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar estas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima
- La adición de sustancias antioxidantes, (ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína HCL, ditriotreitol, glutatión y mercaptoetanol); Menor disponibilidad de oxígeno (medios líquidos estacionarios), Inactivando las enzimas fenolasas empleando quelatantes (Agentes quelantes: NaFeEDTA, EDTA, dietilditiocarbamato, dimetil-ditiocarbamato), tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles. (Debergh, P.; Read, P., 1991).

2.9. Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento propagados de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de una categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo in vitro, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos del ADN (Iriondo, 2001).

Depósito global de semillas de Svalbard en Noruega. Es quizás la ‘madre’ de todos los depósitos de semillas del mundo. Se encuentra en Spitsbergen, una isla helada cerca del Polo Norte, y en él se guardan a modo de copia de seguridad el contenido de 1.750 bancos de semillas de todo el mundo. Así que en caso de un problema con aquellos depósitos Svalbard sería la salvación para reconstruir la vegetación terrestre gracias a las 4.500 plantas almacenadas. Allí, a 131 metros sobre el nivel del mar, en una montaña de piedra arenisca, se encuentra una estructura con una temperatura interior

de -0.4° C con un impresionante sistema de seguridad. Simplemente es una especie de instalación de almacenamiento a la que solo las organizaciones que tienen depositadas allí sus semillas pueden acceder. Ahora mismo se albergan unas 840 mil muestras, pero Svalbard tiene capacidad para custodiar hasta 4.5 millones de muestras. (Villar y Victor, 2015).

El Centro Nacional de Recursos Genéticos de la Agro biodiversidad proyecta conservar a futuro el ADN e investigar alrededor de 200,000 muestras de casi 2,500 especies vegetales y animales, entre oriundas y adaptadas al territorio nacional, con lo cual el Perú se convertirá en el segundo país especializado en este tema a escala mundial, después del que posee los Estados Unidos de América (alberga 900,000 muestras de recursos genéticos). “Hay que tener presente que el Perú es uno de los 17 países mega diversos del planeta” (Instituto Nacional De Innovación Agrario - INIA., 2017).

El CIP cuenta con el banco de germoplasma in vitro más grande del mundo. Alberga aproximadamente 8026 variedades de camote. Este banco conserva muestras vivas de la inmensa diversidad mundial de variedades de cultivo y sus parientes silvestres. También asegura los recursos genéticos para el largo plazo y su disposición para los agricultores, fitomejoradores e investigadores (Centro Internacional de la Papa - CIP., 2011).

Entre las ventajas que presentan la mantención in vitro destacan la conservación de germoplasma de un gran número de plantas en un espacio reducido, mayor control fitosanitario de las colecciones, facilidad de intercambio del material genético, e incremento de la tasa de multiplicación clonal. Las desventajas de esta técnica es que requieren de sub-cultivos periódicos (repique), actividad que dificulta en muchos casos su aplicación. (Engelmann, 1997).

2.10. Definición de términos

- Ácido Giberelico (AG3): Se le atribuye a la estimulación de la división y alargamiento celular. Estimula el rompimiento de dormancia de las semillas.
- Aclimatación: consiste en dar las condiciones adecuadas a las plantas trasladadas de laboratorio al invernadero.
- ADN: Acido Desoxirribonucleico.
- Agar: sustancia gelificante que nos permite anchar las plántulas en cultivo *in vitro*.
- AIA: Acido Indol Acetico es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas induce la formación de callos.
- ANA: ácido naftalén acético, se utilizan para inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados.
- Asepsia: Conjunto de métodos para eliminar Microorganismos del material Biológico, instrumental o equipo del laboratorio.
- Banco de Germoplasma: es una colección de material vegetal vivo en forma de semillas o esporas.
- BAP: 6-benzilamino-purina (BAP), son citocininas sintéticas.
- Biotecnología: conjunto de técnicas aplicadas a la tecnología biológica.
- Cultivo de Tejidos Vegetales: se basa en aislamiento de órganos, tejidos y células; y colocarlos en un medio de cultivo nutritivo esteril (usualmente gelificado - semisólido) donde se regenerara una o muchas plantas.
- Esterilización: Eliminación de microorganismos por medio físicos Químicos.
- Ex plantes: Segmento de órgano o tejido de la planta usado como material de estudio en el cultivo de tejido *in vitro*.
- Fitohormonas: son sustancias producidas por células vegetales y que actúan sobre otras células como mensajero químico.

- Fotoperiodo: Duración relativa de la variación de luz y oscuridad, se refiere especialmente al efecto fisiológico.
- *In vitro*: Designa los procesos biológicos que se realizan fuera de los organismos vivos; literalmente “en vidrio”.
- Clon: descendientes de un solo individuo, Producido asexualmente.
- Latencia o dormición: significa que una semilla está en un estado que impide germinar por diversos factores que pueden afectar la germinación.
- Medio de cultivo: mezcla de macro y microsales en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas permite el crecimiento de una planta.
- Meristemos: son tejidos vegetales embrionarios formados por células indiferenciadas, capaces de originar una planta.
- Micro propagación: Multiplicación vegetativa de plantas *in vitro*.
- Protoplastos: célula vegetal desprovista de pared celular.
- Semilla: fruta que alberga el embrión que puede derivar en una nueva planta.
- Totipotencia: célula que tiene la capacidad para regenerar una planta.
- Virus: parásitos intracelulares obligatorio.
- Vitricación: conjunto de características físicas que describen cambio en las hojas raíz tallo que les dan una apariencia cristalina.

CAPITULO III

METODOLOGIA Y TECNICAS DE INVESTIGACIÓN

3.1. Lugar de ejecución

El estudio de este trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) – Área de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.1.1. El área experimental está ubicada en:

- Lugar : Instituto de Biotecnología
- Distrito : La Molina
- Provincia : Lima
- Departamento o Región : Lima

3.1.2. Ubicación Geográfica:

- Altitud : 264 m.s.n.m
- Latitud sur : 12°04'9 "S"
- Longitud oeste : 76°56' 4 "W"
- Precipitación promedio anual: 60 mm
- Temperatura promedio : 19°c
- Viento : 13 Km/Hora

- Clima : Templado Caluroso
- Humedad Relativa : 76%
- Zona agroecológica : Costa sub-tropical

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal de Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia* C.)

El material vegetal utilizado ha sido a partir de semilla botánica de (*Caiophora cirsiifolia* C.). Lo cual fue recolectado e identificada en las dos provincias de la Región de Pasco; se encontró en los Distritos (Huayllay, Paucartambo y Huachon) en estos Distritos mencionados se encontró en mayor densidad de población y en Provincia Daniel A Carrión se encuentran distribuidos en (Tapuc, Pillao, Santa Ana de Tusi) donde se evidencio la escases de las plantas de esta especie. El Material Propagado para esta investigación fue del Centro Poblado de la victoria perteneciente al Distrito de Paucartambo, material seleccionado de acuerdo a las buenas características fenotípicas y la disponibilidad.

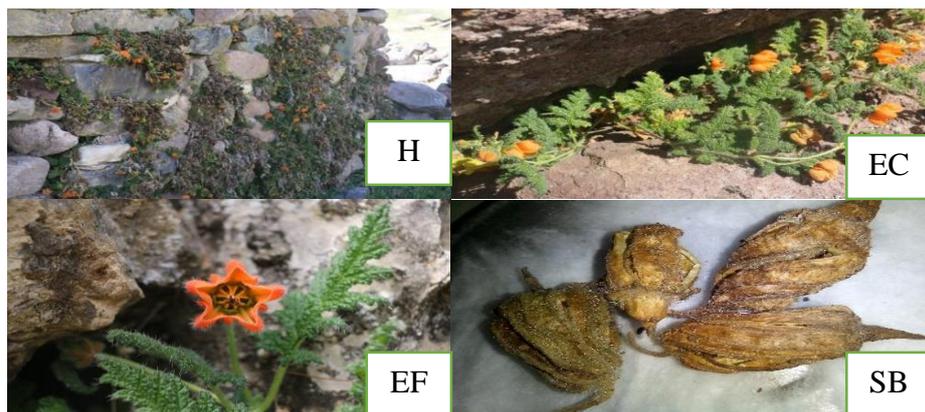


Figura 1: Características de la Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia* C.).

Dónde:HC. Hábitat de crecimiento-rocosas, EC. Estructura de crecimiento-rastrera, EF. Estructura floral- pentámeras, SB. Semilla Botánica-capsula cónica.

3.2.2. Materiales y reactivos del laboratorio

Cuadro 3: Materiales, equipos e instrumentos del laboratorio.

MATERIALES	EQUIPOS	INSTRUMENTOS
Erlenmeyer	Autoclave	Bisturí
Frascos	Balanza analítica	Espátula
Placa Petri	Agitador magnético.	Papel aluminio
Tubos de ensayo	Cámara de flujo laminar	Pinzas
Pipetas	Destilador	Platos de acero
Probeta graduada	Microondas	Selladores de plástico
Mecheros	Potenciómetro	
Gotos	Incubadora	
Jeringa	Estereoscopio	
Matraces	Timer (regulador de fotoperiodo)	

Fuente: Huayllacayan.S, Dayse. (2018).

Cuadro 4: Reactivos, Materiales de Gabinete y otros.

REACTIVOS	OTROS	MATERIALES
Sales Murashige Skoong (1962)	Agua destilada	Laptop
Aminoácidos	Alcohol al 70% y 96%.	Calculadora
Vitaminas: (tiamina – HCL; Piridoxina; ácido nicotínico; Glicina)	Guardapolvo	Reglas
Hormonas: (Auxinas, Citoquininas, Ácido Giberelico.	Guantes	Papel bond
Myo-Inositol	Mascarilla	Fólderes
Ácido ascórbico	Detergente	Lápices, tajadores, borradores y tijera
Sacarosa	Fungicidas	Engrampadoras y perforador
Agar agente gelificante	Bactericida	Portafolios, etc.

Fuente: Huayllacayan.S, Dayse. (2018).

3.3. Métodos

3.3.1. Población y muestra en la fase de introducción

En esta etapa de la investigación se trabajó con modelo estadístico. Diseño Completamente al Azar – DCA.

La Población y la Muestra ha estado representado por 48 plántulas en sus respectivos tubos de ensayos considerados estos población pequeña.

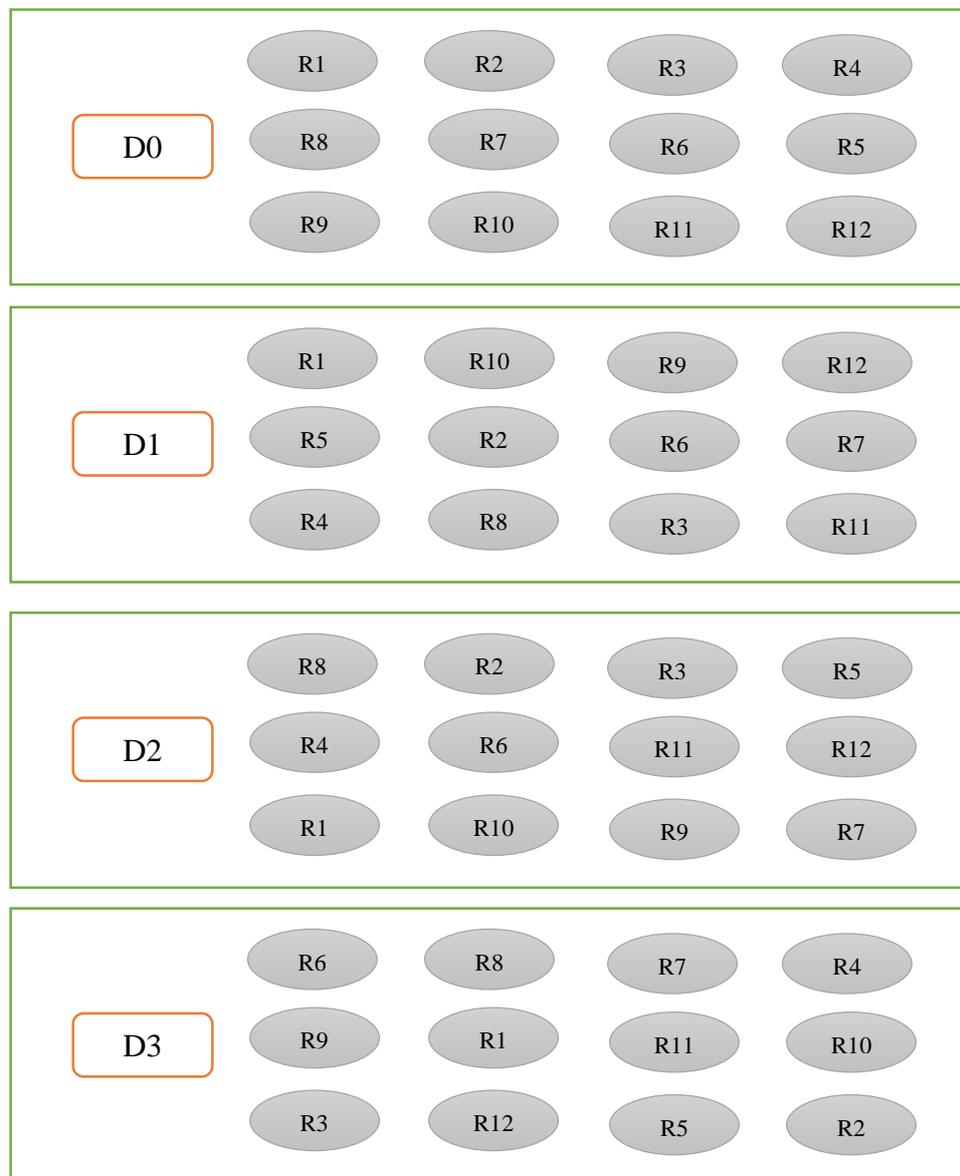


Figura 2: Población y Muestra para la fase de desinfección *in vitro*.

3.3.2. Fase preliminar de selección de semilla de la planta madre

- Hábitat de crecimiento: La Ortiga colorada son plantas rastreras – trepadoras, crecen en los lugares aledañas, pedregosos y matorrales.
- Selección de la planta Madre: Consiste en escoger las mejores plantas con buenas características fenotípicas.
- Selección de las semillas: Consiste en seleccionar las mejores capsulas, físicamente con buenas características fenotípicas.



Figura 3: Fase preliminar de selección de la planta Madre.

3.3.3. Selección de Semilla de (*Caiophora cirsiifolia* C.)

Las semillas han sido seleccionadas teniendo en cuenta las buenas características fenotípicas.



Figura 4: Selección de Semilla Botánica

3.3.4. Desinfección del material vegetal

No habiendo Trabajos de investigación en esta especie, el protocolo empleado para la desinfección e introducción *in vitro* de las semillas fueron planteados tomando como referencia las Familias cercanas y las características fenotípicas de la semilla (*Caiophora cirsifolia* C.).

La desinfección y limpieza de las semillas se hizo fuera y dentro de la cámara de flujo laminar; se realizó con 3 tratamientos de desinfección y 1 de control. se pesó 0,5g de semillas por cada tratamiento, posteriormente fueron envueltas en un rollito de gasa y se dejaron remojando por 30 minutos en agua destilada, Una vez finalizado con el procedimiento se emplearon con los tratamientos de desinfección planteados ver (cuadro 5); luego se sembró en tubos de ensayo con medio de cultivo Murashige SkoogM&S; posteriormente fue llevado a la sala de incubación a una temperatura de 22°C, Fotoperiodo de 16 horas Luz y 8 horas nocturnas, se acondiciono a esta temperatura, por su hábitat de planta característico de clima frio; donde permaneció durante 2 meses que nos permitió evaluar el porcentaje de contaminación y el porcentaje de germinación de las semillas.

Cuadro 5: Tratamientos de desinfección.

Trat.	Desinfección	Procedimiento
D0	Fuera de cámara	Lavar con agua corriente, sumergir en solución de detergente por 10min, seguido por 3 enjuagues con agua corriente.
	Dentro de cámara	3 enjuagues con agua destilada estéril.
	Fuera de cámara	Lavar con agua corriente, sumergir en solución de detergente por 10min, seguido por

D1		3 enjuagues con H ₂ O corriente, luego sumergir en solución de Benlate 1gr/100ml H ₂ O por 5min, seguido por 3 enjuagues con agua corriente.
	Dentro de cámara	Pasar con alcohol de 70° por 30 segundos, seguido por 3 enjuague con agua destilada estéril, luego sumergir en NaOCl (1%) por 5min, seguido por 3 enjuagues con H ₂ O destilada estéril.
D2	Fuera de cámara	Lavar con agua corriente, sumergir en solución de detergente por 10min, seguido por 3enjuagues con agua corriente, luego sumergir en solución dePhyton 1ml/100ml H ₂ O por 5min seguido por 3 enjuagues con agua corriente.
	Dentro de cámara	Pasar por alcohol 70° por 30 segundos seguido por 1 enjuague con H ₂ O destilada estéril, luego sumergir en NaOCl (1%) por 5min seguido por 3 enjuagues con agua destilada esteril.
D3	Fuera de cámara	Lavar con solución de detergente por 10min, seguido por 3 enjuagues con agua destilada,luego sumergir en solución de

		Benlate 1gr/100ml + Phyton 1ml/100ml H2O, seguido por 3 enjuagues con H2O corriente.
	Dentro de cámara	Pasar por alcohol a 70° por 30 segundos, enjuagar con agua estéril; Sumergir en solución de NaOCl (1.5%) por 5 min, seguido 3 enjuagues con agua destilada estéril.

Fuente: Huayllacayan.S, Dayse. (2018).

Dónde: D=Desinfección

3.3.5. Proceso de desinfección de las semillas

Consiste en seleccionar las semillas con buenas características, posteriormente se pesó 0.5g colocándolos en gasa envueltas para facilitar la desinfección, previo a esto se remojo las semillas en agua destilada por 30 minutos; luego se sumergió en Benlate y Phyton anti fúngico y bactericida; en seguida se trasladaron a la cámara de flujo laminar donde se efectuó la desinfección con NaClO y alcohol al 70°; una vez terminada la desinfección se colocaron las semillas en medio de cultivo en tubos de ensayo y frascos al finalizar la siembra fueron sellados y etiquetados individualmente, se colocaron en gradillas, posteriormente se trasladaron a la sala de incubación acondicionadas para su óptimo desarrollo de las plántulas.



Figura 5: Proceso de desinfección de las semillas de ortiga colorada

Dónde: 1. Flor de *Caiophora*; 2. Semillas en capsula; 3. semillas envueltas con gasa; 4. Fungicida y Bactericid; 5. Desinfección fuera de cámara; 6. Desinfección dentro de cámara de flujo laminar.

Cuadro 6: Descripción de tratamientos de desinfección.

Trat.	Benlate (gr)/L H ₂ O	Phyton (ml) / L H ₂ O	NaOCl (%)	Tiempo de inmersión en NaClO (%)	Alcohol 70(%)
D0	-	-	-	-	-
D1	1	-	1	5 min	3segundos
D2	-	1	1	5 min	3segundos
D3	1	1	1.5	5min	3segundos

Fuente: Huayllacayan.S, Daysi. (2018).

3.3.6. Ensayo de desinfección y germinación

Se realizó un ensayo de desinfección y germinación en medio de M&S, con 4 tratamientos y 12 repeticiones, ver Cuadro 6; se hicieron 4 evaluaciones cada 15 días durante 2 meses, lo cual se observó la germinación de las semillas a partir de los 45 días y a los 60 días se obtuvo el mejor resultados para esta etapa.

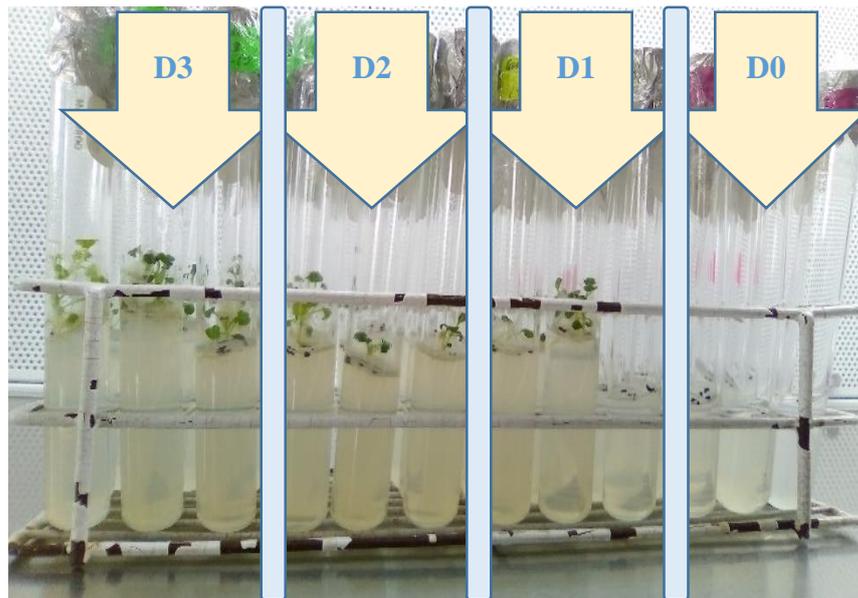


Figura 6: Plantas sobrevivientes después de los 2 meses de siembra en medio de cultivo M & S.

3.3.7. Preparación de medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo se realiza tomando como referencia el protocolo estandarizado por Murashige Skoog (1962).

Cada uno de los diferentes tratamientos planteados se prepararon en la sala de preparación de medios del laboratorio de cultivo de tejidos del (IBT), utilizando macro y micronutrientes requeridos por cada tratamiento, cada uno de las sales minerales fueron pesados y diluidos en agua destilada, al igual que las vitaminas, hormonas y fuentes de sacarosa.

El pH se calibro con el pHmetro a 5.7, Utilizando hidróxido de potasio KOH y ácido clorhídrico HCL para la calibración; esto se hizo previo a la adición del agar. Luego de haber sido calibrado, se agregó el agar y se calentó en microondas por 10 minutos, después se removió con una bagueta y se volvió a calentar en microondas por 5 minutos hasta que el agar este bien disuelto.

Los medios de cultivo fueron vertidos 30ml/ frascos de vidrio y 6 ml en tubos de ensayo, se taparon con papel aluminio, luego se llevaron a la sala de autoclavado para su respectiva esterilización. Esto se hizo a 121°C y 15 psi por un tiempo determinado de 25 minutos. Una vez cumplido la hora del autoclavado se espera que la psi baja a 0, luego sacamos los medios de cultivo en la mesa, lo dejamos enfriar para sellarlo con sellador de plástico y/o parafilm este proceso se hace para evitar la contaminación; posteriormente fue llevado a la sala de medio donde esperaremos 7 días para poder utilizar los medios de cultivo, estos días son para ver si aparece algún agente patógeno que podría perjudicar nuestro medio de cultivo.



Figura 7: Preparación de Medio de cultivo.

Cuadro 7: Composición de Medio de Cultivo de Murashige Skoog (1962).

MEDIO BASAL DE MURASHIGE SKOOG (1962).			
Sales de macronutrientes	(mg/L)	Sales de micronutrientes	(mg/L)
NH₄NO₃	1650	KI	0.83
KNO₃	1900	H₃BO₃	6.2
CaCl₂·2H₂O	440	MnSO₄·4H₂O	22.3
MgSO₄·7H₂O	370	ZnSO₄·7H₂O	8.6
KH₂PO₄	170	Na₂MoO₄·2H₂O	0.25
		CuSO₄·5H₂O	0.025
		CoCl₂·6H₂O	0.025
		Quelato de hierro	
		Na₂·EDTA	37.3
		FeSO₄·7H₂O	27.8

Fuente: (Perea, M; Tirado,A. , 2011.).

Cuadro 8: Concentración de Vitaminas, agar y azúcar.

VITAMINAS	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Glicina	2.0
Tiamina-HCL	0.1
Piridoxina-HCL	0.5
Acido nicotínico	0.5
Myo-Inositol	100
Azúcar	30 gr/l
Agar	4.5 gr/l

Fuente: (Perea, M; Tirado,A. , 2011.).

3.4. Introducción o fase de inicio

3.4.1. Población y muestra para la fase de inicio

La Población y Muestra ha sido representado por 100 plántulas, respectivamente 5 plantas por frascos herméticos; empleados en 4 tratamientos con 5 repeticiones.

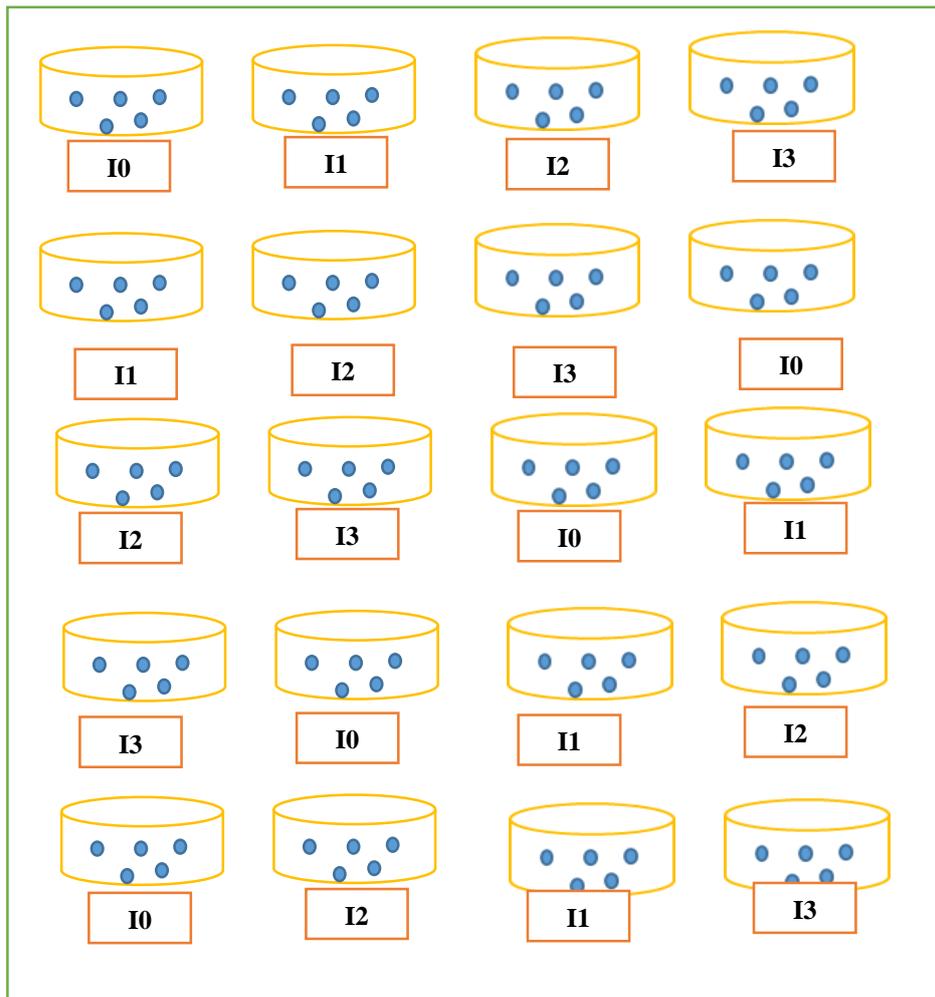


Figura 8: Población y Muestra para la fase de Inicio

3.4.2. Planteamiento de medios de cultivo para la fase de Inicio

Una vez obtenido el mejor protocolo de desinfección del ensayo en el cuadro 6, pasamos a la Fase de (Inicio o introducción), esta técnica consiste en sembrar las semillas en medio de cultivo planteado en el cuadro 9.

Cuadro 9: Tratamiento planteado para la fase de inicio.

Trat	Componentes
I0	MS (solo).
I1	MS + 2mg/l BAP.
I2	MS + 0.5mg/l BAP + 0.1mgANA.
I3	MS + 2mg/l AG3.

Dónde: I= Inicio

3.4.3. Ensayo preliminar de medios de inicio

El ensayo de medios de cultivo de inicio se hizo después de 2 meses de haber obtenido el resultado del mejor protocolo de desinfección; se utilizaron 4 tratamientos con 5 repeticiones, se sembraron 5 semillas /frasco.

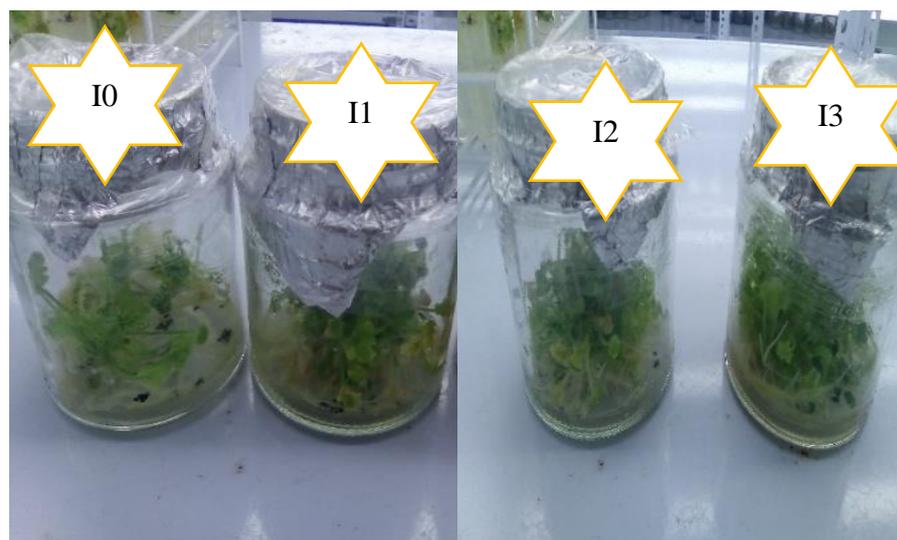


Figura 9: plantas de los cuatro tratamientos de introducción.

3.5. Multiplicación *in vitro*

3.5.1. Población y muestra para la fase de multiplicación

La Población y Muestra ha sido representado Por 80 plántulas, respectivamente 5 plantas por frasco, empleados con 4 tratamientos y 4 repeticiones.



Figura 10: Población y Muestra para la Fase de Multiplicación *in vitro*.

3.5.2. Planteamiento de medios de cultivo para la fase de multiplicación

No habiendo estudios previos de (*Caiophora cirsiifolia* C.); Los medios de multiplicación planteado fue de acuerdo a los estudios realizados a las familias cercanas de esta especie.

Se seleccionaron las plántulas vigorosas y bien desarrolladas para esta fase. Es decir, aquellas que median 3 cm a más, que presentaban de 6 a 8 hojas con una coloración verdoso. Se sembraron 5pt/frasco con 4 repeticiones, por 4 tratamientos.

Cuadro 10: Tratamiento planteado para la fase de multiplicación.

Trat.	Componentes
MM0	MS basal + vitaminas (testigo).
MM1	MS + 0.5 mg/L BAP.
MM2	MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA.
MM3	MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3.

Dónde: MM = Multiplicación

3.5.3. Ensayo preliminar de medios de multiplicación

La prueba con los medios de multiplicación se hizo después de 1 mes de introducción en medio de inicio; se seleccionaron las plántulas que desarrollaron mejor; se utilizaron 4 tratamientos con 4 repeticiones, haciendo el repique de 5 plántulas/ frasco.

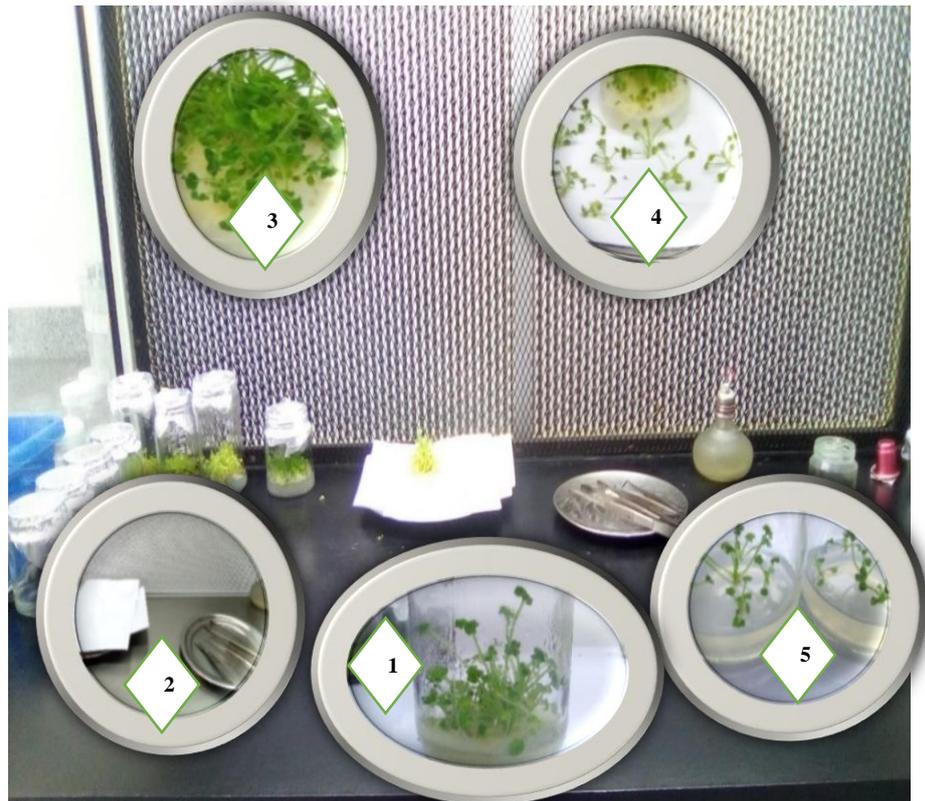


Figura 11: Procedimiento de multiplicación *in vitro*.

Dónde: 1. Planta obtenida a partir de semilla, 2. Materiales para multiplicación, 3. Plántulas para multiplicar, 4. Brotes para siembra, 5. Brotes sembrados en medio de multiplicación.

3.5.4. Peso fresco y seco de las plántulas de (*Caioophora cirsiifolia* C.)

De acuerdo a los vitroplantas obtenidas a los dos meses de permanencia en la fase de multiplicación; se seleccionaron al azar 4 frascos correspondientes 1 frasco con 5 plántulas por tratamiento, se hizo el lavado respectivo hasta librar el agar-agar con agua corriente del caño; en seguida se dejó escurrir por 12 horas; luego se pesó cada muestra con cautela. Para obtener el peso seco se secaron las plántulas en una estufa a 35 ° C por un periodo de 3 horas.

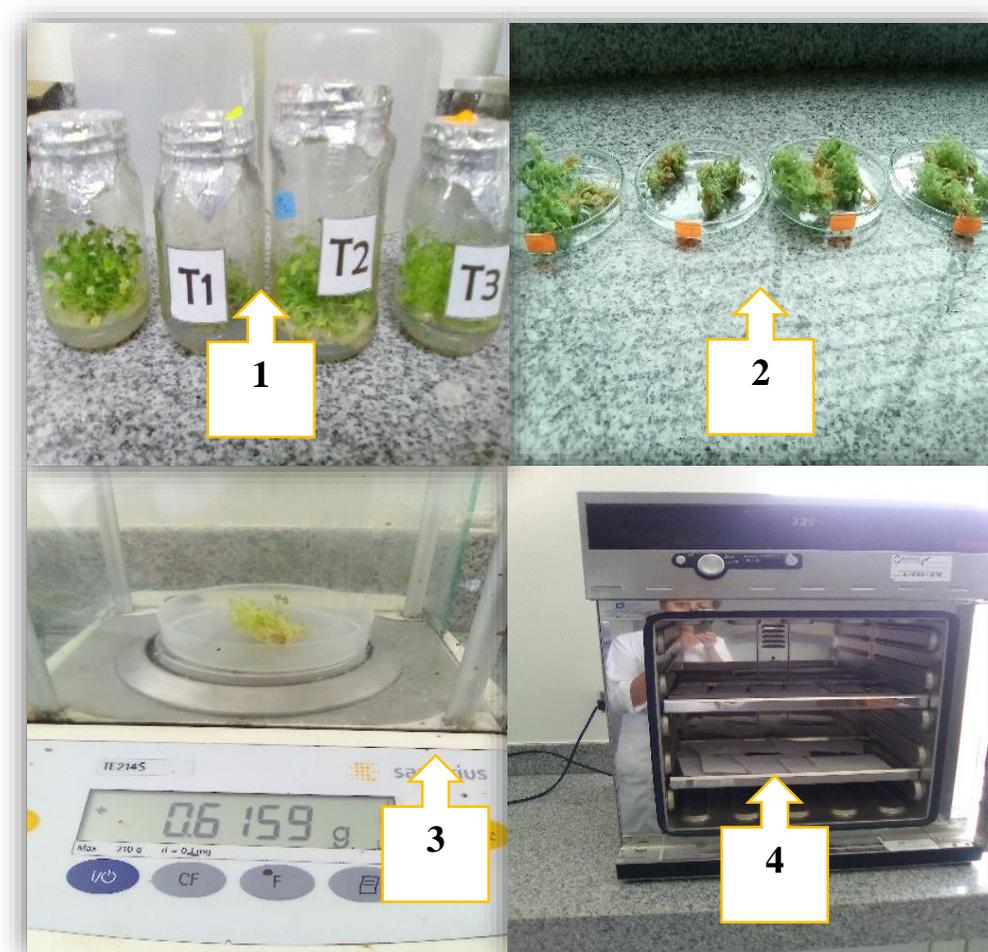


Figura 12: Procedimiento del secado de las plántulas.

Dónde: 1.plántulas en medio de multiplicación; 2.plantas lavadas; 3.pesado de plántula; 4.secado de plántulas.

3.6. Parámetros de evaluación

3.6.1. Tratamiento de desinfección

En esta parte de la investigación se hizo 4 evaluaciones cada 15 días durante 2 meses, con 4 tratamientos y 12 repeticiones, se trabajó en tubos de ensayo, teniendo los parámetros a evaluar:

- **Porcentaje de contaminación:** se considera cuando presenta algún agente patógeno junto al medio de cultivo o explante sembrado.
- **Porcentaje de Germinación de las semillas:** se considera germinación, cuando se observa semillas emergidas con hojas cotiledonales.

3.6.2. Tratamiento de inicio

De mismo modo en esta Fase de la investigación se probaron 4 tratamientos con 5 repeticiones, durante 1 mes con 4 evaluaciones cada 7 días. Los parámetros a evaluar:

- **Porcentaje de contaminación:** se considera contaminación, cuando se observa algún agente patógeno que puede perjudicar el crecimiento de las plántulas.
- **Efectividad de germinación:** se considera mayor porcentaje de germinación con un buen desarrollo de las plántulas.

3.6.3. Tratamiento de Multiplicación

Al igual que lo anterior en esta fase de la investigación se hicieron 4 evaluaciones cada 7 días durante 1 mes, con 4 tratamientos y 4 repeticiones; sembrados 5pt/frasco; Los parámetros a evaluar:

- **Altura de la planta:** se evaluó el crecimiento indeterminado de las plántulas, utilizando vernier.

- **Número de hoja:** se contabilizaron las hojas desarrolladas de las plántulas cada 7 días.
- **Número de raíz:** se contabilizaron la aparición de las raíces presentes de cada plántula.
- **Número de brotes:** se contabilizaron número de brotes de cada plántula.
- **Pelos urticantes del tallo:** se calculó el porcentaje de pelos urticantes de las plántulas de acuerdo a la altura de las plántulas.
- **Pelos urticantes de las hojas:** se calculó el porcentaje de pelos urticantes de acuerdo al número de hojas desarrolladas en las plántulas.
- **Pelos urticantes de la Raíz:** se calculó el porcentaje de pelos urticantes de acuerdo al número de raíz de las plántulas.
- **Peso de la planta en materia verde:** se pesaron las vitroplantas lavadas y escurridas.
- **Peso de la planta en materia seco:** se pesaron las vitroplantas secadas mediante una estufa.
- **Peso final de la planta:** se calcula la diferencia del peso fresco y seco.

3.7. Diseño de investigación

Este presente trabajo fue conducido con un Diseño Completamente al Azar (DCA), a un nivel de significación $\alpha = 0,05$. La comparación de los tratamientos de media se realizó mediante prueba de Tukey al 95% de confianza.

3.7.1. Tipos de Investigación

El tipo de investigación es aplicada experimental.

3.7.2. Modelo estadístico línea

En este modelo en valor de cada unidad experimental Y_{ij} ; se realiza el análisis de varianza para cada característica evaluada, según el modelo lineal aditivo siguiente:

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, t = N^\circ$ de Tratamientos

$j = 1, 2, \dots, r = N^\circ$ de Repeticiones

Dónde:

Y_{ij} = Es la observación de la i -ésimo tratamiento en el j -ésimo repeticiones.

u = Es la medía general del experimento.

T_i = Es el efecto de tratamiento.

e_{ij} = es el efecto del error experimental en el tratamiento.

Para la comparación de medías se empleará la prueba discriminatoria Tukey con un nivel de 0.05 de significativo.

Cuadro 11: Análisis de varianza del Diseño Completamente al Azar (DCA).

Fuente de Variación	Grados de Libertad (G.L)	Suma de Cuadrados (S.C)	Cuadrados Medios (C.M)	Cuadrados Medio Esperado
Tratamiento	(T - 1)	SCT	CMT	CMT/CME
Error	T (R - 1)	SCE	CME	
Total	(Tr - 1)	SCTotal		

Dónde:

T= Tratamientos.

R= Numero de Repeticiones.

SCT= Suma de Cuadrados de Tratamientos.

SCE= Suma de Cuadrados del Error.

CMT= Cuadrado Medio de los Tratamientos.

CME= Cuadrado Medio del Error.

F= Fisher

Siendo la hipótesis:

Ho: $\mu_{H1} = \mu_{H2}; i \neq j$

Ha: $\mu_{H1} \neq \mu_{H2};$ (Al menos una media es diferente).

$\alpha = 5\% - 1\%$

Para el análisis estadístico exacto se usó el software SAS V8.

3.7.3. Formulación de Hipótesis

H0: ninguna de las semillas introducidas de (*caiphora cirssifolia C.*); crecerán en medios para cultivo *in vitro*.

Ha: por lo menos uno de los tratamientos introducidas de (*Caiophora cirssifolia C.*); crecerán en medios para cultivo *in vitro*

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Tratamiento de desinfección

4.1.1. Contaminación de las plántulas

Se considera a los tubos con semillas contaminadas cuando estos han sido atacados por algún agente patógeno como (hongos o bacteria) que restringe su crecimiento de las plántulas, o en otros casos se puede observar en la superficie del medio del cultivo.

Cuadro 12: Porcentaje de contaminación y desinfección.

Trat.	Numero de tubos contaminados	Contaminación (%)	Desinfección (%)
D0	5	41.67	58.33
D1	2	16.67	83.33
D2	3	25.00	75.00
D3	4	33.33	66.67

Dónde: D = desinfección

De acuerdo con los resultados mostrados en la Cuadro 12 y la figura 13, el tratamiento que presenta menor porcentaje de contaminación es el tratamiento

(D1) con 16.67% de contaminación. Ver procedimiento de desinfección en el cuadro 5.

Se observa también que los tratamientos D2 y D3, tuvieron un éxito promedio en la desinfección *in vitro* de las semillas; sabiendo que D2 presentó 75 % y D3 con 66.67%, mientras que el tratamiento (D0) como testigo presento 58.33 % de desinfección. Todo parece indicar que el Tratamiento (D1) es el mejor con 83.33 %, pero como se expondrá a continuación los resultados de sobrevivencia. Nos ayudaran a elegir cual es el mejor tratamiento en la fase de Introducción *in vitro* de (*Caiohora cirsifolia C.*).

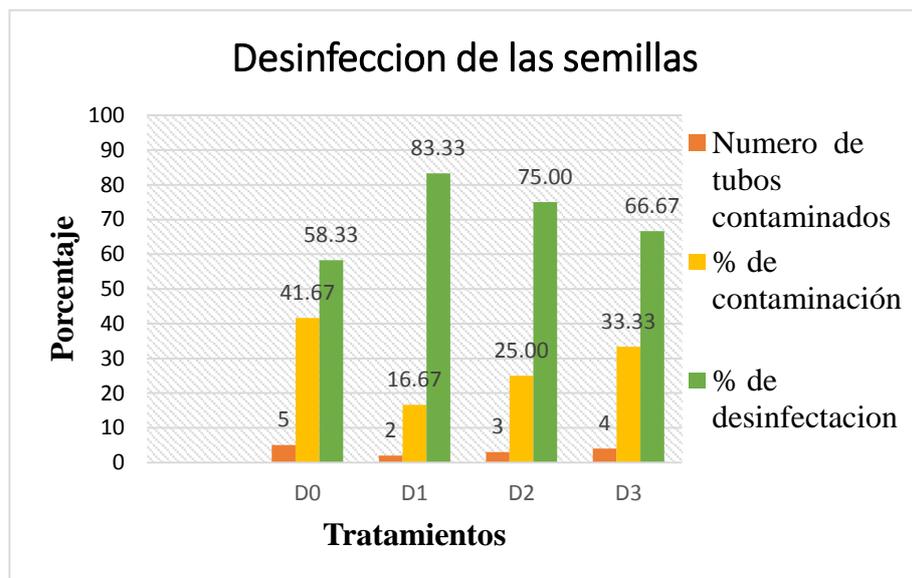


Figura 13: Tasa de contaminación y desinfección de las semillas introducidas.

Con estos resultados parciales se observa que a menor porcentaje y el tiempo de exposición de las semillas en hipoclorito de sodio fueron favorables. El uso de alcohol al 70° e hipoclorito de sodio fue de bastante ayuda para controlar la presencia de hongos y bacterias. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las semillas utilizadas fueron de capsulas cerradas. Aun así se pudo observar semillas

contaminadas, esto se debe a varios factores como ambiente, manipulación, hongos y bacterias innatos propia de la planta. Los agentes patógenos observados durante las evaluaciones fueron hongos y bacterias; cabe resaltar que los hongos fueron los que contaminaron con mayor frecuencia.

La concentración de hipoclorito de sodio del tratamiento (D1) utilizado en la presente investigación. Se encuentra dentro del rango propuesto por (Roca, W.; Mogrinski, L., 1991), que mencionan que el Hipoclorito de sodio en concentraciones de 1 % a 3% es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante; y no produce lesiones profundas en los tejidos vegetales debido a su acción blanqueadora en los explantes de muchas especies vegetales.

La contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro*. (Ramírez, Y. et al., 2011).

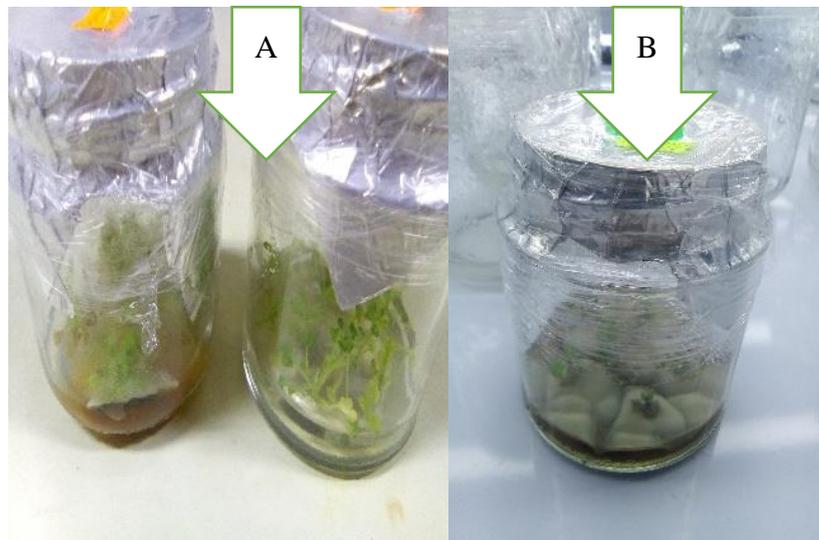


Figura 14: Plántulas de contaminadas

Dónde: A = Hongos y B = Bacterias.

4.1.2. Germinación de semillas

En el cuadro 13 y la figura 15 se pueden observar los resultados obtenidos para la germinación de las semillas introducidas de (*Caiophora cirsiifolia C.*), mostrando que en los cuatro tratamientos se obtuvo menos del 50 % de germinación.

Cuadro 13: Porcentaje Germinación de las semillas de Ortiga Colorada.

Tratamiento	Numero de semillas germinadas	Semillas germinadas (%)
D0	2	16.67
D1	4	33.33
D2	3	25.00
D3	4	33.33

El análisis estadístico se hizo teniendo en cuenta los datos evaluados en el Anexo 2, tomando la progresividad de los resultados obtenidos en la investigación.

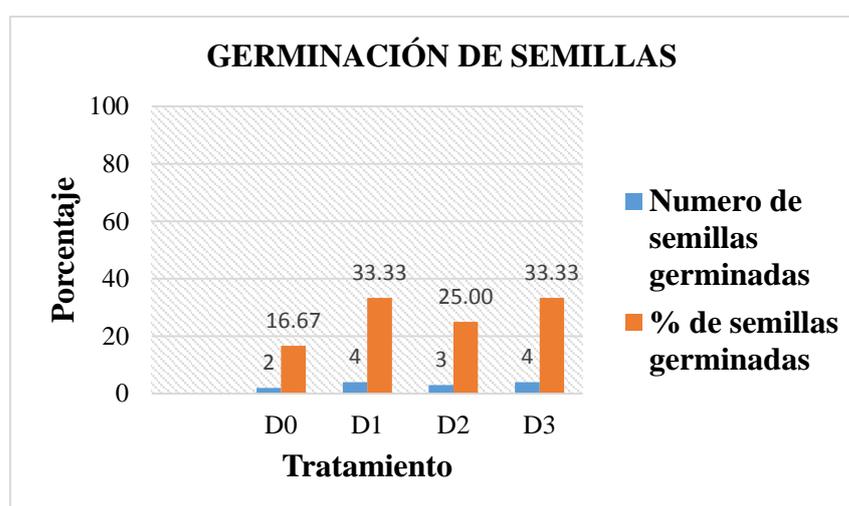


Figura 15: Grafico de barras de Porcentaje de germinación de semillas.

Los tratamientos (D1 y D3), fueron que presentaron mayor porcentaje de germinación de las semillas con 33.33%, mientras que el tratamiento D2 con 25

% de germinación, a comparación del tratamiento (D0) con 16.67 %, este último fue planteado como testigo.

No habiendo investigaciones en cultivo *in vitro* de esta especie se concluye, los factores limitantes que puede influenciar en la germinación de las semillas es la viabilidad; teniendo en cuenta la fisiología del estado de dormancia o dormición de las semillas, Por lo tanto, existe la necesidad de realizar estudios sobre este caso. Un punto importante lo constituye el hecho de que existen escasos (a nulos) estudios sobre la propagación *in vitro* de esta especie nativa.

Los factores físicos también juegan un rol determinante en el establecimiento de los explantes. La luz y la temperatura han sido factores ampliamente estudiados, que influye en la germinación de las semillas., (Roca, W. y Mroginski., 1991).

La incubación de los explantes se hace en una sala que debe ser de acceso restringido, el área de incubación debe proporcionar condiciones adecuadas en cuanto a temperatura, luz y humedad relativa. (Seemann, 1993).

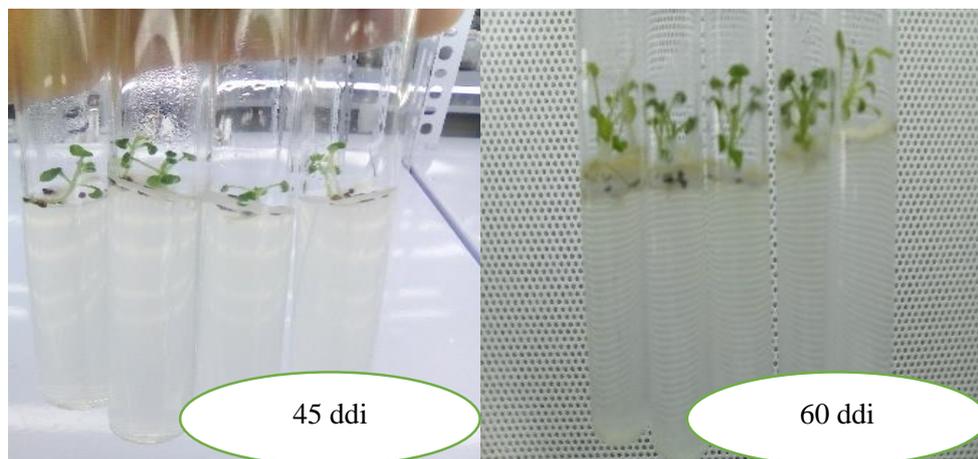


Figura 16: Germinación de semillas de (*Caiophora cirsiifolia* C.).

Dónde: ddi = días después de la introducción.

4.1.3. Eficiencia de desinfección

Analizando los tratamientos evaluados de cuadro 14 y Figura 17; el mejor tratamiento para esta fase de desinfección es el Tratamiento D1 con tan solo 16.67 % de contaminación y 33.33% de germinación.

Cuadro 14: Porcentaje de germinación y contaminación de (*Caiophora cirsiifolia*).

Tratamientos	Semillas germinadas (%)	Contaminación (%)
D0	16.67	41.67
D1	33.33	16.67
D2	25	25
D3	33.33	33.33

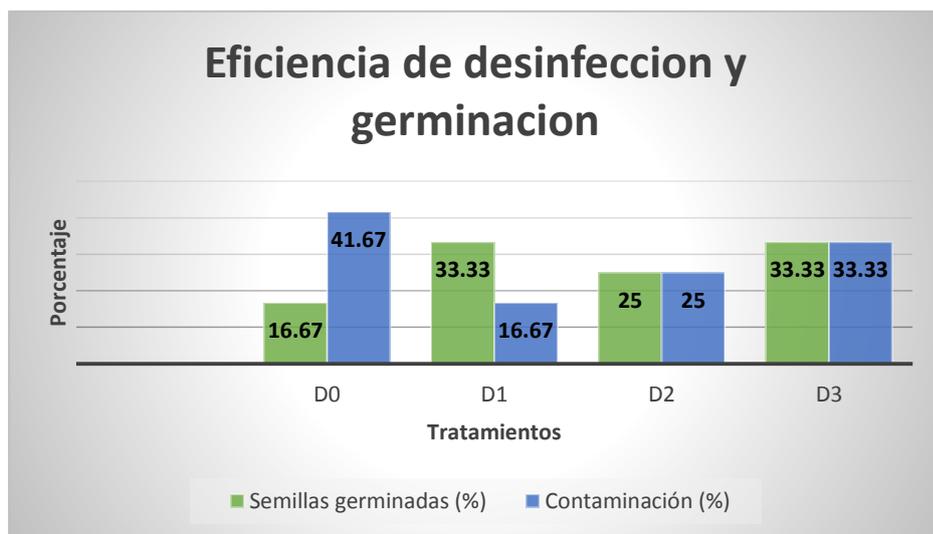


Figura 17: Grafico de barras de eficiencia de desinfección y germinación de (*Caiophora cirsiifolia*).

En cuanto a la eficiencia de la desinfección y germinación, se obtuvo que el tratamiento D1 presentó mejor respuesta con 33.33% de germinación y 16.67% de contaminación frente a los demás tratamientos que presentaron porcentajes superiores.

Se explica que la germinación y supervivencia de las semillas respecto al proceso de desinfección presentan capacidad potencial en el desarrollo de las plántulas. Por tener tejidos sin muestra de deterioro. (Ramos, 2012).

4.2. Tratamiento de inicio o introducción

Una vez obtenido los resultados de la desinfección del explante en un medio de MS básico, observamos que las semillas tardaron en germinar debido a la dormancia de las semillas en esta especie, sabiendo este inconveniente se planteó medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento.

4.2.1. Porcentaje de germinación y contaminación

De acuerdo con los datos evaluados en el anexo 3, de porcentaje de contaminación y germinación de las semillas de (*Caiopora cirsiifolia C.*); se tomaron los datos de la última fecha para el análisis estadístico.

Cuadro 15: Porcentaje de Contaminación y Germinación de semillas

Trat	NfrasC	%frasC	NsemG	%semG
I0	1	25	7	11.67
I1	1	25	14	23.33
I2	0	0	14	23.33
I3	1	25	37	61.67

Dónde: I = Tratamiento de Inicio.

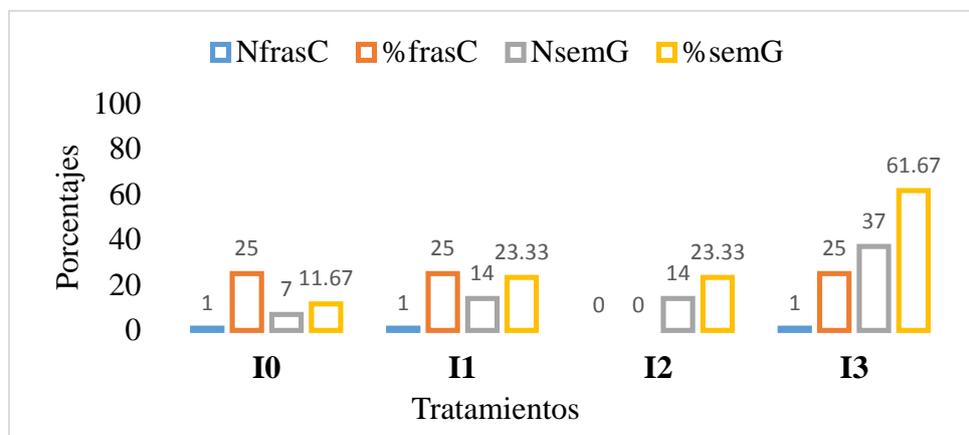


Figura 18: Gráfico de barras de Porcentaje de contaminación y germinación en la fase de inicio.

Los resultados obtenidos para la desinfección en los tratamientos (I0, I1, I3) del porcentaje de contaminación coinciden con un 25%, a comparación de I2 no se observa ninguna contaminación; se deduce que la contaminación es por el factor del ambiente.

Además en esta etapa de la investigación se tomaron el protocolo de desinfección estandarizado en la primera fase de nuestra investigación; a continuación, se observa el análisis estadístico para esta variable.

Cuadro 16: ANOVA para número de semillas germinadas en la fase de inicio.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	102.8000	34.2667	4.35	0.0201
Error	16	126.0000	7.8750		
Total	19	228.8000			

$$S = 2.81; R^2 = 0.45; CV = 77.95\%; X = 3.60$$

Los resultados de porcentaje de germinación de semillas de (*Caiophora cirsiifolia* C.), en el cuadro 16; Se muestra el análisis de varianza para número de semillas germinadas, siendo el P-valor menor a 0.05, decimos que, si hay diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, entonces por lo menos uno de los tratamientos difiere de los demás, siendo el CV muy alto sometimos a un ajuste de varianza.

Cuadro 17: ANOVA ajustado para número de semillas germinadas en la fase de inicio.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	4.4473	1.4824	3.05	0.0588
Error	16	7.7706	0.4857		
Total	19	12.2180			

$$S = 0.69; R^2 = 0.36; CV = 34.89\%; X = 1.99$$

De acuerdo al resultado de coeficiente de varianza ajustado nos indica que la investigación es heterogeneidad en porcentaje de germinación de las semillas.

Para confirmar si la investigación es normal se sometió a la prueba de homogeneidad, de Bartlett's $pr > \chi^2 = 0.2033$, siendo el valor mayor que 0.05 nos quiere decir que hay homogeneidad de varianza; por lo tanto, nos indica que la investigación es normal.

Para determinar la diferencia de tratamientos se realizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza, lo cual arrojó lo siguiente:

$$\text{Prueba de Tukey Alfa} = 0.05; \text{DMS} = 3.723$$

$$\text{Cuadrado medio del error} = 3.145833; \text{gl} = 12$$

$$\text{Valor crítico del rango} = 4.19852$$

Cuadro 18: Prueba de Tukey de numero de semillas germinadas.

Tratamientos	N	Medias	Nivel de significativo
I3	5	7.4000	A
I2	5	2.800	A - B
I1	5	2.800	A - B
I0	5	1.400	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Cuadro 9 indica detalladamente los componentes de los medios tratamientos de inicio, por lo que en la siguiente interpretaremos de manera resumida.

Los tratamientos (I3, I2 e I1), no presentan diferencias significativas, al igual que (I2, I1 e I0), mientras que el I0 compuesto por M&S, presenta el menor valor de media.

De acuerdo con los resultados el tratamiento (I3) compuesto por (MS +2mg/l de AG3) resulto más efectivo con 7.4 % de germinación. Siendo el AG3 la hormona que activa el embrión, favoreciendo el buen porcentaje de germinación de las semillas.

En algunas variables de las especies estudiadas se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre los medios de cultivo, las cuales se deben, posiblemente, a los cambios en las composiciones especialmente en los reguladores de crecimiento, lo que puede ser de utilidad para obviar efectos de genotipo (Roca, W. y Mroginski., 1991).

Corroborando a esto (Salinas, A. R., et al., 2002), el ácido giberélico (AG₃) activa el crecimiento vegetativo del embrión durante la germinación y promueve la producción o secreción de enzimas hidrolíticas principalmente α -amilasa, enzima involucrada en la solubilización de las reservas del endospermo.

4.3. Tratamiento de multiplicación

Al no existir estudios recientes del cultivo *in vitro* en esta especie, es importante probar con medios de cultivo relacionados a otras especies para determinar su eficiencia con el desarrollo de las plántulas de (*Caiophora cirsiifolia* C.).

Para el análisis estadístico de las variables evaluadas se utilizaron los datos de la última fecha de evaluación, tomando en cuenta las variables evaluadas en el Anexo 5.

A continuación se muestra, los análisis detallados para cada variable:

4.3.1. Altura de las plántulas

En el cuadro 19 se observa el análisis de varianza para el número de hojas a los 28 días en la fase de multiplicación de (*Caiophora cirsiifolia C.*), siendo el nivel de significancia menor a 0.05 nos indica que hay diferencias significativas entre los cuatro tratamientos propuestos.

Cuadro 19: ANOVA para altura de plantas en la fase de multiplicación.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	1.5819	0.5272	5.69	0.0117
Error	12	1.1125	0.0927		
Total	15	2.6944			

$$S = 0.30; R^2 = 0.59; CV = 17.21; X = 1.77$$

De acuerdo con el análisis de varianza arrojado el p-valor es menor que 0.05, esto indica que, si hay diferencia significativa entre los tratamientos probados en esta fase de la investigación, entonces por lo menos uno de los medios de cultivo es diferente a los otros.

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados:

$$\text{Prueba de Tukey Alfa} = 0.05; \text{DMS} = 0.6392$$

$$\text{Cuadrado medio del error} = 0.092708; \text{gl} = 12$$

$$\text{Valor crítico del rango} = 4.19852$$

Cuadro 20: Prueba de Tukey para longitud promedio de las plántulas.

Tratamiento	N	Medias	Nivel de significativo
MM3	4	2.2750	A
MM2	4	1.7500	A– B
MM0	4	1.6250	B
MM1	4	1.4250	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 05$).

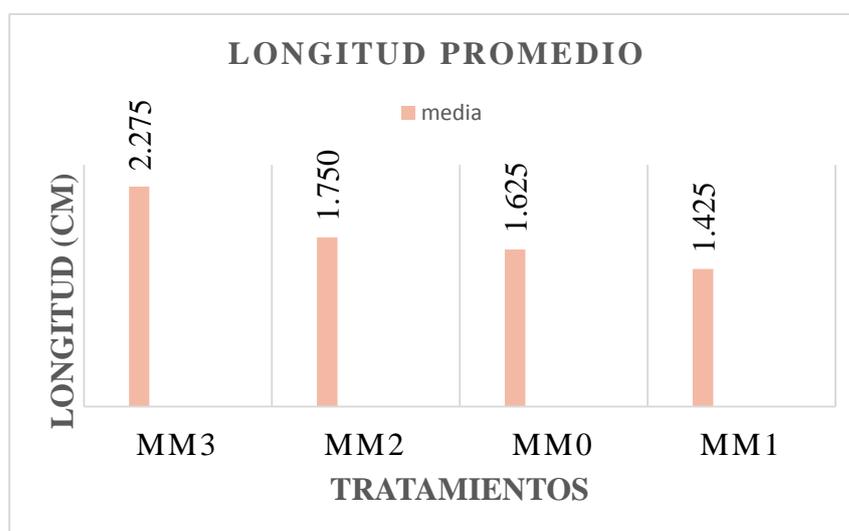


Figura 19: Gráfico de barras de Longitud promedio (cm) de plántulas.

Los tratamientos entre MM3 y MM2 no presentan diferencias significativas, al igual MM2, MM0 y MM1, mientras que MM2 al presentar el valor intermedio no difiere de los otros tratamientos.

Los resultados obtenidos respecto a la altura de las plántulas de (*Caiophora cirsifolia* C.), como se observa en la figura 19, el tratamiento (MM3), que consistió en MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3, fue el medio de cultivo en el que mejor resultado arrojó. A comparación la diferencia MM2, que consistió en MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA, y MM0 que consistió en M&S, la diferencia entre los dos tratamientos fue de 0.125 considerado una diferencia mínima; mientras que MM1 que consistió en MS + 0.5 mg/L BAP,

presento el promedio más bajo, en comparación con los demás tratamientos los resultados obtenidos presentan promedios de longitud de vástagos que van desde 1.4250 cm y 2.275 cm.

En alguna de sus investigaciones (Ramage, C.; Williams, R., 2002), condujeron experimentos donde se omitían ciertos nutrientes de los medios de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales y encontraron que al omitir nitrógeno, potasio, fósforo, hierro y cloro el crecimiento del explante se redujo enormemente.

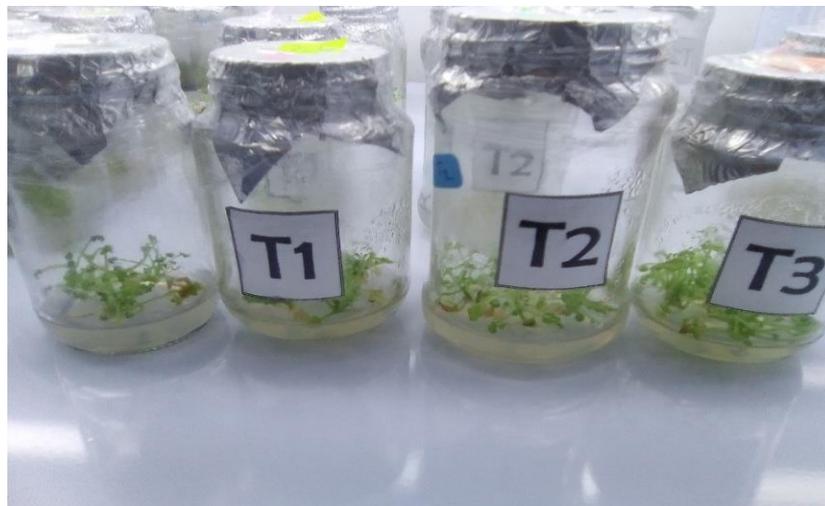


Figura 20: Plántulas *in vitro* de (*Caiophora cirsiifolia* C.) en los 4 tratamientos de medio de cultivo.

4.3.2. Número de hojas

Para el análisis estadístico de esta variable se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis.

El paquete estadístico trabajado para los análisis no paramétricos se utilizó Infostat 2018.

Cuadro 21: Prueba de Kruskal-Wallis para número de hojas.

Variable	Trat.	Rep	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Nhojas	MM0	4	7.50	1.00	8.00	6.47	0.0449
Nhojas	MM1	4	7.00	1.15	7.00		
Nhojas	MM2	4	8.50	1.00	8.00		
Nhojas	MM3	4	9.50	1.00	10.00		

Cuadro 22: comparación de medias para número de hojas.

Trat.	Medias	Rangos		
MM1	7.00	5.00	A	
MM0	7.50	6.50	A	B
MM2	8.50	9.63	A	B
MM3	9.50	12.88		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo al análisis de kruskal-wallis en el cuadro 22 y Figura 21, los tratamientos MM1, MM0 y MM2 presentan diferencias significativas, al igual que MM0, MM2 y MM3; teniendo en cuenta que MM0 y MM2 no difieren de los otros; siendo el p-valor menor que 0,05, se rechaza la hipótesis nula aceptando la hipótesis alterna.

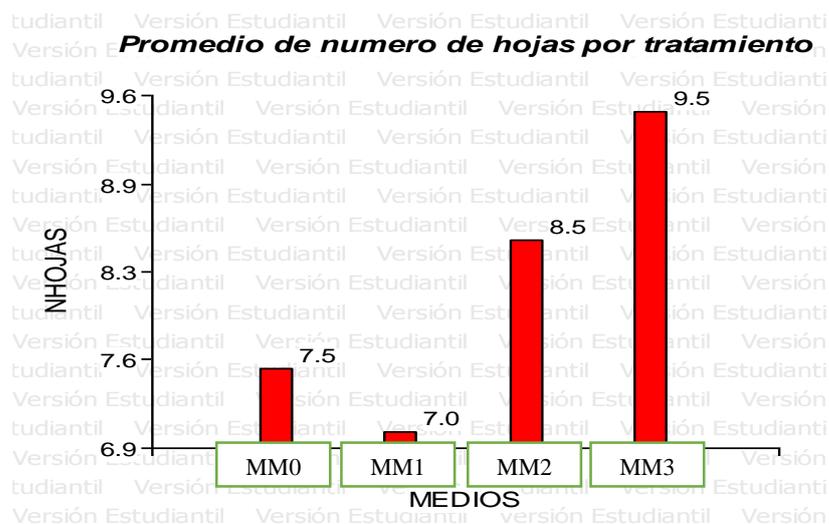


Figura 21: Gráfico de barras de promedio de hojas.

De acuerdo al Figura 21, el tratamiento MM3 es el mejor tratamiento que difiere significativamente ante los demás, al igual que MM1 con el valor más bajo difiere significativamente.

En el tratamiento MM0 los números de hojas observadas fueron escasos; mientras que MM1 y MM2 podemos deducir que planta no tolera el uso de las hormonas adicionados en los tratamientos. Como bien se conoce, las hormonas contribuyen la formación de nuevas hojas y desarrollo de la planta.

El número de hojas producido por el explante se ve afectado por la falta de ciertos minerales, la modificación de los elementos como nitrógeno, fósforo y potasio en la composición de los medios basales reduce el número de hojas. (Ramage, C.; Williams, R., 2002),

Se observó que el desarrollo foliar de las plántulas de (*Caiophora cirsiifolia C.*) fue relativamente rápido, en el medio de cultivo MM3, compuesto por (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3); Cabe recalcar que en este tratamiento se emplearon en mayor proporción los reguladores de crecimiento en comparación de MM1 (MS + 0.5 mg/L BAP) Y MM2 (MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA); y en caso de MM0 (MS testigo); no se emplearon ningún tipo de reguladores de crecimiento.

4.3.3. Número de Raíz

Para la variable número de raíces. También se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis.

El paquete estadístico trabajado para los análisis no paramétricos se utilizó Infostat 2018.

Cuadro 23: Prueba de Kruskal-Wallis para el número de raíces.

Variable	Trat.	Rep.	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Nraiz	MM0	4	1.50	0.58	1.50	8.01	0.0260
Nraiz	MM1	4	0.75	0.50	1.00		
Nraiz	MM2	4	1.50	0.58	1.50		
Nraiz	MM3	4	2.50	0.58	2.50		

Cuadro 24: comparación de medias para Numero de raíces.

Trat.	Medias	Rangos		
MM1	0.75	4.00	A	
MM2	1.50	8.25	A	B
MM0	1.50	8.25	A	B
MM3	2.50	13.50		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo al cuadro 23 y figura 22, el p-valor resulto menor que 0.05, entonces quiere decir estadísticamente si hay diferencias significativamente entre los tratamientos.

Según el cuadro 24, se interpreta la diferencia de medias. Los tratamientos MM1, MM2 y MM0 no presentan diferencias significativas, al igual que MM2, MM0 y MM3; a comparación MM2 y MM0 no difieren de los demás.

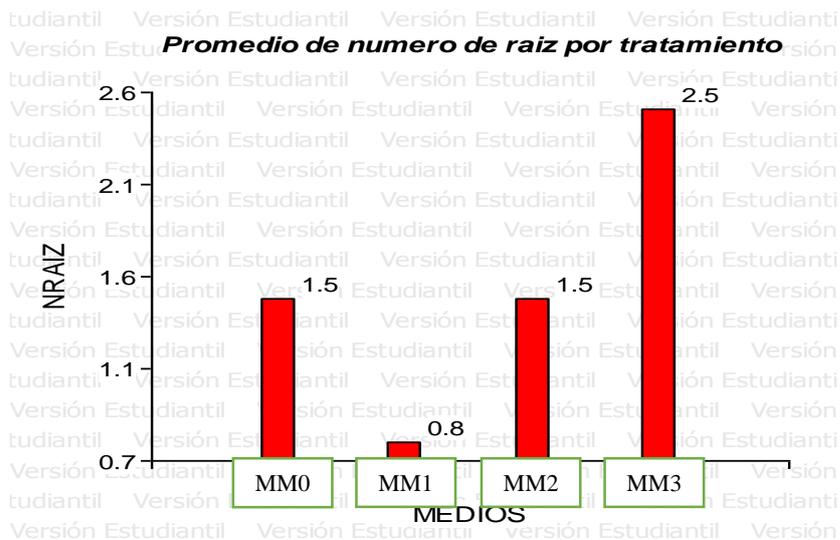


Figura 22: Gráfico de barras de promedio de número de raíz.

De acuerdo al análisis estadístico el mejor tratamiento que incentivo la formación de raíces es el tratamiento MM3 compuesto por (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3).

En esta especie no hay necesidad de plantear tratamientos de enraizamiento; las plántulas enraizaron a la par en la etapa de multiplicación.

Coincidiendo los resultados obtenidos afirma que algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Roca, W. y M. Mroginski. , 1991).

4.3.4. Número de Brotes

Para la variable número de brotes. Se empleó la prueba de estadística no paramétrica de Kruskal – Wallis.

El paquete estadístico trabajado para los análisis no paramétricos se utilizó Infostat 2018.

Cuadro 25: Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes.

Variable	Trat.	Rep.	Medias	D.E	Medianas	H	p
NBROTOS	MM0	4	2.75	0.96	2.50	8.29	0.0344
NBROTOS	MM1	4	1.75	0.96	1.50		
NBROTOS	MM2	4	2.50	1.29	2.50		
NBROTOS	MM3	4	4.75	0.96	4.50		

Cuadro 26: comparación de medias para número de brotes.

Trat.	Medias	Rangos	
MM1	1.75	4.63	A
MM2	2.50	7.25	A
MM0	2.75	8.13	A B
MM3	4.75	14.00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo con los resultados en el cuadro 25, el p-valor es menor que 0.05; entonces quiere decir estadísticamente si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Según la comparación de medias en el cuadro 26, los tratamientos MM1, MM2 y MM0 no presentan diferencias significativas, al igual que MM0 y MM3. Además MM0 no difiere de los otros tratamientos

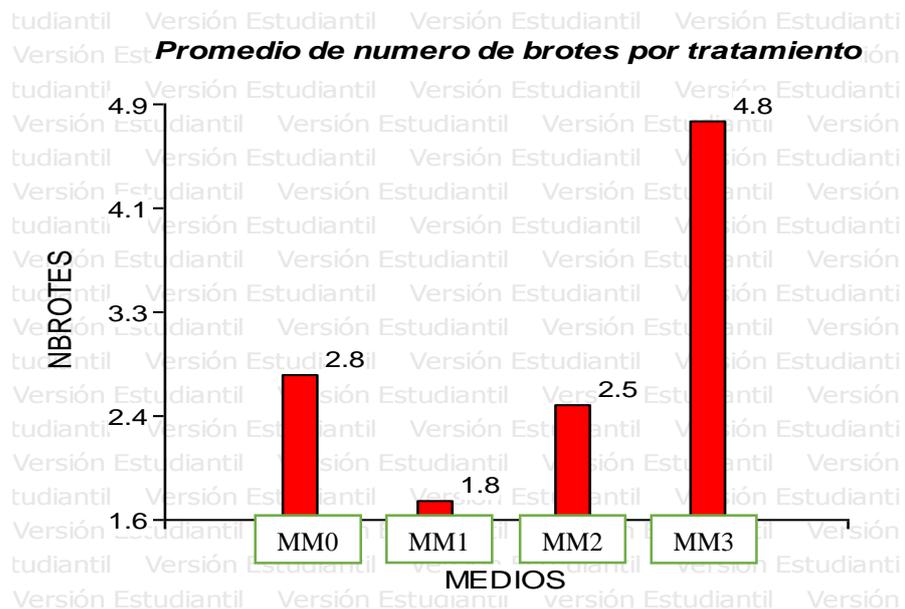


Figura 23: Gráfico de barras de promedio de brotes.

El tratamiento que mejor resultado arrojó es el tratamiento MM3 compuesto plántulas es el tratamiento MM compuesto por (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L

ANA+ 0.2mg/L AG3); mientras que el tratamiento MM1 es el tratamiento con baja efectividad para la formación de brotes. Este último se deduce que podría ser la utilidad de tan solo 1 tipo de hormona.

El resultado del número de brotes y el coeficiente de multiplicación se tiene en cuenta el tipo de explante y la concentración de BAP. (Barba, 2001).

4.3.5. Porcentaje de pelos urticantes en las raíces

Para el análisis estadístico se tomaron los datos de evaluación de la última fecha. De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos en los cuadros 27, el resultado arrojado de p-valor es menor que 0.05 Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula aceptando la hipótesis alterna; esto quiere decir que al menos uno de los tratamientos difiere de los demás.

Cuadro 27: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en la raíz.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	2475.0000	825.0000	6.60	0.0070
Error	12	1500.0000	125.0000		
Total	15	3975.0000			

$$S = 11.18; R^2 = 0.62; CV = 35.78; X = 31.25$$

Según el resultado arrojado del ANOVA el CV es muy alto de lo debido, esto se debe a que nuestros datos evaluados números pequeños; por lo tanto a continuación se muestra el ANOVA ajustado.

Cuadro 28: ANOVA Ajustado para porcentaje de pelos urticantes en la raíz.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	0.3833	0.1278	5.12	0.0165
Error	12	0.2995	0.0249		
Total	15	0.6828			

$$S = 0.16; R^2 = 0.56; CV = 27.70; X = 0.57$$

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza, lo cual arrojó los siguientes resultados:

Prueba de Tukey Alfa = 0.05; DMS = 23.47

Cuadrado medio del error = 125; gl = 12

Valor crítico del rango = 4.19852

Cuadro 29: Prueba de Tukey de porcentaje de pelos urticantes en la raíz.

Tratamientos	N	Medias	Nivel de significativo
MM3	4	50.00	A
MM0	4	30.00	A – B
MM2	4	30.00	A – B
MM1	4	15.00	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

De acuerdo con los resultados de la prueba de medias de Tukey, los tratamientos MM3, MM0 y MM2 no presentan diferencias significativas, al igual que MM0, MM2 y MM1; mientras que MM2 y MM0 no difieren de los demás.

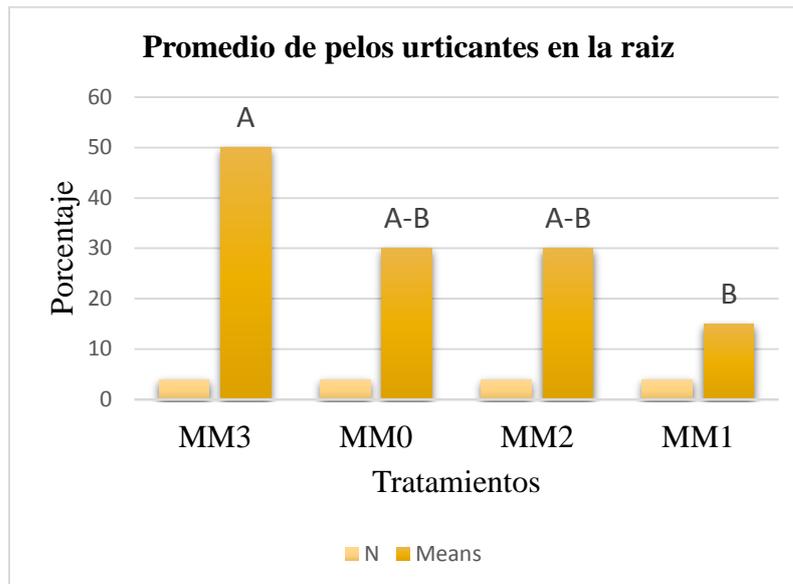


Figura 24: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en la raíz.

Según el análisis estadístico, el mejor tratamiento para esta variable es el tratamiento MM3 que significativamente diferente que los demás. Esto explica que el uso de hormonas de crecimiento es lo esencial para el buen del desarrollo de los pelos urticantes en las raíces.

No habiendo investigación en plantas *in vitro* de esta especie; los pelos urticantes característico en las ortigas que posee pelos aguzados hueco que se asienta sobre una glándula que secreta un fluido con agua toxica; por lo tanto en la presente investigación se observó en las plántulas *in vitro* de (*Caiohora cirsiifolia*).

4.3.6. Porcentaje de pelos urticantes en los tallos

De acuerdo los resultados de ANOVA para esta variable en el cuadro 30, el p-valor es menor que 0.05, entonces nos quiere decir que si hay diferencias significativas entre los cuatro tratamientos.

Cuadro 30: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en el tallo.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	632.7500	210.9167	5.69	0.0117
Error	12	445.0000	37.0833		
Total	15	1077.7500			

$$S = 6.09; R^2 = 0.59; \quad CV = 17.21; \quad X = 35.38$$

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza, lo cual arrojó los siguientes resultados:

Prueba de Tukey Alfa = 0.05; DMS = 12.784

Cuadrado medio del error = 37.08333; gl = 12

Valor crítico del rango = 4.19852

Cuadro 31: Prueba de Tukey para Porcentaje de pelos urticantes en los tallos.

Tratamientos	N	Medias	Nivel de significativo
MM3	4	45.500	A
MM2	4	35.00	A – B
MM0	4	32.500	B
MM1	4	28.500	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

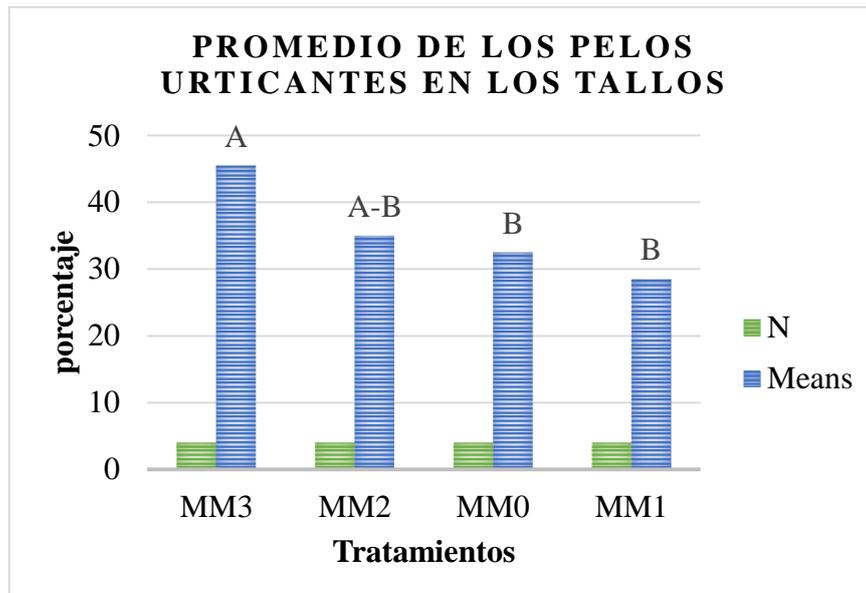


Figura 25: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en la raíz.

De acuerdo a los resultados arrojados en el cuadro 31, el p-valor es menor que 0.05, por lo tanto nos indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos propuestos para el desarrollo de pelos urticantes en los tallos.

Según los resultados arrojados de comparación de Medias en el cuadro 31 y figura 25; los tratamientos MM3 y MM2 no presentan diferencias significativas, al igual que MM2, MM0 y MM1. Mientras que MM2 es el tratamiento que no difiere entre los demás; cabe resaltar que el tratamiento MM3 es mejor tratamiento con una diferencia significativa ante lo demás. Esto arroja el resultado óptimo para el buen desarrollo de los pelos urticantes en los tallos; en este tratamiento se empleó las tres hormonas de principal importancia para el buen desarrollo de las plántulas.

4.3.7. Porcentaje de pelos urticantes en las hojas

De acuerdo al análisis de varianza en el cuadro 32, el p-valores menor a 0.05, se explica que hay diferencias significativamente en producción de pelos urticantes en las hojas entre los tratamiento.

Cuadro 32: ANOVA para porcentaje de pelos urticantes en las hojas.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor - F	Pr > F
Modelo	3	1458.0000	486.0001	4.67	0.0220
Error	12	1249.9168	104.1597		
Total	15	2707.9168			

S = 10.21; R² = 0.54; CV = 14.84; X = 68.75

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza, lo cual arrojó los siguientes resultados:

Prueba de Tukey Alfa = 0.05; DMS = 21.425

Cuadrado medio del error = 104.1597; gl = 12

Valor crítico del rango = 4.19852

Cuadro 33: Prueba de Tukey para Porcentaje de pelos urticantes en las hojas.

Tratamientos	N	Medias	Nivel de Significativo
MM3	4	83.333	A
MM2	4	70.835	A - B
MM0	4	62.503	A - B
MM1	4	58.335	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

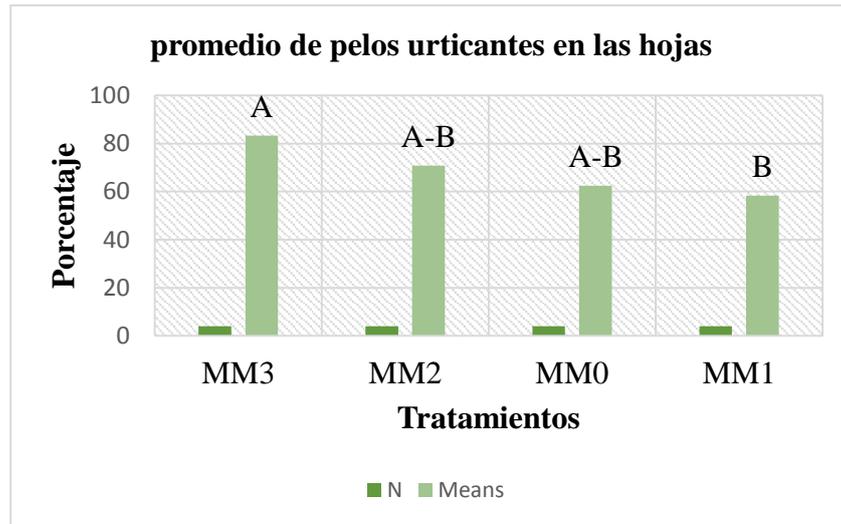


Figura 26: Gráfico de barras de promedio de porcentajes de pelos urticantes en las hojas.

De acuerdo con los resultados mostrados del análisis estadístico en el cuadro 33, el p-valor es menor que 0.05 nos indica que hay diferencias significativas en el desarrollo de pelos urticantes en las hojas de las plántulas de (*Caiophora cirsiifolia C.*), en los tratamientos propuestos.

Se observa en la figura 26, los tratamientos MM3, MM2 y MM0, no presentan diferencias significativas, al igual que MM2, MM0 y MM1. Mientras MM2 y MM0 no difieren ante los otros tratamientos.

El mejor tratamiento para esta variable es MM3 con 83.33% de pelos urticantes en las hojas.

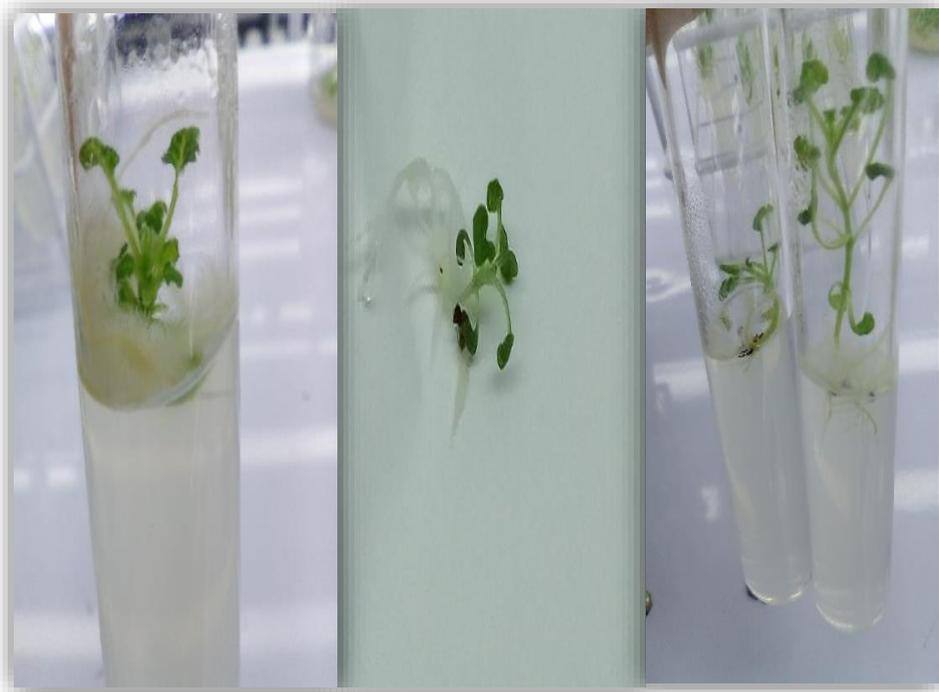


Figura 27: porcentaje de pelos urticantes en raíces, tallo y hojas de (*Caiofhora cirsiifolia C.*).

4.3.8. Peso fresco y peso seco de las plántulas *in vitro*

Respectivamente observamos el p-valor de cada variable analizada, se muestran mayores de 0.05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula esto nos indica que todos los tratamientos son iguales.

Según las pruebas de Tukey, del peso fresco, seco y peso final de las plántulas, nos indica que no hay diferencia entre los cuatro tratamientos.

Cuadro 34: Prueba de Tukey de peso fresco, seco y peso final

Tratamiento	Peso fresco	NS	Peso Seco	NS	Peso Final	NS
MM2	1.1610	A	0.1036	A	1.0574	A
MM3	0.7946	A	0.06542	A	0.7292	A
MM1	0.7705	A	0.0648	A	0.7057	A
MM0	0.6751	A	0.0567	A	0.6184	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

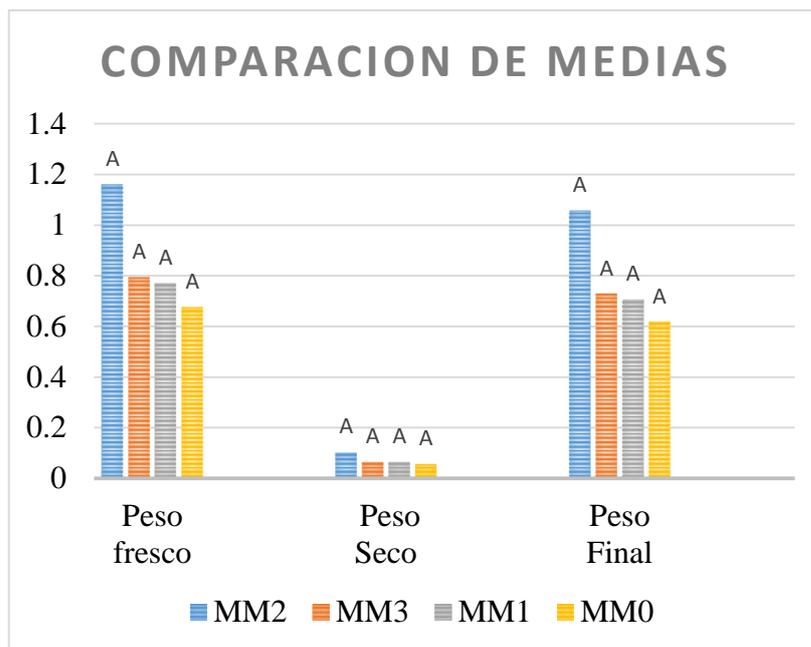


Figura 28: Gráfico de barras de diferencia de medias de peso fresco, seco y peso final de (*Caiophora cirsiifolia C.*).

De acuerdo con los resultados estadísticos arrojados del análisis de varianza en los anexos (13,14 y 15), correspondiente a los análisis de varianza de peso fresco, peso seco y peso final.

Se muestra el p-valor mayor que 0.05, entonces esto nos indica que aceptamos la hipótesis nula, y rechazamos la hipótesis alterna. Quiere decir no hay diferencias significativas en los tratamientos propuestos para esta variable.

De tal forma analizamos la comparación de prueba de medias, mediante la prueba de Tukey a 95 % de confianza.

Entre las variables peso fresco, peso seco y peso final, estadísticamente no hay diferencias significativas; todos los tratamientos planteados son iguales.

CONCLUSIONES

1. Se determinó el mejor protocolo de desinfección para estandarizar el protocolo *in vitro* del cultivo de ortiga colorada (*Caiophora cirsiifolia C.*), se obtuvo con el tratamiento D1 que consistió en sumergir las semillas envueltas con gasa en Benlate 1 g/100ml de agua por 5 minutos, seguido por 4 enjuagues y dentro de cámara pasamos por alcohol de 70° por 3 segundos posteriormente se sumergió en hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, finalmente se enjuago cuatro veces con agua destilada estéril.
2. El mejor medio de cultivo *in vitro* para la etapa de establecimiento fue el tratamiento MM3 compuesto (MS + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA+ 0.2mg/L AG3), agregándole a esto 30gr/l de azúcar con ajuste pH de 5.7; luego se agregó 7.2gr/l de agar – agar, la concentración del agente gelificante depende de la marca utilizada; con este tratamiento se logró el buen desarrollo de las plántulas *in vitro* del cultivo de ortiga colorada (*Caiophora cirsiifolia C.*); con promedios aceptables, altura de planta (2.275 cm), numero de hoja (10), numero de brotes (5), pelos urticantes en raíz (50%), tallo (45.5%), hojas (79.17%), además de presentar explantes vigorosos.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar en la etapa de desinfección porcentajes de NaClO menores de 1.5 % y aun tiempo no mayor de 5 minutos, se observa que nuestras semillas desinfectadas en estos tratamientos resultaron mejor.
2. Realizar un ajuste de balance en el uso de las fitohormonas, como la aplicación de otras citoquininas, auxinas y AG3 en la etapa de multiplicación *in vitro*, para aumentar la tasa de germinación y multiplicación y comprobar si producen mejores resultados que los obtenidos en la presente investigación.
3. Adecuar la sala de incubación a una temperatura no mayor de 22 ° C, 16 horas en luz y 8 horas nocturnas, teniendo en cuenta la proveniencia de esta especie son de climas fríos.
4. Continuar la investigación sobre las etapa de enraizamiento y aclimatación de explantes de ortiga colorada (*Caiophora cirsiifolia C.I*); para ello puede tomar como referencia los resultados obtenidos en la presente investigación.
5. Continuar la investigación para obtener protocolo de medios de conservación *in vitro*, ya que esta especie de planta está en extinción.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann y Weigend. (2006). Morfología Floral y polinización en Loasaceae. *scielo*, 11 - 12.
- Albán J.A. (1985). *Un registro de datos etnobotánicos. Boletín de Lima*. 7(39): 93-96.
- Alban, J. (1985). Un Registro de Datos Etnobotánicos. *Boletín de Lima*. 7(39).
- Alicia M, et al. (2010). *plantas trepadoras epifitas y parasitas nativas de Chile*. Chile.
- Apaza., E. A. (2017). Tesis: Lic., Blgo. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESCENCIALES DE *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS *Staphylococcus aureus* Y SU TOXICIDAD EN *Artemia salina*. 21-24.
- Barba, A. et al. (2001.). *Micropropagación de plantas. Distrito Federal de México, MX. Trillas*. 107 p.
- Barba, e. a. (2001). *Micropropagación de plantas. Distrito Federal de Mexico, MX*.
- Blanca León et al. (2006). Loasaceae endémicas del Perú. *Revista Perú Biólogos*, 13(1).
- Brako, L. y Zarucchi, J.L. (1996). *Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 45:1- 1286.
- Calderon, A. et al. (1995). *Metodos asepticos de propagación in vitro. Lab. de Fisiología Vegetal. UNALM*. Lima.
- Casells. (1991). *Problems in tissue culture contamination. Micropropagation Technology and Application. Debergh, p.c y r.h. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA*.
- CASSELLS, A. (1991). *Problems in tissue culture en: Micropropagation; Technology and application. Dordrencht ED.H.DPC Y ZR. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 31-44 pp*.
- Castañeda R.Y. . (2011). *Valor de uso de las plantas silvestres en Pamparomás, Ancash. Tesis para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica. .*
- Castillo. (2004). *micropropagacion de plantas in vitro*.

- Caula, A. (2011). *Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique and laboratory equipment*. In Trigiano. *Plant tissue culture, development and biotechnology*.
- Centro Internacional de la Papa - CIP. (2011). *Banco de germoplasma de la papa y el camote*. Lima-Perú.
- Cerron, G. T. (2015). *Tesis "Etnobotanica de plantas con uso medicinal en la comunidad de QUERO, JAUJA, REGION JUNIN. QUERO, JAUJA, JUNIN.*
- Cerrón, G. T. (2015). TESIS UNALM "ETNOBOTÁNICA DE PLANTAS CON USO MEDICINAL EN LA COMUNIDAD DE QUERO, JAUJA, REGIÓN JUNÍN". 24 y 54.
- Cronquist. (1981). *clasificacion taxonomica de plantas*.
- Debergh, P.; Read, P. (1991). *Micropropagación. En: Micropropagation Technology and Application*. USA.
- Doods, J y Roberts, L. (1995). *Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Estados Unidos., 248.*
- Eric Rodriguez y Maximilian Weigend. (2006). *El Libro Rojo de las Plantas Endemicas de Perú. Perú Biologo, 13(2).*
- Eric Rodriguez y Maximilian Weigend. (2006). *El Libro Rojo de las Plantas Endemicas de Perú. Perú Biologos, 13(2).*
- Eric Rodriguez y Maximilian Weigend. (2006). *Loasaceae endémicas del Perú. scielo, 391.*
- Es Salud/OPS. (2012). *investigacion de la medicina alternativa complemetaria*. Lima.
- Espinoza, N; et al. (1992). *Cultivo de tejidos: micropropagacion, conservacion y exportacion de papa; guia e investigacion Centro Internacional de la papa (CIP) 3PP.*
- Felipe Orrego Silva. (2013). *Flores Del Norte Grande. 87.*
- Flores, D. (2009). *propagacion por estacas y estudio preliminar del establecimiento in vitro de passifloralisuris.*

- George, e. a. (2008). Plant Propagation by tissue culture. Vol. 1 the background. 3ra ed. Dordrecht. 504.
- González, Yolanda et al. (2005). Producción, beneficio y conservación de semillas de plantas arbóreas. *scielo*, 53.
- Harshberger, J. W. (1896). The purpose of ethnobotany. *Botanical Gazette* 21:146-158. 21:146-158.
- Holdgate, D.P y Zandvoort, E.A. (1992). *micropropagation and the application of a laser beam for cutting*. En: Kurata K. y Kozai T, *Transplant production systems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- <http://www.theplantlist.org/1.1/about/#wcsir>. (2012). *A Working list of all plant species*.
- Instituto Nacional De Innovaion Agrario - INIA. (2017). PERÚ SERÁ EL SEGUNDO PAÍS ESPECIALIZADO EN CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DEL MUNDO. *AgroNoticias*.
- International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI*. (2002). Obtenido de <http://www.ipgri.cgiar.org/>.
- Iriondo, J. (2001). *Cnservacion de Germoplasma de Especies raras y Amenazadas*. *Invest.Agr.Prod.Veg.16(1):1-20*.
- Johansen, M. (1999). *aislamiento de protoplastos de genero fuchsia*.
- Kyte, L. (1987). *Plants from test tubes an introduction to micropropagation*. Tumber press. Oregon,. Estados Unidos.
- Luna, R. (2002). Micropropagacion de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis. Tesis Lic. Biol. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria la Molina. 87p.
- Manrique., J. P. (2008). *Aplicaciones de tejidos vegetales en condiciones in vitro*. Bogotá, CO. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 348p.
- Marina , M. et al. (2016). Diversificaton of *Caiophora*(Loasaceae Sub-familia loasoideae) during the uplift of the central andes. *scielo*.
- Markus Ackermann y Maximiliano Weigend . (2007). *Notas sobre el género Caiophora (LOASOIDEAE, Loasaceae) EN CHILE Y PAÍSES VECINOS*. Chile.

- Marta M., Liliana V. , y Lina G. (2011). *Propagación in vitro de Heliconia bihai (L.) cv. Lobster Salmón*. Argentina.
- Mejia, R. (1994). *Agrobiotecnología, Fundamentos y Aplicaciones: Preparación comercial de especies de plantas por cultivo in vitro*. Lima.
- Miñano., Z. (2009). Tesis Doctorado. Taxonomía, Ecología de las especies vegetales que se desarrollan en el área de pasivos ambientales mineros de Ticapampa – Ancash. *La Libertad E.I.R.L Trujillo - Perú*, 13,50,59.
- Montoya, L. (1991). *Cultivo de tejidos vegetales. Departamento de Agronomía*. . Medellin - Colombia.
- Murashige y Skoog. (1962). *Establecimiento de medio de cultivo para cultivo in vitro*.
- Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion (FAO). (2014). *informacion sobre uso de las plantas medicinales*.
- Organizacion Mundial de la Salud. (2015). *importancia de las plantas medicinales*.
- Pech y AEke, A. et al. (2007). *The effect of Gibberellic acid on the in vitro germination of Coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets*. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 43:247–253.
- Perea, M; Tirado,A. . (2011.). *Perea, M; Tirado,A. Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 160 p.*
- Pierik, R. (1988). *Cultivo in vitro de Plantas Superiores. Madrid. ES. España: Mundi - Prensa*.
- Quak. (1977). *cultivo de meristemo*.
- RADICE, S. & P. L. MARCONI. (1998). *Clonación in vitro de diversos cultivares de gerbera jamesoni*.
- Ramage, C.; Williams, R. (2002). *Mineral nutrition and plant morphogenesis. In vitro cellular and development biology*.
- Ramírez, Y. et al. (2011). Propagación in vitro de bambúes. *Biotecnología vegetal*. 11 (3) : 131-142.

- Ramos, E. (2012). *Evaluación de tres tratamientos de desinfección y cuatro medios y cuatro medios de cultivo para el establecimiento in vitro de *Dipteryx alata* (Shihuahuaco)*. Lima.
- Roca, W. y M. Mroginski. . (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 49-55 pp.
- Roca, W. y Mroginski. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 49-55 pp.
- Roca, W.; Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia.: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).
- Rocca, W y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. (CIAT). 20 PP. Colombia.
- Ruben Mérola y Saulo Sebastian. (2012). *Métodos, técnicas y tratamientos para inhibir dormancia en semillas de plantas forrajeras*. Montevideo.
- Salinas, A. R., et al. (2002). *Comportamiento de glicinina, β -conglucina y α -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas*. Brasil: Pesquisa Agropecuária Brasileira.
- Santillo, H. (2010). *Hierbas. La Curación natural*. México: Subhuti Dhramanada.
- Seemann, P. (1993). *Utilización de técnicas de Micropropagación, Avances en Producción y Sanidad Vegetal, Cultivos No Tradicionales*. Universidad Austral. Chile - Valdivia.
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture: techniques and experiments*. Waltham, EU. Elsevier. 166p.
- Thorpe, T. (1981). *Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis*. En: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press. Londres. 82-86 pp. Londres.
- turismo casa de shismay - Huanuco. (2014). *Ishancas de shismay*, 2-4.

- Ulloa Ulloa, C. et al. (2004). *Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993—2003. Arnaldoa, Ed. Especial* 7—242.
- Upadhyaya, H.D. & Nigam, S.N. (1999). Inheritance of fresh seed dormancy in peanut..Crop-sci. Madison, Wis. *Crop Science Society of America*, 98-101.
- Villar y Victor, R. (2015). Banco de Semilla que Salvara al Mundo de una Catastrofe. *Magazine Cultural Independiente*.
- walkey . (1980). *in ingram and helgeson pp 109-117*.
- Weigend, M. . (1997). *Nasa & the conquest of South America. Weigend. Munich*.
- www.botanical.online.com. (24 de febrero de 2017).

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de Consistencia para el cultivo *in vitro* de (*Caiophora cirsiifolia C.*).

Estandarización de protocolo *in vitro* a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada (*Caiophora cirsiifolia C.*), UNALM – Lima.

FORMULACION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	SISTEMA DE VARIABLES	INDICADORES
¿Cómo establecer un protocolo <i>in vitro</i> a partir de semilla botánica del cultivo de ortiga colorada (<i>caiophora cirsiifolia C.</i>)?	Establecer un protocolo <i>in vitro</i> a partir de semilla botánica del cultivo de ortiga colorada (<i>caiophora cirsiifolia C.</i>).	-Importancia de las plantas medicinales. -Aspectos generales de la ortiga colorada. -Aspectos generales del cultivo <i>in vitro</i> . -Ventajas y desventajas de la micropropagación.	H0: ninguno de los tratamientos planteado nos dará el mejor resultado.	VD: cultivo <i>in vitro</i> a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada.	-Porcentaje de contaminación. -Porcentaje de germinación -Atura de tallo -Número de hojas. -Número de raíz.
¿Cómo evaluar la efectividad de la desinfección <i>in vitro</i> a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada.	-Evaluar la efectividad de la desinfección <i>in vitro</i> a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada	-Medio de cultivo -componentes orgánicos -Factores que afectan a la micropropagación. -Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i> .	Ha: por lo menos uno de los tratamientos planteados nos dará mejor resultado.	VI: Estandarización de un protocolo <i>in vitro</i> a partir de semilla botánica del cultivo de Ortiga Colorada.	-número de la raíz. -pelos urticantes de raíz -pelos urticantes del tallo -pelos urticantes de las hojas. -peso fresco de la planta. -Peso seco de la planta. -peso final de la planta
¿Cómo determinar el mejor medio de propagación <i>in vitro</i> a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada.	-Determinar el mejor medio de propagación <i>in vitro</i> a partir de semilla Botánica del cultivo de Ortiga Colorada.	-Bancos de germoplasma. -Definición de términos.			

Anexo 2: Resumen de protocolo *in vitro* estandarizado para (*Caiophora cirsiifolia C.*).

PROTOCOLO DE (Caiophora cirsiifolia C.)

1. Selección de la planta madre:
 - En plantas silvestres: Consiste en seleccionar las mejor plantas.
 - En plantas cultivadas: Hacer un pre tratamiento de la planta madre en un invernadero por un tiempo no menor de 2 meses.
2. Selección de las semillas: Escoger las semillas con buenas características.
3. Desinfección del material vegetal:
 - Fuera de cámara: Consiste en un lavado superficial de las semillas; con detergente simple por 5', Benlate 1g/100ml de agua destilada por 5', seguido por 3 enjuague con agua destilada.
 - Dentro de cámara de flujo laminar: consiste en pasar con alcohol al 70° por 3'', 3 enjuagues con agua destilada estéril; posteriormente sumergir en NaClO 1% por 5', 3 enjuagues con agua destilada estéril.
4. Siembra o Introducción de las semillas: Consiste en colocar las semillas en un medio de cultivo estéril, sellarlos y llevar a la sala de incubación a una temperatura de 22°C y Fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas nocturnas.
5. Medio de cultivo:
 - Inicio: MS + 2mg/L AG3.
 - Multiplicación: MS + 0.2mg/L BAP + 0.1mg/L ANA + 0.2 mg/L AG3.

D2	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33	1	8.33
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	8.33	0	0.00	1	8.33
D2	1	8.33	1	8.33	1	8.33	0	0.00	1	8.33	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	8.33	0	0.00	1	8.33
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D3	1	8.33	1	8.33	1	8.33	0	0.00	1	8.33	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	8.33	0	0.00	1	8.33
D3	1	8.33	1	8.33	1	8.33	0	0.00	1	8.33	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	8.33	0	0.00	1	8.33
D3	1	8.33	1	8.33	1	8.33	0	0.00	1	8.33	0	0.00
D3	1	8.33	1	8.33	1	8.33	0	0.00	1	8.33	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	8.33	0	0.00	1	8.33
D3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00

Anexo 4: Datos de evaluación de porcentaje de germinación *in vitro* de Ortiga Colorada.

TR AT	7días		14días				21días				28días			
	# de frascos contamin ados	# de semillas germina das	# de frascos contamin ados	% de contamina cion	# de semillas germina das	% de germinac ion	# de frascos contamin ados	% de contamina cion	# de semillas germina das	% de germinac ion	# de frascos contamin ados	% de contamina cion	# de semillas germina das	% de germinac ion
10	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
10	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67	0	0.00	1	6.67
10	0	0	1	25.00	0	0.00	1	25.00	0	0.00	1	25.00	0	0.00
10	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	20.00	0	0.00	5	33.33
10	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67
11	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	13.33	0	0.00	4	26.67
11	0	0	1	25.00	0	0.00	1	25.00	0	0.00	1	25.00	0	0.00
11	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67	0	0.00	5	33.33
11	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	13.33	0	0.00	4	26.67
11	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67
12	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67	0	0.00	2	13.33
12	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	26.67	0	0.00	4	26.67
12	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67	0	0.00	2	13.33
12	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	20.00	0	0.00	5	33.33
12	0	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	6.67
13	0	0	0	0.00	1	6.67	0	0.00	3	20.00	0	0.00	8	53.33
13	0	0	0	0.00	1	6.67	0	0.00	5	33.33	0	0.00	12	80.00
13	0	0	0	0.00	3	20.00	0	0.00	7	46.67	0	0.00	8	53.33
13	0	0	0	0.00	1	6.67	0	0.00	5	33.33	0	0.00	9	60.00
13	0	0	1	25.00	1	6.67	1	25.00	6	40.00	1	25.00	0	0.00

Anexo 5: Datos de evaluación de parámetros de crecimiento en la etapa de multiplicación a los 28 días

tratamiento	altura de planta (cm)	N° de hojas	N° de raíz	N° de brotes	Pelos urticantes (%)		
					raíz	tallo	hoja
MM0	1.5	8	2	2	40.00	30.00	66.67
MM0	2.2	8	1	4	20.00	44.00	66.67
MM0	1.6	8	2	3	40.00	32.00	66.67
MM0	1.2	6	1	2	20.00	24.00	50.00
MM1	1.1	6	0	1	0.00	22.00	50.00
MM1	1.4	6	1	2	20.00	28.00	50.00
MM1	1.8	8	1	3	20.00	36.00	66.67
MM1	1.4	8	1	1	20.00	28.00	66.67
MM2	1.8	10	2	4	40.00	36.00	83.33
MM2	1.7	8	2	2	40.00	34.00	66.67
MM2	2.0	8	1	3	20.00	40.00	66.67
MM2	1.5	8	1	1	20.00	30.00	66.67
MM3	2.4	10	3	5	60.00	48.00	83.33
MM3	2.5	10	2	6	40.00	50.00	83.33
MM3	2.3	10	3	4	60.00	46.00	83.33
MM3	1.9	8	2	4	40.00	38.00	66.67

Anexo 6: Datos de evaluación de peso fresco y seco de las plántulas de (*Caiophora cirsiifolia* C.).

tratamiento	peso fresco	peso seco	Peso Final
M0	0.0000	0.0000	0.0000
M0	1.1516	0.1000	1.0516
M0	1.6482	0.1331	1.5151
M0	0.5759	0.0504	0.5255
M0	0.0000	0.0000	0.0000
M1	1.4934	0.1075	1.3859
M1	0.8532	0.0797	0.7735
M1	0.6512	0.0514	0.5998
M1	0.5264	0.0482	0.4782
M1	0.3284	0.0372	0.2912
M2	1.1370	0.0967	1.0403
M2	0.8609	0.0824	0.7785
M2	1.7045	0.1526	1.5519
M2	1.5753	0.1418	1.4335
M2	0.5275	0.0445	0.4830
M3	0.6743	0.0463	0.6280
M3	1.8150	0.1260	1.6890
M3	0.6149	0.0592	0.5557
M3	0.5543	0.0539	0.5004
M3	0.3144	0.0417	0.2727

Anexo 7: ANOVA para peso fresco de las plántulas *in vitro*.

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.68354969	0.22784990	0.70	0.5673
Error	16	5.22934138	0.32683384		
Corrected Total	19	5.91289107			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	pfresco Mean		
0.115603	67.23279	0.571694	0.850320		

Fuente: SAS V8.

Anexo 8: ANOVA para peso seco de las plántulas *in vitro*.

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.00663099	0.00221033	1.18	0.3498
Error	16	0.03006315	0.00187895		
Corrected Total	19	0.03669414			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	pseco Mean		
0.180710	59.68170	0.043347	0.072630		

Fuente: SAS V8.

Anexo 9: ANOVA para peso final de las plántulas *in vitro*.

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.55577733	0.18525911	0.66	0.5879
Error	16	4.48354668	0.28022167		
Corrected Total	19	5.03932402			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	pfinal Mean		
0.110288	68.06821	0.529360	0.777690		

Fuente: SAS V8.

Anexo 10: A. flor, B. Capsula cónica con semillas de (*caioophora cirsiifolia* C.).



Anexo 11: Proceso de desinfección fuera de cámara.



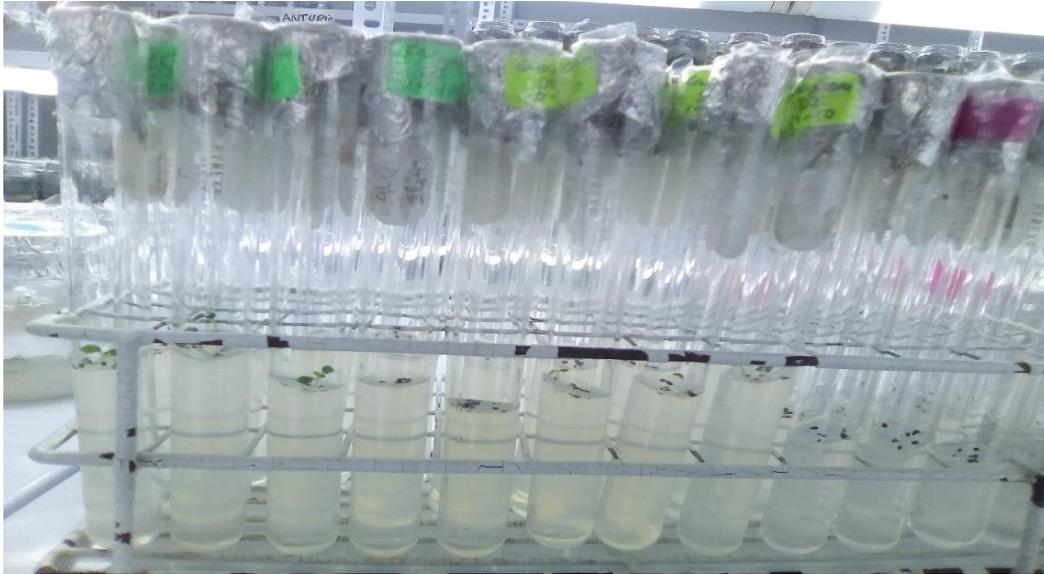
Anexo 12: Preparación de medios de cultivo.



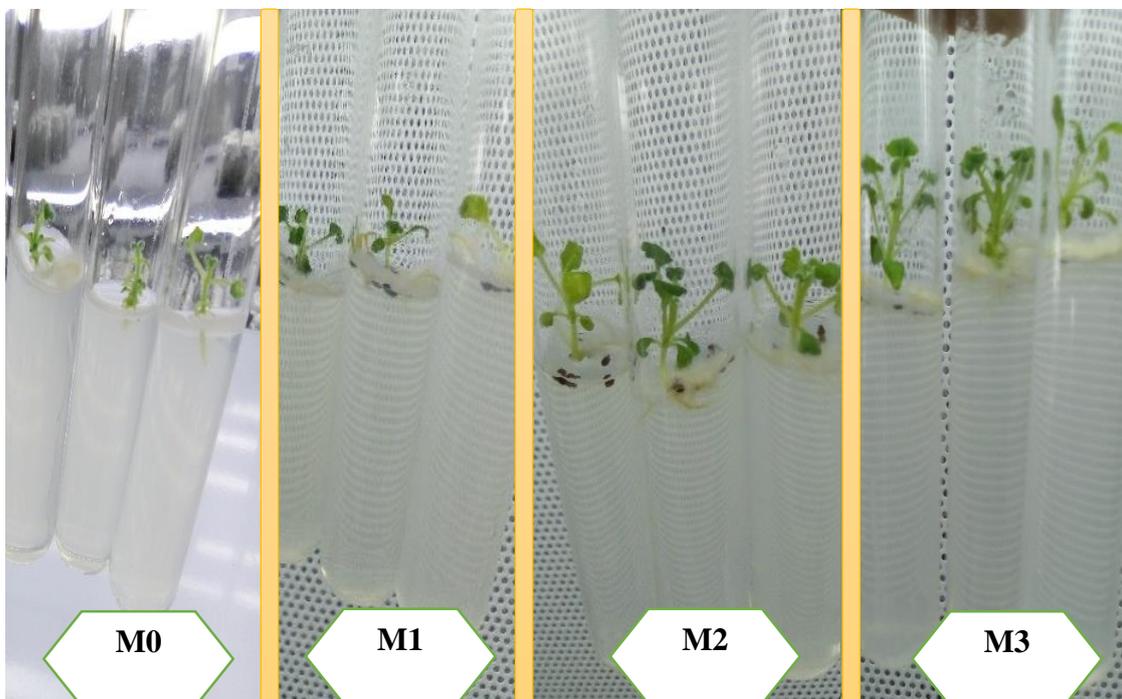
Anexo 13: Cámara de flujo laminar para siembra de cultivo *in vitro*.



Anexo 14: Germinación de las plántulas después de los 30 días de introducción en medios con diferentes tratamientos.



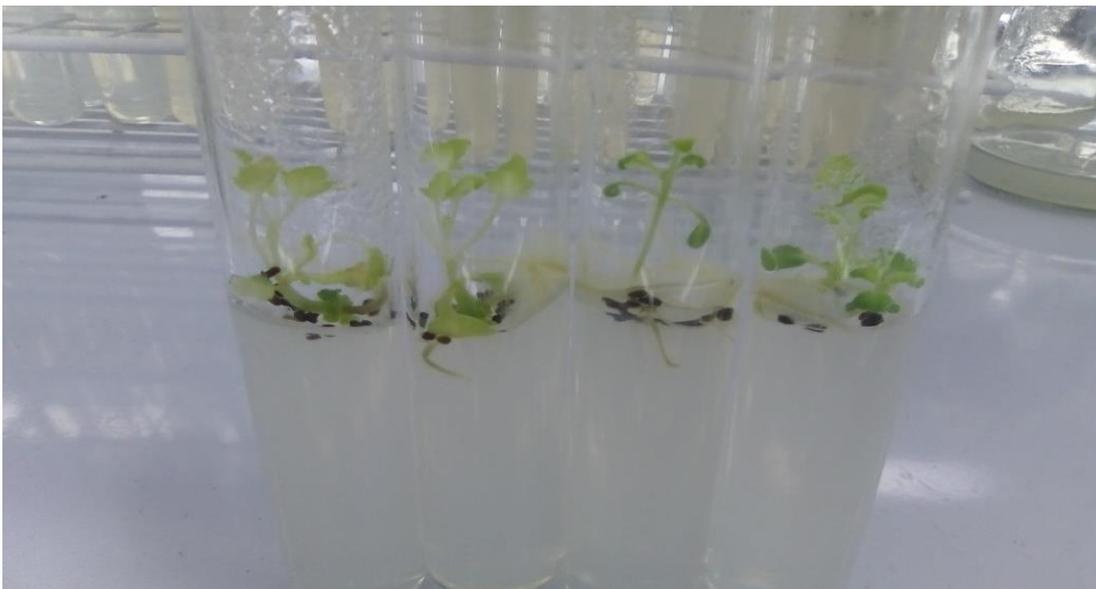
Anexo 15: Plántulas *in vitro* después de 2 meses de la introducción en M & S modificado, con diferentes



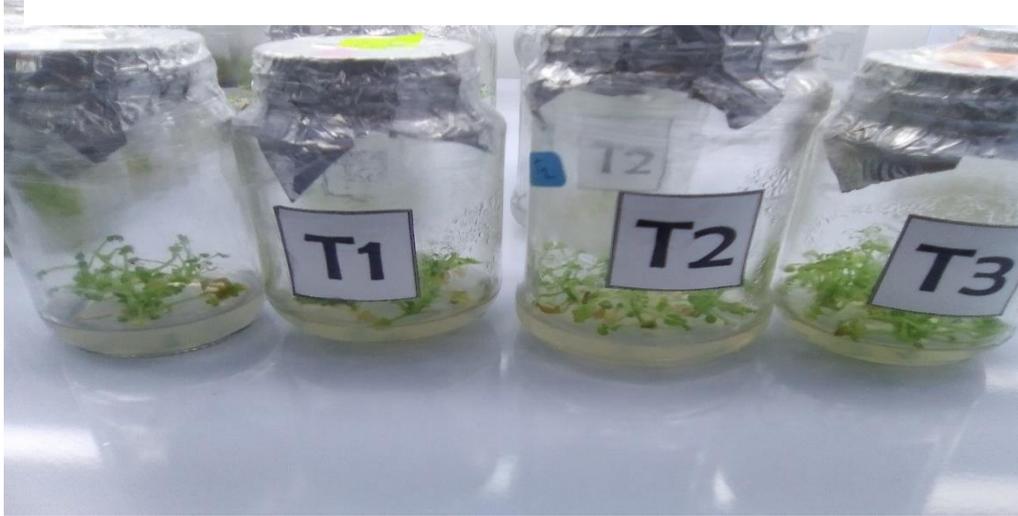
Anexo 16: repique en medio con tratamiento de multiplicación



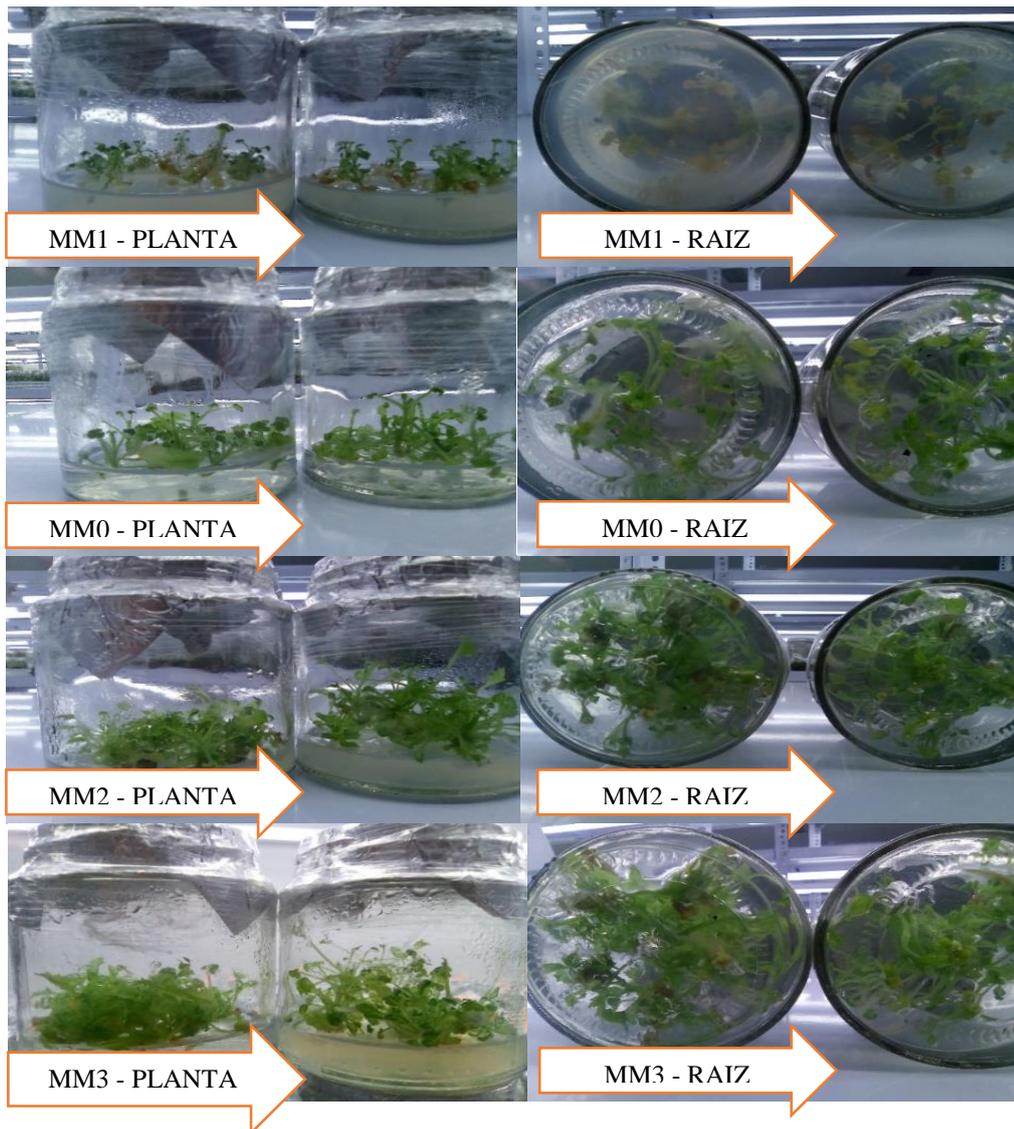
Anexo 17: Plántulas *in vitro* después de 3 meses con problemas de amarillo clorótico



Anexo 18: Plantas *in vitro* a 1 mes después del repique.



Anexo 19: Evaluación de las raíces en diferentes medios de multiplicación.



Anexo 20: Selección al azar de las plántulas *in vitro* para su posterior secado.



Anexo 21: Plántulas escurridas listo para su peso fresco o inicial.



Anexo 22: Procedimiento desecado de las plántulas de (*Caiohora cirsiifolia* C.).

