

Micropropagación de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. Ex Willd.) Kunth a partir de yemas apicales

Micropropagation of *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. Ex Willd.) Kunth from shoot tips

Jean Carlo Rivera Curi*, Rosa María Cabrera Pintado**, Fernando Bulnes Soriano***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.70949

RESUMEN

Prosopis pallida, conocido como algarrobo, es una especie emblemática de los bosques secos del norte del Perú. Es de gran importancia económica por su uso en la producción de leña y carbón, así como en la producción de algarrobina proveniente de sus frutos. Actualmente las actividades humanas han deforestado grandes poblaciones de algarrobo en el bosque seco, por lo que es muy importante una propagación masiva para planes de reforestación a gran escala en esos ecosistemas, con la finalidad de conservar la especie y también las características genéticas de individuos élite. El objetivo de la investigación fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de algarrobo. Previo a la siembra *in vitro*, se evaluaron tres tratamientos pregerminativos para poder acelerar la germinación de las semillas con la finalidad de obtener mayor material de propagación. Luego se evaluó el efecto del medio de plantas leñosas con la adición de cuatro concentraciones (0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) de citoquininas (BAP y ZEA) sobre la propagación *in vitro* de *Prosopis pallida*, habiendo realizado tres ensayos debido a la poca efectividad de brotación de las yemas apicales, resultando mejor la ausencia de citoquininas en yemas apicales con sus dos cotiledones, usando tapas de algodón en los tubos de ensayo. En esta etapa se evaluó el número de nudos, altura de plántula y número de brotes. Para el enraizamiento se ensayó con tres concentraciones (0; 0,5 y 1,0 mg/L) de auxinas (NAA, IBA y IAA), y se evaluó el porcentaje de enraizamiento, longitud de la raíz y número de raíces; obteniéndose mejores resultados con 0,5 mg/L IBA. En la fase de aclimatación se evaluó el porcentaje de aclimatación en dos tipos de sustratos, obteniéndose mejores resultados con sustrato comercial de turba y vermiculita.

Palabras claves: *Prosopis pallida*, Micropropagación, cultivo de tejidos, enraizamiento, aclimatación.

ABSTRACT

Prosopis pallida, known as algarrobo, is an emblematic species of the dry forests of northern Peru. It is of great economic importance for its use in the production of firewood and coal, as well as in the production of carob from its fruits. Currently human activities have deforested large populations of algarrobo in the dry forest, so it is very important a massive propagation for large-scale reforestation plans in these ecosystems, in order to conserve the species and also the genetic characteristics of elite individuals. The objective of the research was to establish a protocol for the *in vitro* propagation of algarrobo. Before *in vitro* propagation, It was evaluated the effect of three seeds treatments to accelerate seeds germination in order to get more propagation material. Then, the effect of woody plants medium with the addition four concentrations (0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg / L) of cytokinins (BAP and ZEA) on the *in vitro* propagation of *Prosopis* was evaluated and it has performed three trials for the ineffective budding of apical buds,

* Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina. jcriveracuri@gmail.com.

** Especialista en biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Subdirección de Biotecnología. Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Instituto Nacional de Innovación Agraria. rcabrera@inia.gob.pe.

*** Docente. Silvicultura y Ecología Forestal. Departamento de Manejo Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina.

resulting in a better absence of cytokinins in apical buds with their two cotyledons, and using cotton lids in the test tubes. In this stage the number of nodes, seedling height and number of shoots was evaluated. For rooting, it was tested with three concentrations (0, 0.5 and 1.0 mg / L) of auxins (NAA, IBA and IAA), and the percentage of rooting, root length and amount of roots was evaluated, obtaining better results with 0.5 mg / L IBA. In the acclimation phase, the acclimation percentage was evaluated using two substrates, and the best results were commercial substrate of peat and vermiculite.

Key words: *Prosopis pallida*, Micropropagation, tissue culture, rooting, acclimatization.

Recibido: agosto 10 de 2019

Aprobado: mayo 4 de 2020

INTRODUCCIÓN

En el norte del Perú, los bosques tropicales se extienden principalmente a través de los departamentos de Tumbes, Piura, Lambayaque y el norte de la Libertad. La especie más sobresaliente en este tipo de ecosistemas es el algarrobo (*Prosopis pallida*), de gran valor económico para los pobladores locales por su madera, frutos y beneficios ecosistémicos como la protección contra la desertificación, la producción apícola, la fijación de nitrógeno en el suelo, entre otros. Sin embargo, un gran problema para estos bosques es la pérdida de su cobertura vegetal debido mayormente a la tala ilegal y el exceso de pastoreo (Llerena *et al.*, 2014; Otivo, 2015).

El algarrobo es una especie multipropósito idónea para realizar programas de reforestación en las zonas de bosques secos para así conservar estos ecosistemas y evitar más pérdida de la cobertura vegetal. Se propaga convencionalmente por semillas, las cuales poseen fuertes cubiertas seminales que dificultan su germinación, y se debe previamente aplicar algún tratamiento para poder obtener una mayor cantidad de semillas germinadas (Passera, 2000; Albán *et al.*, 2003).

Otra alternativa para la producción de plántulas de *Prosopis* es la propagación vegetativa, la cual ofrece la ventaja de propagar individuos selectos de los cuales no se desea perder sus características. Sin embargo, se debe tener en cuenta la edad de la estaca para mejores resultados de enraizamiento y además la capacidad de enraizamiento del género *Prosopis* es muy variable (Passera, 2000; Minchala *et al.*, 2014).

Por otro lado, la micropropagación apoya a los métodos de propagación tradicionales ya que permite la propagación masiva clonal y así facilitar los programas de reforestación que se realizan con algarrobo para la conservación de los bosques secos del norte del Perú. A su vez permite generar plantones mejorados genéticamente por lo que establecer el protocolo de propagación *in vitro* de algarrobo, permitirá acortar el tiempo en las investigaciones en mejoramiento genético de esta especie y aprove-

char la alta variabilidad de las poblaciones naturales para la propagación de algún individuo élite con características deseables de clonar, de acuerdo con los objetivos de las plantaciones.

En este contexto, el objetivo principal del estudio fue desarrollar un protocolo adecuado para la propagación *in vitro* de algarrobo (*Prosopis pallida*) a partir de yemas apicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del ensayo experimental

La etapa de propagación *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección de Biotecnología de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (DRGB) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de La Molina, departamento de Lima, Perú. Mientras que el ensayo para acelerar la germinación de semillas se realizó en el Laboratorio de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Zona de obtención del material vegetal

Se empleó semillas provenientes de un individuo seleccionado sano de *Prosopis pallida* de las instalaciones de la Estación Experimental Agraria Vista Florida del INIA, ubicado en el distrito de Picsi en la provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque.

Ensayo preliminar de tratamientos pregerminativos

Con el propósito de definir un tratamiento pregerminativo que permita acelerar la germinación de las semillas, se realizó un ensayo preliminar donde se evaluó el efecto de tres tratamientos para la germinación de semillas de *Prosopis pallida*.

Para ello se sembraron las semillas sometidas a los diferentes tratamientos en arena de río en una bandeja de siembra, se usaron 20 semillas por repetición en tres repeticiones por tratamiento. La bandeja se dividió formando 12 espacios de igual medida y la distribución de las repeticiones dentro de la bandeja se realizó de tal manera de no tener juntos repeticiones de un mismo tratamiento.

Protocolo de desinfección superficial

Las semillas se sumergieron en agua caliente a 80 °C durante 10 minutos como tratamiento pregerminativo. Luego se lavaron con detergente común y se enjuagaron con agua de grifo seguido de tres enjuagues con agua destilada y se dejaron remojar en Benomyl (2g/L) durante una hora.

Posteriormente bajo condiciones estériles de cámara de flujo laminar, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 70% por un minuto. Se sumergieron en hipoclorito de sodio en tres concentraciones (1,2; 1,5 y 1,8 %) en tres tiempos de inmersión diferentes (15, 20 y 25 minutos) y se enjuagaron con agua destilada estéril. Para finalizar se sembró cada semilla dentro de un tubo de ensayo con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa (30g/L) y agar (7g/L) preparado previamente. Se tapó con papel aluminio y se selló con *parafilm*. Se evaluó el porcentaje de contaminación y el porcentaje de plántulas establecidas en un período de 52 días.

Fase de multiplicación

Para la multiplicación se empleó el Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1980) adicionado con sacarosa (30 g/l) y agar (7 g/L). Se trabajó con secciones de yemas apicales con ambos cotiledones y parte del hipocótilo de plántulas de 2 semanas provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Se evaluó el efecto de Zeatina (ZEA) y 6- Bencil Amino Purina (BAP) en cuatro concentraciones diferentes (0, 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L). Los explantes se mantuvieron en tubos de ensayo sellados con tapas de algodón en incubación a 26 ± 2 °C y con fotoperiodo de 16 horas luz durante 4 semanas. Transcurrido ese período las yemas apicales y axilares se seccionaron y se subcultivaron en el mismo medio de cultivo, e incubaron por 6 semanas. En el caso de la primera siembra de yemas apicales se evaluó la formación de nudos y la altura de los explantes mientras que en la siembra de yemas axilares se evaluó la formación de brotes. Se sembró 10 explantes por tratamiento, repitiéndose el ensayo tres veces.

Tabla 1. Tratamientos pregerminativos empleados para la germinación de semillas de *Prosopis pallida*.

Tratamiento	Descripción
t0	Tratamiento control
t1	Ácido sulfúrico al 72% por 10 minutos
t2	Acetona 100% por 10 minutos
t3	Agua caliente 80°C por 10 minutos

Fase de enraizamiento

Para el enraizamiento *in vitro* se empleó el Woody Plant Medium (WPM) adicionado con sacarosa (30 g/l) y agar (7 g/L). Se trabajó con microestacas apicales provenientes

de la etapa de multiplicación. Se evaluó el efecto de ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) en tres concentraciones diferentes (0, 0,5 y 1,0 mg/L). Los explantes se mantuvieron en tubos de ensayo sellados con tapas de algodón e incubaron a 26 ± 2 °C y con fotoperiodo de 16 horas luz durante 5 semanas. Se evaluó el porcentaje de enraizamiento, la longitud de la raíz principal y el número de raíces por explante. En el ensayo se trabajó con 5 explantes por tratamiento, repitiéndose el ensayo tres veces.

Fase de aclimatación

En la etapa de aclimatación, las plántulas enraizadas provenientes de la propagación *in vitro* se sembraron en pastillas jiffys de turba 99% y sustrato comercial de turba y vermiculita en condiciones de invernadero a 24°C y 70% de humedad por un periodo de 30 días. Se evaluó el porcentaje de aclimatación de las plántulas por cada tipo de sustrato. En el ensayo se trabajó con 10 explantes por tipo de sustrato, repitiéndose el ensayo tres veces.

Diseño experimental

Para los ensayos en estudio se realizó un análisis de varianza. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Tukey al 5% mediante el programa InfoStat.

RESULTADOS

Ensayo preliminar de tratamientos pregerminativos

La evaluación de la germinación de las semillas se realizó tres días a la semana por un período de 30 días. En la tabla 2 se observa que el mayor porcentaje de germinación se obtuvo con el tratamiento de agua caliente (36,7%) seguido del tratamiento de acetona al 100% con 33,3% de porcentaje de germinación. Si bien el tratamiento con ácido sulfúrico al 72% aceleró ligeramente la germinación (31,7%) no hubo una gran diferencia con el grupo testigo (30%).

El mejor tratamiento fue el de agua caliente a 80°C durante 10 minutos. Este resultado fue similar al presentado por Prokopiuk y Chifa (2000) en su trabajo con semillas de *Prosopis alba*, quienes obtuvieron con agua caliente un gran número de semillas germinadas. Del mismo modo,

Tabla 2. Porcentaje de germinación por tratamiento pregerminativo en semillas de *Prosopis pallida*.

Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)
t0 (Testigo)	30,0
t1 (Acetona 100%)	33,3
t2 (Ácido sulfúrico 72%)	31,7
t3 (Agua caliente 80°C)	36,7

Sobrevilla *et al.* (2013), reportaron buenos resultados de germinación en semillas de *Prosopis laevigata* (20%) remojando las semillas en agua a 65 °C durante 8 minutos indicando que a temperaturas superiores a 70 °C, el agua caliente afecta al embrión y disminuye la germinación. Sin embargo, Juárez *et al.* (2001), obtuvieron un 60 por ciento de germinación con la aplicación de agua caliente a 80 °C durante 8 minutos en semillas de *Prosopis laevigata* y mencionan que para la germinación adecuada de las semillas una temperatura idónea oscila entre los 75 °C y 80 °C y por encima de ello la germinación disminuye por daños en el embrión.

El tratamiento de acetona al 100 por ciento durante 10 minutos presentó el segundo mejor resultado. En investigaciones similares, Prokopiuk y Chifa (2000) obtuvieron este tratamiento como el mejor para la germinación de semillas de *Prosopis alba*, pero con un tiempo de inmersión de 24 horas, por lo que se podría esperar que el tratamiento es más efectivo con un mayor tiempo de inmersión, pero con tan sólo 10 minutos si tuvo un efecto importante para la germinación de semillas de *Prosopis pallida*. De la misma manera, Tapia *et al.* (2012), no tuvieron buenos resultados con la acetona al 100% con un tiempo de inmersión de 30 minutos para *Prosopis chilensis*. Por lo que se deduce que la acetona 100% tiene buenos efectos a mayor tiempo de inmersión.

El ácido sulfúrico al 72% durante 10 minutos no presentó un gran efecto en la germinación de *Prosopis pallida*. Datos similares presentaron Prokopiuk y Chifa (2000) quienes no obtuvieron muy buenos resultados empleando ácido sulfúrico concentrado por 2 minutos y fue uno de los tratamientos con más bajos porcentajes de germinación a diferencia de los otros que evaluaron. Sin embargo, Tapia *et al.* (2012), si mostraron buenos resultados

con ácido sulfúrico al 98 por ciento durante 3 minutos (95% de porcentaje de germinación) siendo el segundo mejor tratamiento que obtuvieron de los nueve que evaluaron. A diferencia de ellos, Sobrevilla *et al.* (2013), presentaron un bajo porcentaje de germinación con el ácido sulfúrico concentrado durante 15 minutos. Arévalo (1998) menciona que mientras más aumentó el tiempo de inmersión para el ácido sulfúrico concentrado, menor era el porcentaje de germinación que obtenía, presentando los mejores resultados con un tiempo de 5 minutos. Por lo que se deduce que una mayor concentración de ácido implicaría un menor tiempo de inmersión, ya que el ácido afecta también al embrión. Esta información es verificable en la investigación presentada por Morales *et al.* (2019), donde se obtuvo un 100 por ciento de germinación al emplear un tratamiento de ácido sulfúrico entre 95-98% por 15 minutos. Los autores mencionan que mayores concentraciones con más tiempo dañan el embrión y reducen el porcentaje de germinación. Al emplear 10 minutos del ácido sulfúrico con una concentración de 72 por ciento no se obtuvieron resultados similares a los autores que emplearon una mayor concentración. Sin embargo, Arévalo (1998) menciona que obtuvo mejores resultados con agua caliente que con el ácido y que no es un tratamiento tan sugerido por la dificultad de conseguir este insumo químico.

Protocolo de desinfección superficial

En la tabla 3 se muestra el efecto de los tratamientos de desinfección aplicado a las semillas sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de plántulas establecidas. En ambos casos, el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en el análisis de medias se observa que el valor más

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión sobre el porcentaje de semillas contaminadas y establecidas en la germinación *in vitro* de *Prosopis pallida*.

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Tratamiento	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Contaminación (%)	Establecimiento (%)
t1	1,2	15	3,3 a	50,0 a
t2	1,2	20	13,3 a	36,7 a
t3	1,2	25	6,7 a	36,7 a
t4	1,5	15	6,7 a	43,3 a
t5	1,5	20	6,7 a	40,0 a
t6	1,5	25	6,7 a	33,3 a
t7	1,8	15	6,7 a	23,3 a
t8	1,8	20	3,3 a	40,0 a
t9	1,8	25	3,3 a	23,3 a

Tabla 4. Efecto del tipo y concentración de citoquinina sobre el número de nudos y la altura del explante en el cultivo de yemas apicales de *Prosopis pallida*. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Tratamiento	Citoquinina	Concentración (mg/L)	Nudos (N°)	Altura (cm)
t1	Control		3,6 b	5,1 b
t2	BAP	0,5	2,4 a	3,2 a
t3	BAP	1,0	2,2 a	2,4 a
t4	BAP	1,5	2,0 a	2,4 a
t5	ZEA	0,5	2,5 ab	2,9 a
t6	ZEA	1,0	2,3 a	3,1 a
t7	ZEA	1,5	2,1 a	3,0 a

alto para el porcentaje de establecimiento pertenece al tratamiento con 1,2 % de hipoclorito de sodio durante 15 minutos. Además, se aprecia que a medida que aumenta la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito, el porcentaje de establecimiento disminuye; encontrándose una menor cantidad de plántulas establecidas. En el caso del porcentaje de contaminación se observa que existe una disminución de la contaminación conforme aumentan los tratamientos, a excepción del tratamiento con 1,2% NaOCl durante 15 minutos que es uno de los tratamientos con menores valores de contaminación.

Medel *et al.* (2001), evaluaron diferentes técnicas de desinfección y concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio para la desinfección de embriones maduros en *Ariocarpus fissuratus* y obtuvieron una mayor cantidad de contaminación cuando sembraron las semillas ya que una gran parte de los contaminantes (microorganismos) se encuentran en la testa de la semilla. Como resultado obtuvieron que a mayor concentración de hipoclorito menor es la contaminación de las semillas. En el caso del presente trabajo, el tratamiento pregerminativo con agua caliente realizado a las semillas antes de ser desinfectadas parece que eliminó una gran parte de los contaminantes que se encuentran en la testa, por lo que es razonable que para la desinfección ya no se requiere concentraciones altas del NaOCl para obtener un menor porcentaje de contaminación, lo que daría lugar a que al debilitarse la testa permita una mayor absorción del agua a la semilla, por lo que concentraciones altas podrían dañar al embrión y disminuir la cantidad de plántulas establecidas.

Fase de multiplicación

El efecto del tipo de citoquinina y su concentración sobre el número de nudos formados y la altura de las plántulas en el cultivo de yemas apicales de *Prosopis pallida* se resume en la tabla 4. Se observa que los explantes respon-

den mejor al tratamiento sin citoquininas alcanzando una mayor cantidad de nudos y altura siendo 3,6 nudos y 5,1 cm, respectivamente. Se observa que existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Además el explante no responde adecuadamente conforme se aumenta la concentración de BAP o ZEA, disminuyendo los valores de la cantidad de nudos y la altura de los explantes.

En el trabajo con *Prosopis pallida*, Flor (2013) presenta la misma tendencia en la siembra de yemas apicales y obtiene menores valores cuando aumenta la concentración de citoquinina. Los datos presentados en esta investigación difieren de Flor (2013) ya que este obtuvo como altura 3,31 cm; mientras que en esta investigación se alcanzaron valores hasta 5,1 cm. Esto probablemente a que el autor empleó como medio de cultivo el MS/2, mientras que en esta investigación se trabajó con WPM y el MS contiene una gran cantidad de nutrientes y es rico en nitrógeno generando algunos desordenes fisiológicos en algunas especies. Sin embargo, Tabone *et al.* (1986), quienes obtuvieron mejores resultados con el medio de cultivo MS pero que de igual manera el medio de cultivo WPM presentaba buenos resultados. Para ambos casos obtuvieron mejores resultados con el medio de cultivo a la totalidad de su concentración. Los datos de la presente información concuerdan con lo presentado por Morales *et al.* (2019), quienes obtuvieron mayores valores de altura en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.

Inicialmente se emplearon tapas de papel aluminio, pero se observó que causaban un desorden en la fisiología del explante debido a la hiperhidricidad, problema que también presentó Castro *et al.* (2002), en la propagación *in vitro* de *Tectona grandis*, mencionando que mayores concentraciones de BAP causaban mayores problemas de hiperhidricidad. Este efecto puede ser causado por condiciones de estrés en la propagación como por concentra-



Figura 1. Elongación de la yema apical a las cuatro semanas en medio libre de citoquininas (izquierda) y con citoquininas (derecha).

ciones altas de citoquininas, falta de intercambio gaseoso en los recipientes o la fisiología del cultivo con respecto a la captación de agua del medio de cultivo. Por este motivo, se trabajó con tapas de algodón para el sellado de los tubos.

La tabla 5 muestra el efecto de los tratamientos en la formación de brotes. Se observa que, de igual forma, las yemas axilares tiene una mayor respuesta con el tratamiento sin citoquininas alcanzando un valor de 2,4 brotes y que existe una diferencia significativa entre el tratamiento control y el resto de tratamientos.

Tabla 5. Efecto del tipo y concentración de citoquinina sobre la cantidad de brotes formados en el subcultivo de yemas axilares de explantes de *Prosopis pallida*.

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Tratamiento	Citoquinina	Concentración (mg/L)	Brotes (Nº)
t1	Control		2,4 b
t2	BAP	0,5	1,2 a
t3	BAP	1,0	0,9 a
t4	BAP	1,5	1,0 a
t5	ZEA	0,5	1,0 a
t6	ZEA	1,0	1,0 a
t7	ZEA	1,5	0,8 a

Minchala *et al.* (2014), reportaron 2,8 brotes en promedio empleando 2,0 mg/L de BAP. Estos resultados difieren de los mostrados en la presente investigación lo cual podría deberse a que el período de incubación fue menor al de los autores quienes evaluaron a los 90 días mientras que en este trabajo se cultivaron los explantes durante 42 días. Por otro lado, el valor de 2,4 brotes obtenidos es muy cercano al de los autores empleando solo WPM, lo

que demostraría una mayor eficacia de este medio de cultivo ante el MS empleado por Minchala *et al.* (2014). En la investigación realizada por Venkatachalam *et al.* (2017), se obtuvo una mejor inducción de la brotación con medio de cultivo MS y 2.22 $\mu\text{mol/l}$. Los autores también mencionan que por encima de esa concentración de hormona disminuye la inducción de los brotes en los nudos cotiledonares, lo cual se refuerza con la presente investigación ya que se reporta que a mayor concentración de BAP se obtienen menor cantidad de brotes. Los datos presentados también difieren de los resultados obtenidos por Morales *et al.* (2019), los autores evaluaron la cantidad de brotes y tuvieron como resultados 4.17 ± 0.89 brotes por explante empleando medio de cultivo MS con 4.4 μM BAP en las mismas condiciones y en un menor tiempo de incubación, ya que es su investigación el período de cultivo fue de 2 semanas. Esta variación podría deberse ya que las diferentes especies del género *Prosopis* presentan diferencias fisiológicas y mientras que en la presente investigación se trabajó con *Prosopis pallida*, los autores trabajaron con *Prosopis laevigata*. Esto es reforzado por (Arce & Balboa, 1991), quienes mencionan que las diferencias de resultados de su trabajo con otros trabajos pueden deberse a variaciones fisiológicas entre las diferentes especies del género *Prosopis*.



Figura 2. Inducción de brotes a partir de yemas axilares subcultivadas en medio WPM.

Fase de enraizamiento

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos para la fase de formación de raíces. Para las variables porcentaje de enraizamiento, longitud de raíces y número de raíces, los explantes presentaron mejor respuesta en el tratamiento con 0,5 mg/L AIB con valores de 53,3%, 1,5% y 1,5%, respectivamente. Se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos adicionados con auxinas y el tratamiento control para la longitud de raíces, y no se observó respuesta del explante en medio sin hormona durante el período de evaluación. Sin embargo, posterior a este, algunos explantes en el tratamiento control enraizaron, lo que de-

Tabla 6. Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces en el enraizamiento *in vitro* de microestacas de *Prosopis pallida*. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Tratamiento	Auxina	Concentración (mg/L)	Porcentaje de enraizamiento (%)	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces (cm)
t1	Control		0 a	0 a	0 a
t2	ANA	0,5	13,3 a	0,2 ab	0,4 a
t3	ANA	1,0	26,7 a	0,3 ab	0,7 a
t4	AIB	0,5	53,3 a	1,5 b	1,5 a
t5	AIB	1,0	13,3 a	0,1 a	0,2 a
t6	AIA	0,5	13,3 a	0,2 ab	0,3 a
t7	AIA	1,0	20,0 a	0,6 ab	0,9 a

muestra la necesidad de la adición de auxinas para mejorar el enraizamiento. Adicionalmente, sin importar el tratamiento se pudo apreciar la formación de callo en la base de la microestaca, pero posteriormente se inició la rizogénesis. Además, que mayores concentraciones de auxinas disminuían la respuesta de los explantes.

Buendía *et al.* (2007), obtuvieron 44 por ciento de microestacas enraizadas como mejor resultado empleando medio de cultivo MS/2. Por lo que el resultado de 53,3 por ciento de enraizamiento obtenido en el presente trabajo explicaría nuevamente un mejor desarrollo de los explantes en el WPM. Esta diferencia podría deberse al medio de cultivo empleado por los autores, ya que Timpte (2001) citado por Flor (2013) indica que la concentración mineral del medio de cultivo MS/2 puede afectar la sensibilidad de las células para responder al estímulo organogénico inducido por alguna auxina. Buendía *et al.* (2007), emplearon MS/2 donde a pesar de estar a la mitad de la concentración aún posee una mayor concentración de sales que el WPM, por lo que podría ser un factor que permite que se obtengan mejores resultados con presencia de auxinas. Venkatachalam *et al.* (2017), presenta un 87 por ciento de explantes enraizados en un medio de cultivos MS/2 adicionado con $2.68 \mu\text{mol/l ANA} + 0.46 \mu\text{mol/l KIN} + 0.59 \mu\text{mol/l AgNO}_3$. Es interesante indicar que los autores mencionan que el porcentaje de enraizamiento disminuye conforme aumenta la concentración de la hormona ANA, lo cuál también se puede observar en la información presentada ya que a mayor concentración de auxinas se obtiene un menor porcentaje de enraizamiento.

Flor (2013) presentó una longitud de raíz de 1,10 cm en el medio de cultivo MS sin la adición de auxinas.

En la presente investigación se obtuvieron valores hasta 1,5 cm con el tratamiento con 0,5mg/L AIB, quizás por



Figura 3. Microestaca enraizada.

una mayor efectividad del medio de cultivo WPM respecto al medio MS/2 empleado por el autor.

Fase de aclimatación

Para el tipo de sustrato no hubo diferencias significativas sobre el porcentaje de aclimatación y los valores observados son muy cercados entre ellos (Tabla 7).

El sustrato comercial Premix #8 presenta en su composición musgo y vermiculita, mientras que las pastillas jiffys #30 están compuestas de musgo en mayor porcentaje.

Tabla 7. Efecto del tipo de sustrato sobre el porcentaje de aclimatación en el acondicionamiento de plántulas provenientes de la micropropagación de *Prosopis pallida*. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Sustrato	Porcentaje de aclimatación (%)
Jiffys	93,3 a
Sustrato comercial	100 a



Figura 4. Plántulas de *Prosopis pallida* provenientes del cultivo *in vitro*.

Buendía *et al.* (2007), presentaron resultados de 100 por ciento de plántulas aclimatadas de *Prosopis laevigata* en un sustrato con la misma composición que el premix. Del mismo modo, Minchala *et al.* (2014), obtuvieron un 90 por ciento de aclimatación de plántulas de *Prosopis limensis* en un sustrato de turba con suelo negro y un bajo porcentaje de aclimatación en un sustrato 100% de turba como se presenta en el presente trabajo. Mientras que Venkatachalam *et al.* (2017), obtuvieron un 70% de porcentaje de supervivencia aclimatizando los explantes en vasos con arena y suelo (1:1) antes de colocarlos en el invernadero para su desarrollo.

CONCLUSIONES

Este trabajo describe un ensayo de tratamientos pregerminativos, un protocolo de desinfección superficial de semillas para la germinación *in vitro* y un protocolo para la micropropagación de *Prosopis pallida* a partir de yemas apicales. Se ha logrado un porcentaje de germinación de 36,7% en cuatro semanas con la inmersión de las semillas en agua a 80°C durante 10 minutos. Para la propagación *in vitro* se logró 2,4 brotes inducidos por yema axilar y una formación de 3,6 nudos axilares por cada yema apical cultivada. Durante la fase de enraizamiento se ha logrado 53,3% de microestacas enraizadas y el 100% de plántulas aclimatadas.

Estos resultados son importantes como inicio de investigaciones de propagación *in vitro* de *Prosopis pallida* ya que permiten la conservación de la especie debido a que se están perdiendo poblaciones de esta especie. Además, es un inicio para futuros programas de mejoramiento genético de *Prosopis pallida* en el Perú, para mantener las características genéticas de individuos seleccionados y evitar la alta variabilidad genética en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Instituto Nacional de Innovación Agraria por su apoyo financiero para el desarrollo del presente proyecto y a la Facultad de Ciencias Forestales por permitir el uso de las instalaciones del laboratorio de silvicultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albán, L; Matorel, M; Trías, J; Vera, J. (2003). Reforestación extensiva con algarrobo (*Prosopis pallida*) en la región desértica de Piura, Perú. *Zonas áridas*, (7), 244-252.
- Arce, P; Balboa, O. (1991). Seasonality in rooting of *Prosopis chilensis* cuttings and *in vitro* propagation. *Forest Ecology & Management*, 40 (1991), 163-173.
- Arévalo, J. (1998). Tratamientos para mejorar la germinación de semillas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y algarrobo (*Prosopis* spp.). Tesis Ing. Agrónomo. Zamorano, Honduras, Universidad Zamorano. 43p.
- Buendía, L; Orozco, J; Cruz, Francisco, Chávez, V; Vernon, E. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M.C. Johnston). I via cotyledonary nodes. *In vitro Cell Dev. Biol. - Plant.*, 43, 260-266.
- Castro, D; Díaz, J; Linero, J. (2002). Propagación clonal *in vitro* de árboles elite de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 49 - 53.
- Flor, E. (2013). Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K. Quito, Ecuador, Universidad Central de Ecuador, p 91.
- Juárez, J; Alvaro, M; Valdez, R. (2001). Escarificación de semillas de mezquite (*Prosopis laevigata*) para aumentar la eficiencia en la germinación (en línea). 5ta Jornada de Investigación. Universidad Autónoma de Zacatecas. Consultado 14 ago. 2016, Disponible en <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/CD%20Jornadas%202000%20%202001/Agropecuarias/PDF/ap01-001.pdf>.
- Llerena, C; Silvestre, E; Yalle, S. (2014). Los bosques y el cambio climático en el Perú: situación y perspectivas. Lima, Perú, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), p 73.

- Lloyd, G; McCown, B. (1980). Commercially-fasible Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia eatifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 52, 882-883.
- Medel, A; Flores, A; Armendáriz, S; Santamaría, E. (2001). Técnicas de desinfección y siembra *in vitro* de embriones maduros de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) Shumann), (Cactaceae). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 2(1), 53-59.
- Minchala, J. Poma, R; Muñoz, L; Yaguana, M; Gonzáles, D; Eras, V; Rojas, D; Delgado, G. (2014). Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. In Hook. (Fabaceae – Mimosoideae). *Quebracho*, 22(1,2), 88-99.
- Morales, J; Sabás, D; Garcidueñas, C; Pérez, E. (2019). Germination, *in vitro* propagation and soil acclimatization of *Acacia farnesiana* and *Prosopis laevigata*. *South African Journal of Botany*, 124 (2019) 345–349.
- Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarium*, 15, 473-497.
- Otovo, J. (2015). Aportes para un manejo sostenible del ecosistema bosque tropical seco de Piura. Piura, Perú, Asociación para la investigación y desarrollo integral (AIDER), p 66.
- Passera, C. (2000). Fisiología de *Prosopis* spp. *MULTEQUINA*, 9(2), 53-80.
- Prokopiuk, D; Chifa, C. (2000). Comparación de tratamientos pre germinativos en semillas de algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb.). *Comunicaciones científicas y Tecnológicas*, 2000: 4p.
- Sobrevilla, J; López, M; López, A; Romero, L. (2013). Evaluación de diferentes tratamientos pregerminativos y osmóticos en la germinación de semillas de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston. In Pulido, G; Monk, S (eds.). *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. 2ed. Lincoln, Estados Unidos, Zea Books. p. 83-95.
- Tabone, T; Felker, P; Bingham, R; Reyes, I; Loughrey, S. (1986). Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B₂V₅₀. *Forest Ecology and Management*, 16, 191-200.
- Tapia, A; Romero, A; Luque, V; Allolio, P; Nuñez, L; Aybar, S. (2012). Diferentes técnicas de ruptura de dormición y absorción de agua en semillas de *Prosopis chilensis*. *Biología en agronomía*, 2(2):7-5.
- Udayabhanu, J; Madhappan, G; Durai, M; Naseem, A; Natesan, G; Shivendra, V. (2017). Role of silver nitrate in plant regeneration from cotyledonary nodal segment explants of *Prosopis cineraria* (L.) Druce.: A recalcitrant medicinal leguminous tree. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 286-291.