

Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae - Mimosoideae)

In vitro propagation of *Prosopis limensis* Benth.in Hook. (Fabaceae - Mimosoideae)

Minchala-Patiño, J¹; R. Poma-Angamarca¹; L. Muñoz-Chamba¹; M. Yaguana-Arévalo¹; D. González-Zaruma²; V. H. Eras-Guamán¹; C. Rojas-Idrogo³ y G. E. Delgado-Paredes³

Recibido en marzo de 2014; aceptado en agosto de 2014

RESUMEN

Prosopis limensis Benth. in Hook. es una especie arbórea nativa que crece en el bosque estacionalmente seco y es importante por su producción de leña y forraje y la protección del medio ambiente. Los resultados de esta investigación fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y al test de Tukey. La germinación *in vitro* de semillas con escarificación física y química fue 100% mientras que el enraizamiento de estacas fue 0%. En cultivo de tejidos, ápices caulinares de plántulas de 5 cm de altura, obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, alcanzaron la mayor elongación del brote en los medios de cultivo MS suplementados con KIN 0,2 mg L⁻¹, mostrando diferencias significativas solo respecto a los tratamientos BAP 0,2 mg L⁻¹ y KIN 2,0 mg L⁻¹. En otros tratamientos ensayados, ANA 0,2 mg L⁻¹ + KIN 0,2 mg L⁻¹, AIA 0,2 mg L⁻¹ + KIN 0,2 mg L⁻¹ y AIA 0,02 mg L⁻¹ + AG₃ 0,02 mg L⁻¹, si bien se alcanzó una mayor elongación del brote, los resultados no fueron significativos. El número de brotes formados no fue mayor de 2, en medio de cultivo suplementado con KIN 1,0 mg L⁻¹ + sulfato de adenina 25 mg L⁻¹, mientras que el enraizamiento fue mejor en medio de cultivo suplementado con AIB 1,0 mg L⁻¹. La aclimatación en invernadero alcanzó 90% de supervivencia. Este artículo reporta un método simple y efectivo de micropropagación de *P. limensis* a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, puesto que si bien la tasa de brotamiento fue baja, el número de nudos formados por plántula fue alto.

Palabras claves: Aclimatación; Cultivo de tejidos; Bosque estacionalmente seco; Escarificación; Propagación clonal.

ABSTRACT

Prosopis limensis Benth.in Hook is a native tree species that grows in the seasonally dry forest and is important for firewood and forage production and environmental protection. The results of this research were submitted to variance analysis (ANOVA) of a single factor, nonparametric Kruskal-Wallis and Tukey's test. *In vitro* seed germination with physical and chemical scarification was 100% while rooting of cuttings was 0%. In tissue cultures, shoot-tip of 5 cm height seedlings obtained from *in vitro* germinated seeds, reached the highest bud elongation in MS culture media supplemented with 0.2 mg L⁻¹ KIN, showing significant differences only about in relation to 0.2 mg L⁻¹ BAP and 2.0 mg L⁻¹ KIN. In other treatments tested, i.e. 0.2 mg L⁻¹ NAA + 0.2 mg L⁻¹ KIN, 0.2 mg L⁻¹ IAA + 0.2 mg L⁻¹ KIN and 0.02 mg L⁻¹ IAA + 0.02 mg L⁻¹ GA₃ although increased bud elongation was reached, the results were not significant. The number of shoots formed was not more than 2, in the culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ KIN + 25 mg L⁻¹ adenine sulphate, while rooting was better in the culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ IAA. The survival rate during greenhouse acclimatization was of 90%. This paper reports a simple but effective method to micropropagate *P. limensis* from apical shoots and nodal segments of seedlings obtained by *in vitro* germinated seeds, since although the sprouting rate was low, the number of nodes formed per seedling was significantly higher.

Key words: Acclimatization; Tissue culture; Seasonally dry forest; Scarification; Clonal propagation.

¹ Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja, Ciudadela Guillermo Falconí, Loja, Ecuador.

² Faculdade de Ciências Agrônomicas, FCA-Botucatu/UNESP-R. José Barbosa de Barros, 1780 - Botucatu/SP, Brasil.

³ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria Juan XXIII N° 391, Lambayeque, Perú. E-mail: guidelg2001@yahoo.es

1. INTRODUCCIÓN

Prosopis limensis Benth. in Hook es una de las especies leñosas más importante del bosque seco ecuatorial o bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú, comprendiendo la costa de las regiones Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de La Libertad así como el piso inferior del valle del Marañón. Estas dos áreas se comunican a través del Paso de Porculla (Piura), una depresión de 2100 msnm de elevación, considerada la más baja de la Cordillera de los Andes (Brack y Mendiola, 2004). El bosque seco es considerado de importancia biológica por ser un ecosistema singular, muy amenazado y poco conocido, con presencia de especies endémicas y un importante grado de diversidad local y regional en una superficie reducida; por esta razón ha sido recientemente incluido entre los “puntos calientes” o “hotspots” del mundo, para su estudio y conservación (Mittermeier *et al.*, 2005).

Las especies de algarrobo del BES constituyen el recurso forestal más importante que tiene el bosque seco en el Ecuador y Perú y su utilización como madera de construcción y combustible (leña y carbón) se remonta desde tiempos pre-colombinos, en especial por las culturas que se desarrollaron en la costa peruana. Durante la colonización española, y ya en tiempos de la república, los grandes bosques de algarrobo que se extendían hasta Camaná en Arequipa (Perú) fueron talados indiscriminadamente hasta su total desaparición, quedando restringidos a pequeños relictos en el norte del Perú y sur del Ecuador que se mantienen por regeneración natural gracias a las lluvias ocasionales originadas por el fenómeno de El Niño. En la actualidad, estos algarrobales se agrupan en pequeños bosques-relictos, caracterizados por su alta tolerancia a la sequía, rápido crecimiento y significativa producción de biomasa (Jordán y Balboa, 1985), y sustentan una intensiva crianza de caprinos, diversas actividades apícolas, así como una industria artesanal consistente en la elaboración de la algarrobina, un fermento dulce que se prepara por la cocción de los frutos maduros.

La importancia de las especies del género *Prosopis* no solamente ha resultado fundamental para las poblaciones indígenas ancestrales de América del Sur sino también para poblaciones indígenas de otras partes del mundo como de América Central, África y Asia, razón por la cual la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) viene implementando diversos programas que permitan su utilización en gran escala puesto que se le considera el recurso genético forestal que ofrece nuevas alternativas y mejores opciones para el desarrollo de las regiones áridas y semiáridas del mundo (Riveros, 1992).

Las especies de *Prosopis* se propagan normalmente por semilla; sin embargo, es importante la propagación vegetativa si la finalidad es clonar plantas élites aprovechando la alta variabilidad de las poblaciones naturales (Leakey y Last, 1980), utilizar los especímenes resultantes de las hibridaciones naturales (Felker, 1983) e inducir, en estacas de plantas adultas, un apropiado sistema radicular que supere las dificultades que presentan los suelos de las regiones donde habitan (Felker, 1992). No obstante, la capacidad de enraizamiento de las estacas de algarrobo es muy variable, existiendo especies con tasas de enraizamiento superiores a 80% como en *Prosopis juliflora* y *P. glandulosa* y menores de 10% como en *P. cineraria* y *P. tamarugo* (De Souza, 1993; Harris, 1992) y entre 30 y 80% como en *P. alba* (Klass *et al.*, 1987; Oberschelp y Marcó, 2010). Por otro lado, las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, con su alta tasa de multiplicación, resultarían una buena alternativa para la propagación asexual de árboles selectos. Los primeros trabajos sobre propagación *in vitro* fueron realizados utilizando plantas jóvenes de *P. tamarugo* y *P. chilensis* (Jordan y Balboa, 1985; Jordan, 1987), *P. alba* (Jordan *et al.*, 1985; Tabone *et al.*, 1986; Castillo de Meier y Bovo, 2000), *P. juliflora* (Nandwani y Ramawat, 1991) y *P. cineraria* (Goyal y Arya, 1984; Shekhawat *et al.*, 1993), entre otros, mientras que plantas de *P. cineraria* han sido también propagadas a partir de segmentos de hipocótilos (Goyal y Arya, 1981) y de nudos cotiledonares en *P. glandulosa* var. *torreyana* (Rubluo *et al.*, 2002) y *P. laevigata* (Buendía-González *et al.*, 2007). En ningún caso la producción de plantas fue en gran escala. Con respecto al bosque estacionalmente seco del

Ecuador y Perú, la literatura no reporta trabajos en cultivo de tejidos de especies nativas de *Prosopis*.

En este trabajo se desarrollaron protocolos para la germinación *in vitro* de semillas y la micropropagación del algarrobo *Prosopis limensis* Benth. in Hook., mediante el cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal e Invernadero del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja (UNL), Ecuador y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos Vegetales de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque-Perú.

Material vegetal

Se utilizaron frutos maduros (vainas) colectados entre abril - julio de 2012 de dos especímenes de “algarrobo” crecidos en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, Perú (UTM 17M 620559 9258392; 620702 9258440). Las plantas tenían una edad promedio de 35 años, 12 - 15 m de altura, 1,20 m de circunferencia y fuste de 8 - 10 m, ligeramente curvado, considerándoseles plantas élites. En el caso de estacas, éstas se seleccionaron de plantas mayores de 25 años, crecidas en el trayecto Macará - Zapotillo, localidad El Algodonal (UTM 17M 604957 9526445) (Macará, Ecuador). Las plantas fueron identificadas por el Dr. Guillermo E. Delgado de la UNPRG como *Prosopis limensis* Benth. in Hook, en base a comparaciones con muestras de herbario y a la descripción morfológica realizada por Vásquez *et al.* (2010). Las semillas se conservaron en frascos de vidrio en refrigeración a 10 °C en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal (UNL) y las muestras de herbario, en cartulinas y protegidas con naftalina en el Herbario HPRG (UNPRG).

Selección y sembrado de estacas

Se colectaron estacas de 25 - 30 cm de largo y 1 - 2 cm de diámetro de las regiones inferior y media de la copa del árbol y se envolvieron en papel periódico húmedo para evitar la deshidratación. En el invernadero se desinfectaron con una solución fungicida - bactericida Benlate (Benomyl 0,2%) - Kasumin (Kasugamicina 2%) durante 5 min y se trataron con los enraizantes comerciales Root-Hor y Hormonagro. Root-Hor es un enraizante líquido a base de ácido α -naftaleneacético 0,4%, ácido indol-3-butírico 0,1%, ácidos nucleicos 0,1%, sulfato de zinc 0,4% y solución nutritiva 95,4% y en su preparación se diluyó 5 ml de la solución en 1 L de agua, sumergiendo 3 - 5 cm de la estaca durante 5 min. Hormonagro es un enraizante en polvo a base de ácido α -naftaleneacético 0,4% e ingredientes inertes 99,6% y se lo preparó con agua formando una masa pastosa que se aplicó en 3 cm de la base de la estaca. Posteriormente, las estacas se sembraron en bolsas de polietileno conteniendo sustrato esterilizado de suelo:arena:humos (1:1:1). Asimismo, se evaluaron tres modalidades de estacas: recto, de mazo y de tacón o talón (Hartmann *et al.*, 2011). En cada tratamiento se ensayaron 15 estacas y el experimento se repitió tres veces. Adicionalmente, cada 15 días y durante los 60 días que duró el experimento, las estacas se asperjaron con una solución de $AG_3 1 \text{ mg L}^{-1} + BAP 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ con la finalidad de inducir brotamiento de las yemas axilares. Las condiciones ambientales del invernadero fueron 19,0 °C (máx. 22,1 y mín. 15,9 °C) y 82,2% HR.

Selección, escarificación y cultivo de semillas

Después de seleccionar los mejores frutos, por su forma, tamaño, peso y condición fitosanitaria y secarlos a temperatura ambiente, se extrajeron las semillas y guardaron en refrigeración a 10 °C. Las semillas fueron escarificadas por tres métodos: físico, con agua caliente (50 - 70 °C) con permanencia hasta alcanzar temperatura ambiente; químico, con HCl 36,5% durante 5 min y mecánico, con papel abrasivo (lija), lijándolas en el extremo dorsal. Luego se colocaron en frascos en grupos de 50 para su desinfección, en cámara de flujo laminar. Las semillas que sirvieron de testigo no fueron escarificadas.

La semillas se desinfectaron con alcohol etílico 70% durante 1 min y lejía comercial (Clorox® 5.5% de hipoclorito de sodio) durante 15 min. Ambos desinfectantes se removieron con tres enjuagues de agua destilada esterilizada con permanencia del agua durante 1 min, utilizando el agua del último enjuague para la imbibición durante 24 h. El medio de cultivo incluyó las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con las vitaminas tiamina HCl 1,0 mg L⁻¹ y m-inositol 100 mg L⁻¹, sacarosa 2%, agar-agar 0,6% y ácido giberélico (AG₃) 0,0; 0,5 y 1,0 mg L⁻¹. Este medio de cultivo fue dispensado en frascos de vidrio de 10 cm de altura y 5 cm de diámetro, cultivándose tres semillas por frasco con un total de 15 semillas por tratamiento.

Cultivo de ápices caulinares

Después de germinadas las semillas *in vitro* y cuando las plántulas alcanzaron una altura de 5 cm, los ápices caulinares, con cotiledones y 1 a 1,5 cm de hipocótilo, fueron removidos y cultivados en varios tratamientos de medio de cultivo, de igual formulación al utilizado en la germinación de semillas, excepto que en el balance hormonal se ensayó 0,2 y 2,0 mg L⁻¹ de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y 2-isopentenil adenina (2iP), tanto de manera individual o en combinación con 0,2 mg L⁻¹ de las auxinas ácido indol-3-acético (AIA) y ácido naftaleneacético (ANA). Además, se ensayó el efecto de las combinaciones AIA (0,02 mg L⁻¹) y ANA (0,02 mg L⁻¹) con AG₃ (0,02; 0,2 y 2,0 mg L⁻¹).

Inducción de múltiples brotes

En este proceso se utilizaron ápices caulinares de 5 cm de altura, con cotiledones y 1 a 2 nudos formados, provenientes de plántulas de semillas germinadas *in vitro*. El medio de cultivo fue suplementado con 1,0 mg L⁻¹ de las citocininas BAP, KIN y 2iP, en varias combinaciones con las sustancias orgánicas complejas sulfato de adenina (5,0 y 25,0 mg L⁻¹) y agua de coco 20%.

Inducción de raíces

En este proceso se utilizaron ápices caulinares de 3 cm de altura provenientes de plántulas de 5 a 8 cm de altura obtenidas del cultivo de ápices caulinares anteriormente descrito. El medio de cultivo incluyó las auxinas ácido indol-3-butírico (AIB), AIA y ANA, en concentraciones de 0,1; 0,5 y 1,0 mg L⁻¹.

Tanto en las fases del cultivo de ápices caulinares, inducción de múltiples brotes e inducción de raíces, se cultivaron 2 explantes por frasco con un total de 16 explantes por tratamiento.

Preparación y esterilización del medio de cultivo y condiciones ambientales de incubación

El medio de cultivo ensayado en todos los procesos morfogénicos estudiados, después de incorporado los componentes inorgánicos y orgánicos, se ajustó a pH 5.8 ± 0.2 con KOH y HCl 0.1N, antes de la incorporación del agar. Se dispensó en frascos de vidrio, a razón de 30 ml

por frasco, esterilizándose posteriormente en autoclave a 121 °C de temperatura y 121 lbs/pulg² de presión durante 20 minutos. Las condiciones ambientales de incubación se ajustaron en 24 - 26 °C de temperatura, fotoperiodo 16/8 h (día/noche) con 2 - 5 W.m⁻² de irradiancia, en la germinación de semillas, mientras que para el cultivo de ápices caulinares, inducción de múltiples brotes y enraizamiento, la irradiancia se incrementó entre 8 - 10 W.m⁻².

Aclimatación

En el proceso de aclimatación, como fase previa para su establecimiento en campo, se utilizaron plántulas de 5 - 7 cm de altura, con más de cuatro hojas primarias y un buen sistema radicular. Las plántulas *in vitro* fueron sembradas en los siguientes sustratos esterilizados: sustrato 1, suelo negro + turba (2: 1); sustrato 2, turba 100% y sustrato 3, suelo negro + humus (2:1) y cubiertas con una envoltura de plástico asperjada con agua en su interior simulando una condición de alta humedad.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron aplicando el programa SPSS 16.0 con intervalo de confianza del 95% a fin de establecer diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0,05$). Para los datos que presentaron normalidad y varianzas homogéneas se utilizaron el análisis estadístico ANOVA de un solo factor y Prueba de Tukey, mientras que a los datos que no los presentaron, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 2009).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo *in vitro* de semillas

Semillas con escarificación física y química mostraron tasas absolutas (100%) de germinación, en los tres tratamientos de AG₃ ensayados, mientras que con escarificación mecánica la tasa de germinación fue 60% y los tratamientos testigos 70% (Tabla 1). La contaminación por hongos y bacterias osciló entre 7 a 27%, mayormente en semillas con escarificación mecánica, posiblemente por el ingreso de los contaminantes durante el proceso, y en ningún caso se observó fenolización. La germinación se inició entre 24 a 36 h de cultivadas las semillas, con la emergencia de la radícula, y más del 90% de las plántulas mostraron un crecimiento rápido y desarrollo normal, alcanzando una altura media de 5 a 8 cm después de 30 días de cultivo; las plántulas anormales fueron menos de 5%. La germinación de las semillas es definida como la reanudación del crecimiento del embrión y la protrusión de la radícula desde las estructuras de la testa (Rao *et al.*, 2007) y las plántulas se consideraron normales puesto que poseían estructuras adecuadas de raíces y brotes, esenciales para su desarrollo posterior; las plántulas anormales no tienen capacidad para desarrollarse y sufren deficiencia, descomposición o debilidad en sus sistemas de raíces y brotes (AOSA, 2005).

Tabla 1. Germinación *in vitro* de semillas de *Prosopis limensis* en tres concentraciones de ácido giberélico (AG₃) y tres métodos de escarificación (físico, químico y mecánico)

Tratamiento con AG ₃ (mg L ⁻¹)	Control (sin escarificación)	Con escarificación		
		Físico	Químico	Mecánico
0,0	70 ± 2,5 a	100	100	60 ± 4,2 a
0,5	70 ± 3,0 a	100	100	60 ± 3,6 a
1,0	70 ± 2,8 a	100	100	60 ± 1,0 a

En trabajos realizados en diversas especies de algarrobos como en *P. alba*, las semillas fueron escarificadas con papel abrasivo antes del cultivo *in vitro* (Castillo de Meier y Bovo, 2000) y en *Prosopis glandulosa* var. *torreyana*, nativa de México, las semillas fueron germinadas después de un tratamiento de escarificación con H_2SO_4 concentrado durante 30 min, previo al tratamiento de desinfestación convencional *in vitro* (Rubluo *et al.*, 2002); sin embargo, no se reportó la tasa de germinación ni el tiempo de inicio.

Propagación por estacas

En 60 días de evaluación, el 100% de las estacas no mostró formación de brotes ni enraizamiento; por el contrario, las estacas iniciaron un proceso de desecación y muerte que se extendió hasta los 90 días.

Oberschelp y Marcó (2010) observaron en *P. alba* 45% de enraizamiento en estacas herbáceas con AIB 5 mg L^{-1} y 25% de enraizamiento en estacas semileñosas con AIB $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtenidas de plantas recepadas de 6 años de edad, sin que en ambos casos el AIB ejerciera efecto alguno en la altura de planta y muy ligeramente superior en el enraizamiento respecto al tratamiento testigo sin suplemento de AIB. Es posible que estas diferencias encontradas, respecto al trabajo que se presenta, obedezcan a que utilizaron estacas herbáceas y semileñosas, recepadas de plantas jóvenes.

Por otro lado, varios informes indicaron que el potencial de enraizamiento de las estacas de algarrobo depende de la especie. Así, en *P. juliflora* y *P. glandulosa* se reportaron tasas de enraizamiento superiores a 80%, mientras que en *P. cineraria* y *P. tamarugo* menores de 10% (Dick *et al.*, 1991; Harris, 1992; De Souza, 1993). Es posible que no solamente factores genéticos estén influenciando en el proceso sino también factores fisiológicos inherentes a las plantas y factores ambientales, tal como fue reportado por Klass *et al.* (1985), quienes demostraron que la mayor tasa de enraizamiento de *P. alba* se alcanzó en $35 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 12 h y elevada intensidad lumínica; condiciones muy distantes a la ofrecidas a *P. limensis* en el presente trabajo. Sin embargo, es posible que puedan utilizarse otras metodologías como la propagación por acodos aéreos y la mini-injertación, tal como se informó en *P. alba* (Ewens y Felker, 2003).

Elongación de ápices caulinares

Sobre el efecto de las citocininas BAP, KIN y 2iP en la elongación de ápices caulinares, los resultados (Tabla 2) mostraron que, en 90 días de cultivo, el tratamiento con KIN $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ sólo difirió de los tratamientos con BAP $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ y KIN $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, respecto a los demás tratamientos, en altura de plántula (prueba de Tukey $p < 0,05$) y longitud del brote (prueba de Kruskal-Wallis $p < 0,05$) con 5,59 cm y 0,39 cm de altura, respectivamente, mientras que en el resto de tratamientos ensayados, los resultados fueron ligeramente inferiores, en especial en los tratamientos con BAP 2,0 y 2iP $2,0 \text{ mg/L}^{-1}$. No se observaron diferencias en el número de nudos formados por plántula, oscilando entre 6,3 y 9,6, lo que aseguraría una alta tasa de propagación por nudos; sin embargo, el número de brotes formados no fue mayor de 2,8.

Tabla 2. Efecto de las citocininas BAP, KIN y 2iP, en la elongación de ápices caulinares de *Prosopis limensis*

Tratamientos (mg L ⁻¹)			Respuestas morfológicas			
BAP	KIN	2iP	Altura (cm)	Nudos (N°)	Brotos (N°)	Longitud del brote (cm)
0,2			3,44 ± 0,22 a	6,6 ± 0,63 a	2,5 ± 0,31 a	0,20 ± 0,05
2,0			4,47 ± 0,35 ab	9,6 ± 0,82 a	2,8 ± 0,24 a	0,23 ± 0,05
	0,2		5,59 ± 0,53 b	9,6 ± 0,61 a	2,5 ± 0,32 a	0,39 ± 0,05*
	2,0		3,50 ± 0,33 a	6,4 ± 0,81 a	2,0 ± 0,27 a	0,18 ± 0,02
		0,2	4,12 ± 0,22 ab	6,3 ± 0,57 a	2,8 ± 0,37 a	0,23 ± 0,02
		2,0	4,91 ± 0,38 ab	9,1 ± 1,17 a	2,5 ± 0,22 a	0,29 ± 0,03

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ANOVA aplicando el test de Tukey (p<0,05).

*Difiere del resto de tratamientos (Prueba Kruskal-Wallis p≤ 0,05).

Los resultados de las combinaciones auxinas - citocininas, en 90 días de cultivo (Tabla 3), indicaron que los tratamiento ANA 0,2 + KIN 0,2 mg/L⁻¹, AIA 0,2 + BAP 0,2 mg L⁻¹ y AIA 0,2 + KIN 0,2 mg L⁻¹, en lo referente a altura de plántulas (prueba de Tukey p<0,05) con 5,39 cm; 5,15 cm y 5,29 cm, respectivamente, se destacaron sobre los demás tratamientos pero sin mostrar diferencias significativas. Un resultado similar se observó en el número de nudos formados y longitud del brote, aunque el número de brotes formados resultó inferior a lo observado en los tratamientos donde se utilizó únicamente citocininas.

Tabla 3. Efecto de la interacción citocininas (BAP, KIN y 2iP) con auxinas (ANA y AIA), en la elongación de ápices caulinares de *Prosopis limensis*

Tratamientos (mg L ⁻¹)			Respuestas morfológicas			
ANA 0,2			Altura (cm)	Nudos (N°)	Brotos (N°)	Longitud del brote (cm)
BAP	KIN	2iP				
0,2			4,87 ± 0,45 ab	6,5 ± 1,24	1,3 ± 0,15	0,24 ± 0,04ab
2,0			4,53 ± 0,31 ab	7,3 ± 1,10	1,6 ± 0,22	0,20 ± 0,03 ab
	0,2		5,39 ± 0,52 b	9,2 ± 1,62	1,2 ± 0,13	0,34 ± 0,05 b
	2,0		4,50 ± 0,47 ab	6,2 ± 1,65	1,3 ± 0,14	0,24 ± 0,04 ab
		0,2	3,09 ± 0,32 a	3,0 ± 0,66	1,0 ± 0,00	0,12 ± 0,03 a
		2,0	4,14 ± 0,34 ab	5,7 ± 1,06	1,4 ± 0,24	0,20 ± 0,03 ab
AIA 0,2			Altura (cm)	Nudos (N°)	Brotos (N°)	Longitud del brote (cm)
BAP	KIN	2iP				
0,2			5,15 ± 0,27 b	8,6 ± 0,92*	1,7 ± 0,21	0,25 ± 0,02 ab
2,0			4,50 ± 0,43 ab	6,4 ± 1,34	1,4 ± 0,16	0,21 ± 0,04 ab
	0,2		5,29 ± 0,33 b	8,8 ± 1,17*	1,7 ± 0,22*	0,28 ± 0,03 ab
	2,0		4,14 ± 0,34 ab	7,1 ± 1,55	1,6 ± 0,23	0,18 ± 0,03 ab
		0,2	4,67 ± 0,38 ab	6,2 ± 1,31	1,9 ± 0,29*	0,17 ± 0,03 a
		2,0	3,99 ± 0,49 ab	5,9 ± 1,84	1,1 ± 0,07	0,19 ± 0,05 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ANOVA aplicando el test de Tukey (p < 0,05).

*Difiere del resto de tratamientos (Prueba Kruskal-Wallis p≤ 0,05).

Los resultados de la combinaciones auxinas - giberelinas (Tabla 4), en 90 días de cultivo, indicaron que el tratamiento AIA 0,02 + AG₃ 0,02 mg/L⁻¹ superó al resto de tratamientos ensayados, en especial en altura de plántula y número de nudos formados con 6,03 cm y 10,2 cm, respectivamente, aunque sin mostrar diferencias significativas. Al respecto, Tabone *et al.* (1986) informaron que segmentos nodales de plantas jóvenes de *P. alba* clon B₂V₅₀, de 1 - 2 años de edad y crecidas en invernadero, indujeron múltiples brotes en número mayor de siete en medio de cultivo MS suplementado con BA 4,4 x 10⁻⁵ (10 mg/L⁻¹) y BA 6.7 x 10⁻⁵ M (15 mg/L⁻¹) - AIA 2.9 x 10⁻⁵ M (5 mg/L⁻¹), en 90 días de incubación. Asimismo, el desarrollo de hojas fue mejor en medio de cultivo suplementado con KIN 0,015 - AIA 0,5 mg/L⁻¹. En dicho trabajo no se reportó enraizamiento pero sí el efecto de diversas fuentes nitrogenadas en la condición

fisiológica de las plántulas, destacando el rol estimulador del nitrato (NO_3^-), incorporado como NaNO_3 y la glutamina, así como el rol inhibitor del amonio, incorporado como NH_4Cl (Tabone et al., 1986). Estos resultados fueron similares a los reportados en el trabajo que se presenta.

Tabla 4. Efecto de las combinaciones auxinas ANA y AIA con la giberelina AG_3 , en la elongación de ápices caulinares de *Prosopis limensis*

Tratamientos (mg L^{-1})			Respuestas morfológicas			
ANA	AIA	AG_3	Altura (cm)	Nudos (N^0)	Brotes (N^0)	Longitud del brote (cm)
0,02		0,02	4,69 ± 0,41 ab	8,1 ± 0,91 ab	1,2 ± 0,10	0,29 ± 0,04 a
0,02		0,2	4,55 ± 0,41 ab	5,5 ± 0,98 a	1,1 ± 0,08	0,25 ± 0,05 a
0,02		2,0	4,93 ± 0,39 ab	7,4 ± 1,00 ab	1,4 ± 0,22	0,28 ± 0,03 a
	0,02	0,02	6,03 ± 0,32 b	10,2 ± 1,10 b	1,2 ± 0,13	0,38 ± 0,04 a
	0,02	0,2	4,37 ± 0,45 a	6,0 ± 1,35 ab	1,0 ± 0,00	0,24 ± 0,05 a
	0,02	2,0	4,53 ± 0,51 ab	7,6 ± 1,64 ab	1,4 ± 0,22	0,24 ± 0,04 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando el test de Tukey, ANOVA ($p < 0,05$).

En *P. alba* se observó alrededor de 70% de elongación de ápices caulinares en segmentos nodales de plántulas de 20 días de edad en medio de cultivo MS suplementado con la combinación ANA o AIB $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ - KIN $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, después de 60 días de cultivo. Se observaron resultados similares en segmentos nodales de plantas de 5 y 20 años de edad, pero en medio de cultivo suplementado con la combinación ANA $0,1$ - BAP $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Castillo de Meier y Bovo, 2000). En segmentos nodales de plantas jóvenes de 4 meses de edad crecidas en invernadero y en plantas adultas de 10 a 16 años crecidas en su ambiente natural, de *P. chilensis*, se observó una mayor elongación de brotes en medio de cultivo suplementado con BA $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ y AIA, AIB o ANA 3 mg L^{-1} , destacando la combinación BA - AIB (Caro et al., 2002). Estos resultados también fueron similares a los obtenidos en el trabajo que se presenta, puesto que varias combinaciones de ANA + BAP y ANA + KIN favorecieron la elongación de ápices caulinares.

Inducción de brotes

Los resultados de las combinaciones citocininas - sustancias complejas, en 90 días de cultivo (Tabla 5), indicaron que el tratamiento KIN $1,0$ +sulfato de adenina 25 mg L^{-1} presentó diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$), en lo referente a altura de plántulas, número de nudos formados y longitud del brote, con $5,89 \text{ cm}$, $6,1 \text{ cm}$ y $0,31 \text{ cm}$, respectivamente. Dun-Yi et al. (1989) informan que segmentos nodales de plantas de *Prosopis chilensis*, *P. cineraria* y *P. juliflora*, de 3 a 12 meses de edad y crecidas en invernadero, indujeron múltiples brotes en medio de cultivo suplementado con BA 10 y 15 mg L^{-1} , concentraciones inusualmente altas, puesto que en el presente trabajo, las concentraciones de BAP mayores de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (datos no mostrados en tablas) originaron engrosamiento en los explantes y tejidos corchosos. En *P. laevigata* se obtuvieron $3,4$ brotes en medio de cultivo MS suplementado con $2,4\text{-D}$ $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ y BA $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, en nudos cotiledonares (Buendía-González et al., 2007); asimismo, segmentos nodales de plantas maduras de *P. cineraria* indujeron múltiples brotes en medio de cultivo MS suplementado con varias combinaciones de citocininas - auxinas, destacando la combinación BAP 5 - AIA $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Kumar y Singh, 2009).

Tabla 5. Efecto de la combinación de las citocininas BAP, KIN y 2iP con las sustancias complejas sulfato de adenina y agua de coco en la inducción de brotes en ápices caulinares y segmentos nodales de *Prosopis limensis*

Tratamientos		Respuestas morfológicas			
S. adenina (mg L ⁻¹)	Agua de coco (%)	Altura (cm)	Nudos (N°)	Brotes (N°)	Longitud del brote (cm)
BAP 1,0 mg L⁻¹					
5,0		3,65 ± 0,35	2,4 ± 1,06	1,15 ± 0,15	0,06 ± 0,02
5,0	20,0	3,26 ± 0,09	1,9 ± 0,12	1,00 ± 0,00	0,09 ± 0,01
25,0		3,67 ± 0,24	3,9 ± 1,07	1,21 ± 0,21	0,16 ± 0,02
25,0	20,0	4,67 ± 0,45	4,4 ± 0,82	1,44 ± 0,20	0,19 ± 0,04
KIN 1,0 mg L⁻¹					
5,0		5,14 ± 0,53	6,3 ± 1,47	1,33 ± 0,18	0,25 ± 0,04
5,0	20,0	4,08 ± 0,26	3,3 ± 0,59	1,00 ± 0,00	0,16 ± 0,03
25,0		5,89 ± 0,27*	6,1 ± 0,34*	1,25 ± 0,11	0,31 ± 0,02*
25,0	20,0	4,85 ± 0,59	5,8 ± 1,23	1,33 ± 0,18	0,21 ± 0,05
2iP 1,0 mg L⁻¹					
5,0		4,72 ± 0,52	5,3 ± 1,17	1,19 ± 0,18	0,22 ± 0,05
5,0	20,0	3,84 ± 0,31	2,4 ± 0,63	1,00 ± 0,00	0,12 ± 0,03
25,0		3,74 ± 0,26	2,4 ± 0,45	1,00 ± 0,00	0,10 ± 0,02
25,0	20,0	4,55 ± 0,59	5,2 ± 1,51	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,06

* Diferencia significativa entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$).

Enraizamiento

Los resultados del efecto de las auxinas ANA, AIA y AIB, en 90 días de cultivo (Tabla 6), indicaron que el tratamiento AIB 1,0 mg L⁻¹ presentó diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$) en lo referente a número de nudos(10,8), hojas (11,0) y raíces formados (5,9) y longitud de raíces (0,7 cm), aunque no en altura de plántulas (6,1 cm). En brotes inducidos en segmentos nodales de plantas de *P. chilensis*, *P. cineraria* y *P. juliflora*, de 3 - 12 meses de edad, crecidas en condiciones de invernadero, la mayor tasa de enraizamiento se alcanzó con AIB (3,0 y 15 mg L⁻¹), estableciéndose el siguiente gradiente de respuestas positivas: *P. chilensis* > *P. cineraria* > *P. juliflora* (Dun-Yi *et al.*, 1989). En *P. alba* se observó enraizamiento en brotes de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* y de plantas silvestres de 5 y 20 años de edad, en medio de cultivo MS suplementado con AIB 0,5 mg L⁻¹ o ANA 0,1 mg L⁻¹, utilizando puentes de papel de filtro (Castillo Meier y Bovo, 2000); en *P. laevigata* se alcanzó hasta 44% de enraizamiento en medio de cultivo MS1/2 suplementado con ANA 3,0 mg L⁻¹ y vermiculita (Buendía-González *et al.*, 2007); asimismo, en brotes inducidos en segmentos nodales de *P. cineraria* el enraizamiento fue mejor en el medio de cultivo MS1/2 suplementado con AIB 3,0 y 5,0 mg L⁻¹ (Kumar y Singh, 2009).

Tabla 6. Efecto de las auxinas ANA, AIA y AIB, en diferentes concentraciones, en el enraizamiento de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Prosopis limensis*

Tratamientos (mg L ⁻¹)			Respuestas morfológicas					
ANA	AIA	AIB	Altura (cm)	Brote (N°)	Nudos (N°)	Hojas (N°)	Raíces (N°)	Longitud raíces (cm)
0,1			4,65 ± 0,58	1,2 ± 0,1	5,3 ± 1,3	5,3 ± 1,6	0,6 ± 0,3	0,20 ± 0,01
0,5			5,23 ± 0,47	1,1 ± 0,1	8,1 ± 1,2	8,8 ± 1,4	4,6 ± 1,1	0,70 ± 0,03
1,0			4,41 ± 0,54	1,1 ± 0,1	7,0 ± 1,6	7,3 ± 1,7	3,9 ± 0,9	0,30 ± 0,01
	0,1		3,14 ± 0,20	1,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4	1,3 ± 0,3	3,3 ± 1,4	0,30 ± 0,01
	0,5		3,58 ± 0,36	1,2 ± 0,2	4,5 ± 1,2	4,0 ± 1,0	3,4 ± 1,0	0,50 ± 0,02
	1,0		5,11 ± 0,28	1,5 ± 0,2	8,6 ± 1,3	8,4 ± 1,4	5,6 ± 1,1*	0,60 ± 0,02
		0,1	3,60 ± 0,22	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,7	2,3 ± 0,8	0,40 ± 0,01
		0,5	4,91 ± 0,52	1,1 ± 0,0	6,4 ± 1,3	6,3 ± 1,3	3,5 ± 1,1	0,11 ± 0,05
		1,0	6,13 ± 0,34	1,1 ± 0,6	10,8 ± 0,5*	11,0 ± 0,5*	5,9 ± 0,9*	0,70 ± 0,01*

*Existe diferencias significativas entre tratamientos (prueba Kruskal – Wallis $p \leq 0,05$).

Aclimatación

La mayor tasa de sobrevivencia (90%) se observó en el sustrato suelo negro + turba(2:1), mientras que fue menor de 10% en los sustratos turba 100% y suelo negro + humus (2:1). En otras especies de algarrobo como en *P. cineraria* y *P. juliflora* la tasa de sobrevivencia fue 100% en sustrato compost (Dun-Yiet *et al.*, 1989) y en *P. cineraria* se observaron tasas de sobrevivencia de 60% en sustrato suelo esterilizado + vermiculita (1:1) (Kumar y Singh, 2009). En otros trabajos, como el realizado en *P. chilensis*, se reportó solamente aclimatación exitosa pero sin presentar porcentajes y características del sustrato (Caro *et al.*, 2002).

4. CONCLUSIONES

La germinación de semillas *in vitro* fue 100% cuando previamente se escarificaron a 50 – 70 °C o HCl 36% durante 5 min, mientras que la mayor elongación de ápices caulinares se obtuvo con KIN 0,2 mg L⁻¹ y las combinaciones ANA 0,2 + KIN 0,2 mg L⁻¹ y AIA 0,02 + AG₃ 0,02 mg L⁻¹. Después de 90 días, en medio de cultivo con KIN 1,0 mg L⁻¹ + sulfato de adenina 25 mg L⁻¹, se alcanzó la mayor tasa de multiplicación de brotes, mientras que el enraizamiento fue mayor con AIB 1,0 mg L⁻¹. El sustrato suelo negro + turba (2:1) permitió la aclimatación exitosa de plántulas en invernadero.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOSA. Association of Official Seed Analysts. 2005. "Rules for testing seeds". Association of Official Seed Analysts, USA. [Fecha de consulta: 25 enero 2014]. Disponible en: <<http://www.aosassed.com>>.
- Brack, A. y C. Mendiola. 2004. "Ecología del Perú". PNUD. Asociación Editorial Bruño. Lima, Perú. 495 pp.
- Buendía-Gonzalez, L.; J. Orozco-Villafuerte; F. Cruz-Sosa; V. M. Chávez-Ávila and E. J. Vernon-Carter. 2007. "Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. and Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes". *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 260-266.
- Caro, L. A.; P. A. Polci; L. I. Lindström; C. V. Echenique and L. F. Hernández. 2002. "Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants". *Biocell* 26: 25-33.
- Castillo de Meier, G. and O. A. Bovo. 2000. "Plant regeneration from single-nodal-stem explants of legume tree *Prosopis alba* Griseb". *Biocell* 24: 89-95.
- De Souza, C. E. 1993. "Propagação vegetativa de algarobeira por estaquia em casa de vegetação e em condições de telado". *EMBRAPA (CEPTSA)* 77: 1-10.
- Dick, J. M.; K. East and R. R. B. Leakey. 1991. "Influence of propagation environment and cutting length on the rooting of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. nitrogen fixing". *Tree Research Reports* 9: 114-116.
- Dun-Yi, Y.; C. A. Batchelor; M. J. Koehler and P. J. C. Harris. 1989. "In vitro regeneration of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*) from nodal explants". *Chinese Journal of Botany* 1: 89-97.
- Ewens, M. and P. Felker. 2003. "The potential of mini-grafting for large-scale production of *Prosopis alba* clones". *Journal of Arid Environments* 55: 379-387.
- Felker, P. 1983. "Production of wood biofuels from mesquite (*Prosopis* spp.)". *In Annual Report to the US Department of Energy*. 103 pp.

- Felker, P. 1992. "Capturing and managing the genetic variation in *Prosopis* spp. For economically useful characters". In *Tropical Trees: the potential for domestication and rebuilding of forest resources*, p 98-104. R.R.B. Leakey and A.C. Newton (Eds.). ITE Symposium and ECTF Symposium Procs.
- Goyal, Y. and H. C. Arya. 1981. "Differentiation in cultures of *Prosopis cineraria* Linn". *Current Science* 50: 468-469.
- Goyal, Y. and H. C. Arya. 1984. "Tissue culture of desert trees; 1. Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture". *Journal of Plant Physiology* 115: 183-189.
- Harris, P. J. C. 1992. "Vegetative propagation of *Prosopis*". In *Prosopis Species: Aspects of their Value, Research and Development*, p 175-191. R.W. Dutton (Ed.). CORD, University of Durham, Durham, UK.
- Hartmann, H.T.; D. E. Kester; F.T. Davies Jr and R. L. Geneve. 2011. "Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices". Eighth Edition. Printice Hall, Boston. 880 p.
- Jordan, M. and O. Balboa. 1985. "In vitro regeneration of *Prosopis tamarugo* Phil. and *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from nodal sections". *Gartenbauwissenschaft* 50: 138-142.
- Jordan, M.; J. Pedraza and A. Goreux. 1985. "In vitro propagation studies of three *Prosopis* species (*P. alba*, *P. chilensis* and *P. tamarugo*) through shoot tip culture". *Gartenbauwissenschaft* 50: 265-267.
- Jordan, M. 1987. "In vitro culture of *Prosopis* species". In *Cell and Tissue Culture in Forestry*, p. 301-316. J.M. Bonga and D.J. Durzan (Eds.). MartinusNijhoff Pubs. Boston.
- Klass, S.; R. Bingham; L. Finker and P. Felker. 1985. "Optimization of environment for rooting cuttings of highly productive clones of *Prosopis alba* (mesquite/algarrobo)". *The Journal of Horticultural Science* 60: 275-284.
- Klass, S.; J. Wright and P. Felker. 1987. "Influence of auxins thiamin and fungal drenches on the rooting of *Prosopis alba* clone B-2v-50 cuttings". *The Journal of Horticultural Science* 62: 97-100.
- Kumar, S. and N. Singh. 2009. "Micropropagation of *Prosopis cineraria* (L.) Druce - A multipurpose desert tree". *Researcher* 1: 28-32.
- Leakey, R. R. B. and F.T. Last. 1980. "Biology and potential of *Prosopis* species in arid environments with particular reference to *P. cineraria*". *Journal of Arid Environments* 3: 9-24.
- Mittermeier, R.A.; P. Robles Gil; M. Hoffman; J. Pilgrim; T. Brooks, C. G. Mittermeier; J. Lamoreux and G. A. B. Da Fonseca. 2005. "Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and most Threatened Terrestrial Ecoregions". Conservation International, Washington. 392 p.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures". *Physiolgy Plantarum* 15: 473-497.
- Nandwani, D. and K.G. Ramawat. 1991. "Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC". *Indian Journal of Experimental Biology* 29: 523-527.
- Oberschelp, G. P. J. y M. A. Marcó. 2010. "Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach". *Quebracho* 18: 112-119.
- Rao, N. K.; J. Hanson; M. E. Dulloo; K. Ghosh; D. Novell y M. Larinde. 2007. "Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma". *Manuales para Bancos de Germoplasma* N° 8. Bioversity International, Roma, Italia.
- Riveros, F. 1992. "The genus *Prosopis* and its potential to improve livestock production in arid and semi-arid regions". In *Legume Trees and Other Fodder Trees as Protein Sources for livestock*, p. 257-276. A. Speedy and P. L. Pugliese (Eds.). Proceedings, FAO Animal Production and Health Paper (FAO) N°. 102. Expert Consultation on Legume Trees and other Fodder Trees as Protein Sources for Livestock, Kuala Lumpur (Malaysia), 14-18 Oct 1991/Rome (Italy), FAO.

- Rubluo, A.; E. Arriaga and I. Brunner. 2002. "Shoot production from cotyledons of *Prosopis glandulosa* var. *torreyana* cultured in vitro". Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica 75: 83-87.
- Shekhawat, N. S.; T. C. Rathore; R. P. Singh; N. S. Deora and S. R. Rao. 1993. "Factors affecting in vitro clonal propagation of *Prosopis cineraria*". Plant Growth Regulation 12: 273-280.
- Tabone, T. J.; P. Felker; R. L. Bingham; I. Reyes and S. Loughrey. 1986. "Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B₂V₅₀". Forest Ecology and Management 16: 191-200.
- Vásquez, L. P.; J. Ecurra and A. Huamán. 2010. "Los Algarrobos del Perú". Innovación y Competitividad para el Agro Peruano (INCAGRO), Lambayeque, Perú. 126 p.
- Zar, J. H. 2009. "Biostatistical Analysis". 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 960 p.

