

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES



**MICROPROPAGACIÓN DE *Prosopis pallida*
(Humb & Bonpl. Ex Willd.) Kunth A PARTIR
DE YEMAS APICALES**

Presentado por:

Jean Carlo Rivera Curi

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO FORESTAL

Lima - Perú
2018

DEDICATORIA

A Dios porque a pesar de los obstáculos,

me permitió seguir adelante

A mis padres por ser el pilar de mi formación,

por apoyarme en cada decisión que he tomado

y su cariño incondicional

A mis hermanas por su apoyo y su cariño

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Blga. Rosa Cabrera, co-asesora de tesis, por su disposición a resolver cualquier inquietud que se originó en la investigación y por darme la oportunidad de realizar la tesis.

Al Ing. Fernando Bulnes, asesor de tesis, por su apoyo, consejos y todos sus aportes durante el transcurso de la investigación.

A los miembros del jurado, por su aporte y sus recomendaciones.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria, por permitirme usar las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales para poder desarrollar la tesis.

Al Ing. Esteban Flor, Dr. Francisco Cruz, Dra. Leticia Buendía y Ing. Julia Minchala por su gran aporte durante el desarrollo de la tesis.

A la Sra. Luz Guzmán, la Ing. Liliana Castro y la Sra. Lupe, por toda su ayuda durante la realización de la tesis.

A mis amigos del laboratorio Delia, Jerica, Sandra, Milca, Zoila, Nery, Melissa, Carlos, Kiara, Renzo, Julieta, Sebastián y Jessica, por su apoyo, su tiempo y su amistad durante la realización de la tesis.

A mis amigos Rocio, Claudia, Mariemy, Lilia, Karl, Christian y Silvana, por su valiosa amistad por todos esos momentos inolvidables y por todo el apoyo que me brindaron para realizar la tesis y los ánimos que me dieron.

A Jesús Gamboa y a Joao Rado por su asesoría estadística, su paciencia y su amistad durante la realización de la tesis.

A Yahir por su apoyo incondicional, por sus ánimos y por ayudarme a salir adelante en momentos difíciles.

A Karci, por su incondicional amistad y por estar conmigo en cada momento importante para mí.

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 tesis fue evaluar el efecto de dos medios de cultivo (MS y WPM) con la adición de diferentes concentraciones (0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) de citoquininas (BAP y ZEA) y auxinas (ANA, AIB y AIA) sobre la propagación *in vitro* de *Prosopis pallida*. Previo al trabajo *in vitro* se realizó un ensayo de tratamientos pregerminativos donde el más óptimo resultó el tratamiento con agua caliente. Para el protocolo de desinfección superficial de semillas se obtuvo mejores resultados aplicando 1,2% NaOCl durante 15 minutos de inmersión. Durante la fase de multiplicación se realizaron tres ensayos por la poca efectividad de brotación de las yemas apicales, resultando mejor la aplicación del WPM sin adición de citoquininas usando tapas de algodón y yemas apicales con cotiledones, en esta etapa se evaluó el número de nudos, altura de plántula y número de brotes producidos por explante. Durante la fase de enraizamiento se evaluó el porcentaje de enraizamiento, la longitud de la raíz y el número de raíces, obteniendo mejores resultados con WPM + 0,5 mg/L AIB. Durante la fase de aclimatación se evaluó el porcentaje de aclimatación en dos tipos de sustratos diferentes, obteniendo mejores resultados empleando sustrato premix #8.

Palabras claves: *Prosopis pallida*, Micropropagación, Cultivo de tejidos, Enraizamiento, Aclimatación

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. Introducción	1
II. Revisión de Literatura	3
1. Bosque seco tropical en el Perú.....	3
2. Características de la especie.....	3
2.1. Taxonomía.....	3
2.2. Distribución geográfica.....	3
2.2.1. Distribución mundial.....	3
2.2.2. Distribución en el Perú.....	4
2.3. Descripción botánica.....	4
2.3.1. Tallo y ramas.....	4
2.3.2. Hojas.....	4
2.3.3. Inflorescencia y flores.....	4
2.3.4. Frutos y semillas.....	4
2.4. Ecología.....	5
2.4.1. Hábitat.....	5
2.4.2. Clima y Suelo.....	5
2.4.3. Requerimientos hídricos.....	5
2.4.4. Crecimiento.....	6
2.4.5. Fructificación.....	6
3. Producción de semillas.....	7
4. Multiplicación.....	7
4.1. Germinación de semillas.....	7
4.2. Propagación vegetativa.....	8
5. Importancia económica y usos.....	8
6. Situación de los bosques naturales de algarrobo en el Perú.....	9
7. Proyectos de reforestación con algarrobo.....	11
8. Micropropagación <i>in vitro</i>.....	12
9. Tipos de micropropagación.....	12
9.1. Organogénesis.....	12
9.2. Embriogénesis somática.....	12
10. Micropropagación a partir de yemas apicales.....	13
11. Etapas de la micropropagación.....	14
11.1. Etapa 0: Acondicionamiento de plantas madre.....	14
11.2. Etapa 1: Establecimiento de los cultivos.....	14
11.2.1. Desinfección del explante y asepsia.....	15
11.3. Etapa 2: Multiplicación.....	17
11.4. Etapa 3: Enraizamiento.....	17
11.5. Etapa 4: Aclimatación.....	18
12. Medios de cultivo.....	19
12.1. Compuestos inorgánicos.....	19
12.1.1. Sales minerales.....	19
12.2. Compuestos orgánicos.....	20
12.2.1. Fuente de carbono.....	20
12.2.2. Vitaminas.....	20
12.2.3. Reguladores de crecimiento.....	20
12.2.4. Agentes solidificantes.....	22
13. Aplicación de la biotecnología y el cultivo <i>in vitro</i> en el sector forestal.....	23

III.	Materiales y Métodos	25
1.	Ubicación del ensayo experimental	25
2.	Características microambientales	25
2.1.	Cuarto de cultivo.....	25
3.	Zona de obtención del material vegetal	25
4.	Ensayo preliminar de tratamientos pregerminativos	26
4.1.	Período de evaluación.....	27
5.	Protocolo de desinfección superficial	28
5.1.	Preparación de medio de cultivo.....	28
5.2.	Desinfección superficial de semillas.....	28
5.2.1.	Variables evaluadas.....	30
5.3.	Diseño experimental.....	30
5.3.1.	Análisis estadístico.....	30
5.3.2.	Unidad experimental.....	31
6.	Obtención de explantes <i>in vitro</i>	31
7.	Fase de multiplicación	31
7.1.	Determinación del tipo de explante.....	32
7.2.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales.....	32
7.2.1.	Preparación de medio de cultivo.....	32
7.2.2.	Introducción de yemas apicales.....	33
7.2.3.	Variables evaluadas.....	33
7.2.4.	Unidad experimental.....	34
7.3.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales con sus cotiledones.....	35
7.3.1.	Preparación de medio de cultivo.....	35
7.3.2.	Introducción de yemas apicales con sus cotiledones.....	35
7.3.3.	Diseño experimental.....	36
7.3.4.	Variables evaluadas.....	37
7.4.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales con sus cotiledones empleando tapas de algodón.....	37
7.4.1.	Preparación de medio de cultivo.....	37
7.4.2.	Introducción de yema apical con sus cotiledones.....	38
7.4.3.	Variables evaluadas.....	39
7.4.4.	Diseño experimental.....	39
8.	Fase de enraizamiento	41
8.1.	Preparación de medio de cultivo.....	41
8.2.	Introducción de microestacas en medio de enraizamiento.....	41
8.2.1.	Variables evaluadas.....	42
8.3.	Diseño experimental.....	42
8.3.1.	Análisis estadístico.....	42
8.3.2.	Unidad experimental.....	42
9.	Fase de aclimatación	43
9.1.	Aclimatación de plántulas.....	43
9.1.1.	Variable evaluada.....	43
9.2.	Diseño experimental.....	44
9.2.1.	Análisis estadístico.....	44
9.2.2.	Unidad experimental.....	44
IV.	Resultados y discusión	45
1.	Ensayo preliminar de tratamientos pre germinativos	45
2.	Protocolo de desinfección superficial de semillas	47
3.	Fase de multiplicación	53
3.1.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales.....	53
3.2.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales con sus cotiledones.....	56

3.2.1.	Número de nudos	57
3.2.2.	Número de brotes.....	62
3.3.	Ensayo de multiplicación de yemas apicales con sus cotiledones empleando tapas de algodón.....	65
3.3.1.	Número de nudos	66
3.3.2.	Altura de plántulas.....	68
3.3.3.	Número de brotes.....	71
4.	Fase de enraizamiento	74
4.1.	Porcentaje de enraizamiento.....	74
4.2.	Longitud de raíces.....	77
4.3.	Número de raíces.....	79
5.	Fase de aclimatación.....	81
5.1.	Porcentaje de aclimatación.....	81
V.	Conclusiones	83
VI.	Recomendaciones	85
VII.	Referencias bibliográficas	87
VIII.	Anexos.....	95

Índice de tablas

	Página
Tabla 1: Superficie reforestada bosques secos.....	11
Tabla 2: Agentes desinfectantes de explantes.....	16
Tabla 3: Tratamientos pregerminativos	27
Tabla 4: Tratamientos para la desinfección de semillas de <i>Prosopis pallida</i>	29
Tabla 5: Tratamientos para la multiplicación de <i>Prosopis pallida</i> a partir de yemas apicales	32
Tabla 6: Escala de callo presente en el explante.....	33
Tabla 7: Tratamientos para la multiplicación de <i>Prosopis pallida</i> a partir de yemas apicales con cotiledones.....	35
Tabla 8: Tratamientos seleccionados para la multiplicación de <i>Prosopis pallida</i> a partir de yemas apicales con cotiledones en medio WPM.....	38
Tabla 9: Tratamientos para el enraizamiento de microestacas de <i>Prosopis pallida</i> en medio WPM	41

Índice de figuras

	Página
Figura 1: Presencia – Ausencia de algarrobo (<i>Prosopis pallida</i>) en la costa norte del Perú	9
Figura 2: Vías de regeneración de plantas por cultivo de tejidos	13
Figura 3: Estructura química de algunas auxinas naturales y sintéticas.....	21
Figura 4: Estructura química de algunas citoquininas	22
Figura 5: Distribución de los tratamientos en la bandeja de siembra.....	26
Figura 6: Inmersión de semillas durante 10 minutos en tratamientos pregerminativos.....	27
Figura 7: Desinfección de semillas.....	29
Figura 8: Inmersión de semillas en los nueve tratamientos de desinfección.....	30
Figura 9: Grados de callosidad	34
Figura 10: Yema apical sembrada <i>in vitro</i>	34
Figura 11: Sección de yema apical con sus cotiledones y parte de hipocótilo.....	36
Figura 12: Frasco con sección de yema apical y sus cotiledones	37
Figura 13: Secciones de plántulas utilizados para segundo subcultivo	39
Figura 14: Yema apical sembrada en tubo de ensayo con tapa de algodón	40
Figura 15: Microestaca sembrada en medio de enraizamiento.....	43
Figura 16: Aclimatación de plántulas de algarrobo en (a) pastillas jiffys y (b) sustrato premix.	44
Figura 17: Porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos pre germinativos.	45
Figura 18: Porcentaje de tubos contaminados por tratamiento.....	47
Figura 19: Porcentaje de contaminación por concentración de NaOCl.....	48
Figura 20: Porcentaje de contaminación por tiempo de inmersión	49
Figura 21: Porcentaje de plántulas establecidas por tratamiento.....	49
Figura 22: Porcentaje de plántulas establecidas por concentración de NaOCl	50
Figura 23: Porcentaje de plántulas establecidas por tiempo de inmersión.....	51
Figura 24: Plántulas de algarrobo germinadas	51
Figura 25: Porcentaje de explantes en los diferentes niveles de callosidad por tratamiento	53
Figura 26: Porcentaje de explantes necrosados por tratamiento.....	54
Figura 27: Yema apical sembrada en medio de multiplicación.....	56

Figura 28:	Número de nudos promedio formados en la introducción de yemas apicales de <i>Prosopis pallida</i> por tratamiento.....	57
Figura 29:	Número de nudos promedio por explante por medio de cultivo.....	58
Figura 30:	Número promedio de nudos por tipo de citoquinina.....	59
Figura 31:	Número de nudos promedio por concentración de citoquinina	60
Figura 32:	Frasco sellado con papel aluminio y presencia de vapor en las paredes	61
Figura 33:	Número de brotes promedio formados en la introducción de yemas apicales de <i>Prosopis pallida</i> por tratamiento.....	62
Figura 34:	Número brotes promedio por medio de cultivo.....	63
Figura 35:	Número promedio de brotes por tipo de citoquinina.....	64
Figura 36:	Número promedio de nudos por concentración de citoquinina	64
Figura 37:	Necrosis de yema apical y formación de brotes en yema axilar	65
Figura 38:	Número de nudos promedio formados en la introducción de yemas apicales de <i>Prosopis pallida</i> por tratamiento empleando tapas de algodón	66
Figura 39:	Número promedio de nudos por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón	67
Figura 40:	Número de nudos promedio por concentración	67
Figura 41:	Altura promedio de los explantes por tratamiento en la introducción de yemas apicales empleando tapas de algodón.....	68
Figura 42:	Altura promedio de plántulas por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón	69
Figura 43:	Altura promedio de plántulas por concentración de citoquinina	70
Figura 44:	Elongación de la yema apical a las cuatro semanas de siembra	71
Figura 45:	Número de brotes promedio formados en el subcultivo de yemas apicales y axilares de <i>Prosopis pallida</i> por tratamiento empleando tapas de algodón	72
Figura 46:	Número brotes por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón.....	72
Figura 47:	Número de brotes promedio por concentración de citoquinina empleando tapas de algodón	73
Figura 48:	Formación de brotes en microestaca subcultivada	74
Figura 49:	Porcentaje de microestacas enraizadas por tratamiento	75
Figura 50:	Porcentaje de enraizamiento por tipo de auxina.....	75
Figura 51:	Porcentaje de enraizamiento por concentración de auxina	76
Figura 52:	Microestaca enraizada de <i>Prosopis pallida</i> con callo en el cuello de la plántula	77
Figura 53:	Longitud promedio de raíces por tratamiento	78
Figura 54:	Longitud de raíces por tipo de auxina.....	78

Figura 55:	Longitud de raíces por concentración de auxina	79
Figura 56:	Número promedio de raíces por tratamiento	80
Figura 57:	Número de raíces por tipo de auxina	80
Figura 58:	Número de raíces por concentración de auxinas	81
Figura 59:	Porcentaje de aclimatación por tipo de sustrato	82
Figura 60:	Plántulas de <i>Prosopis pallida</i> provenientes del cultivo <i>in vitro</i>	82

Índice de anexos

	Página
Anexo 1 Composición del medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962).....	95
Anexo 2 Composición del WPM (Lloyd and Mccown, 1981)	95
Anexo 3 Tabla de evaluaciones realizadas al ensayo de tratamientos pregerminativos	97
Anexo 4 Tablas de evaluaciones realizadas protocolo de desinfección.....	98
Anexo 5 Análisis de varianza protocolo de desinfección.....	99
Anexo 6 Cantidad de explantes por nivel de callosidad en ensayo de multiplicación	101
Anexo 7 Porcentaje de explantes por nivel de callosidad	102
Anexo 8 Datos del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones.....	103
Anexo 9 Análisis estadístico del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones	109
Anexo 10 Datos del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones empleando tapas de algodón – primer subcultivo	112
Anexo 11 Análisis estadístico del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones empleando tapas de algodón – primer subcultivo.....	115
Anexo 12 Datos del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones empleando tapas de algodón – segundo subcultivo	118
Anexo 13 Análisis estadístico del ensayo de multiplicación de yemas apicales con cotiledones empleando tapas de algodón – segundo subcultivo.....	120
Anexo 14 Datos del ensayo de enraizamiento de microestacas	123
Anexo 15 Análisis estadístico de enraizamiento de microestacas	124
Anexo 16 Datos del ensayo de aclimatación	128
Anexo 17 Análisis estadístico del porcentaje de aclimatación.....	129
Anexo 18 Ficha técnica sustrato premix #8.....	130
Anexo 19 Ficha técnica pastillas jiffys #30	131

ABREVIATURAS

NaOH: Hidróxido de sodio

HCl: Ácido clorhídrico

NaOCl: Hipoclorito de sodio

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

MS/2: Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración

WPM: Woody Plant Medium (1980) (Medio de plantas leñosas)

BAP: Bencilaminopurina

ZEA: Zeatina

ANA: Ácido naftalenacético

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido indolbutírico

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú existen aproximadamente 72 millones de hectáreas de bosques con una gran diversidad de especies (Llerena *et al.* 2014). De esta gran extensión, los bosques secos tropicales cubren una superficie de 3 202 63 hectáreas. Los bosques secos tropicales son formaciones vegetales que se expanden desde el nivel del mar hasta los 1600 msnm. Su vegetación abarca desde herbáceas hasta un reducido número de especies arbóreas, las cuales se han adaptado a las condiciones áridas de estos ecosistemas (Otivo 2015).

El algarrobo (*Prosopis pallida*) pertenece a la familia Fabaceae, es un árbol perennifolio de hasta 20 metros de altura y representa el símbolo principal de los bosques secos del norte del Perú. Posee una gran importancia económica para dicha región debido a que su madera es utilizada para construcción y combustible y de la misma manera, sus frutos comestibles son empleados en la elaboración de la algarrobina, harina de algarrobo, entre otros productos (MINAM 2011; Dostert *et al.* 2012). Además, cumple un importante papel ecológico en el ecosistema de bosques secos ya que por ser una leguminosa es una especie con potencial para recuperar la fertilidad y productividad de los suelos sódicos (Aguilera 2014).

Sin embargo, un gran problema para los bosques secos es la pérdida de su cobertura vegetal debido a la tala ilegal, al exceso de pastoreo, y sobre todo a la falta de políticas para manejo de bosques secos ya que la ley forestal y de fauna silvestre está más orientada al manejo de bosques húmedos tropicales y genera vacíos que no aportan a la sostenibilidad de los bosques secos tropicales (Aguilera 2014; Otivo 2015).

Albán *et al.* (2003) mencionan que el algarrobo (*Prosopis pallida*) 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, sin embargo, estas 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).

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 o propagación *in vitro* apoya a los métodos de propagación tradicionales ya que permite la propagación masiva clonal de una especie comercial, en peligro de extinción o con un alto valor filogenético (George y Sherrington 1984). El cultivo *in vitro* es una herramienta que permitiría facilitar los programas de reforestación que se realizan con algarrobo para la conservación de los bosques secos del norte del Perú.

A su vez el cultivo de tejidos permite generar plantones mejorados genéticamente por lo que establecer el protocolo de propagación *in vitro* de algarrobo, permitiría realizar investigaciones en mejoramiento genético de esta especie y aprovechar la alta variabilidad de las poblaciones naturales para la propagación de algún individuo élite con alguna característica que se desee clonar.

En este contexto, el objetivo principal del estudio es proponer un protocolo adecuado para la propagación *in vitro* de algarrobo (*Prosopis pallida*) a partir de yemas apicales. Los objetivos específicos fueron: establecer el protocolo de desinfección superficial de semillas, evaluar medios de cultivo con diferentes concentraciones de citoquininas para la multiplicación *in vitro* a partir de yemas apicales, evaluar medios de cultivo con diferentes concentraciones de auxinas para el enraizamiento *in vitro* y finalmente evaluar el sustrato adecuado para la aclimatación de plántulas provenientes de la micropropagación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. BOSQUE SECO TROPICAL EN EL PERÚ

Los bosques secos tropicales se encuentran ubicados en la costa norte del Perú entre las regiones de Tumbes, Piura y Lambayeque. Son formaciones vegetales que van desde el nivel del mar hasta los 1600 msnm. Las precipitaciones varían de 60 a 400 mm en las zonas bajas y llegan a 1600 mm en las zonas altas. Los períodos de sequía duran entre seis a nueve meses y las temperaturas medias varían entre 17 a 27 °C (Otivo 2015).

Su vegetación está compuesta por hierbas, arbustos y árboles con un reducido número de especies de menor tamaño y área basal a diferencia de las que se encuentran en los bosques húmedos. Esto se debe por las pocas temporadas de lluvias y el ecosistema donde se desarrollan (Otivo 2015).

2. CARÁCTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

2.1. TAXONOMIA

Familia: FABACEAE

Subfamilia: MIMOSOIDEAE

Nombre científico: *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Kunth

Nombre común: Algarrobo

Sinonimia: *Prosopis limensis* Benth

2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

2.2.1. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

El algarrobo es originario de las zonas áridas de Perú, Colombia y Ecuador. Sin embargo, en los últimos años ha sido introducido a diferentes países como Bolivia, Puerto Rico, Australia entre otros (Dostert *et al.* 2012).

2.2.2. DISTRIBUCIÓN EN EL PERÚ

En el Perú es la especie dominante de la zona costera. Ha sido documentada hasta en 13 departamentos sin embargo parece estar restringida para la zona centro – norte del país (Dostert *et al.* 2012).

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

2.3.1. TALLO Y RAMAS

El algarrobo es un árbol con una altura de 5 a 10m. Posee una copa amplia y densa. Su fuste es tortuoso y con un diámetro promedio de más de 50cm. Su corteza es rugosa de color grisáceo y tiene ramas gruesas (Tous 1984).

2.3.2. HOJAS

Las hojas son bipinnadas y alternas cuando son jóvenes. Es común ver en los nudos de plantas adultas de 2 a 10 hojas que nacen en ramitas muy cortas y juntas, semejantes a braquiblastos, de 2 a 8 cm de longitud, falcadas dorsalmente. Pero lo más frecuente es encontrar hojas con 2 a 3 pares de pinnas, de 2 a 6 cm de longitud, los folíolos opuestos a lo largo de un raquis, en número de 11 a 14 pares, distanciados de 2 a 3 mm, entre cada par. Los folíolos son lineales, obtusos, mucronados, regularmente pubescentes, de 8 mm de longitud por 1 a 3 mm de ancho (Galera 2000).

2.3.3. INFLORESCENCIA Y FLORES

La inflorescencia es 2 a 3 veces más larga que las hojas, con 200 a 300 flores cortamente pedunculadas que forman una inflorescencia racemosa cilíndrica; raquis y pedúnculos finamente pubescentes. Las flores son pentámeras, actinomorfas, hermafroditas (a veces estériles), verde amarillentas y con 4 a 6 mm de largo; el cáliz es ciliado, de 0,5 a 1,5 mm de largo; pétalos de 2,5 a 3 mm de largo; los estambres son de 5 a 7 mm de largo y con ovario estipitado (Dostert *et al.* 2012).

2.3.4. FRUTOS Y SEMILLAS

El fruto de algarrobo es una legumbre indehisciente, alargada, comprimida y coriácea, rellena de una pulpa dulce. Esta vaina permanece verde cuando es joven y durante el invierno no muestra actividad. El fruto es recto o algo curvado y apiculado, con márgenes paralelos en sus bordes, de 10 a 28 cm de longitud, 11 a 13 mm de ancho, 5 a 8 mm de espesor. Las legumbres crecen rápido entre febrero y finales de mayo, en esta época alcanzan su máximo tamaño. En

julio su coloración verdosa cambia a chocolate oscuro para alcanzar la madurez final en el mes de setiembre (Dostert *et al.* 2012; Galera 2000; Tous 1984).

Las semillas del algarrobo son cuadrangulares de color café de 6,5 mm de largo y pesan aproximadamente entre 0,25 a 0,3 gramos (Tous 1984).

2.4. ECOLOGÍA

2.4.1. HÁBITAT

Su hábitat natural son territorios áridos y semiáridos. Se encuentran normalmente en zonas costeras. Normalmente se encuentra esta especie en las zonas donde hay escasez de agua y falta de nutrientes y es muchas veces la única especie arbórea que resiste este tipo de hábitat (Dostert *et al.* 2012).

2.4.2. CLIMA Y SUELO

El algarrobo es una especie propia de países de clima suave. Este árbol se desarrolla cerca del mar, a una altitud menor de 500 msnm. A pesar de ser una especie rústica, es poco resistente al frío y resulta perjudicada a temperaturas inferiores a 2 °C. Por otra parte, los fuertes calores únicamente causan daño si sobrepasan los 45 °C. Es resistente a la sequía ya que se desarrolla bien en zonas que presentan precipitaciones bajas, pudiendo desarrollarse con normalidad con solo 350 mm de agua al año (Tous 1984).

Con respecto al suelo, *Prosopis pallida* posee un espectro ecológico muy amplio y está adaptado a una alta diversidad de suelos y hábitats. Se adapta a terrenos de diversa naturaleza, se le puede encontrar tanto en dunas de arena como en suelos pesados arcillosos o en suelos pedregosos, pero tiene preferencia a suelos calcáreos de consistencia media y por lo tanto permeable. Las especies de *Prosopis* con el tiempo mejoran considerablemente el suelo donde crecen; esto se debe no sólo a su capacidad de fijar nitrógeno sino también a la caída de hojas, el efecto de bomba de iones y modificaciones en la estructura y fauna del suelo, de la misma manera, el contenido de sales y la alcalinidad del suelo se reduce con el tiempo (Dostert *et al.* 2012; Tous 1984).

2.4.3. REQUERIMIENTOS HÍDRICOS

Las deficiencias de agua afectan el crecimiento aéreo y el crecimiento normal del sistema radicular. Estudios realizados en la zona norte del Perú experimentaron con riego por goteo para el establecimiento de algarrobales donde las raíces desde los 70 cm de profundidad retornaron a la superficie, por la disminución de la humedad en la zona más profunda, al haber

suspendido el riego por 8 meses. Una de las principales causas de este fenómeno fue el riego por goteo, donde se comparó una plantación donde era un riego tradicional y se formaban raíces pivotantes con pocas raíces secundarias. Por lo que se recomienda riegos menos frecuentes con volúmenes mayores. Para el establecimiento de algarrobales se recomiendan riegos con una película de agua de 6 cm por riego, 66m³ por ha, se recomienda sembrar en taludes porque no resiste inundaciones (Galera 2000).

2.4.4. CRECIMIENTO

Después de la germinación y establecimiento, las plantas desarrollan un doble sistema radicular, el cual consiste en una extensa raíz pivotante y un sistema de raíces superficiales laterales. En los primeros meses de la germinación la energía se distribuye principalmente para el desarrollo del sistema radicular, en que el aumento del largo y de la biomasa de las raíces es considerablemente mayor que la parte aérea (Dostert *et al.* 2012)

Comienza a producir los primeros frutos a partir de los 4 o 5 años del establecimiento, bajo buenas condiciones ecológicas. Bajo condiciones favorables, los algarrobos pueden alcanzar hasta los 20 metros de altura, sin embargo, bajo condiciones desfavorables, puede desarrollarse en arbustos de no más de 3 metros de altura. Bajo condiciones naturales, la copa es normalmente abierta y más amplia que la altura del árbol. La forma de vida es muy variable y es determinada por la genética y la procedencia. Además, la forma de crecimiento está influenciada por las condiciones ambientales, por ejemplo, en suelos poco profundos o vientos sostenidos llevan formas bajas y achaparradas. Los daños de presión de pastoreo y ramoneo llevan a formas con múltiples vástagos. Adicionalmente, la ocurrencia cíclica de eventos «El Niño» tiene una influencia sobre el establecimiento y el crecimiento de plantas juveniles de *Prosopis pallida*, como ha podido ser demostrado sobre la base de anillos de crecimiento y mayores tasas de establecimiento de juveniles en el norte de Perú (Dostert *et al.* 2012).

2.4.5. FRUCTIFICACIÓN

La fructificación se produce durante los meses de octubre a abril y durante este tiempo, las condiciones climáticas de temperatura media oscilan entre 20,5°C y 29°C; la humedad relativa es de 76,3 a 83 por ciento (FAO 1977, citado por Galera 2000).

3. PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

A diferencia de otras leguminosas, las vainas de algarrobo no se abren para poder liberar sus semillas al ser secadas. En vez de ello, las semillas se liberan por la descomposición natural del fruto o por la ingesta y el paso de las semillas a través del sistema digestivo de algún animal. Hay aproximadamente entre 28000 y 32000 semillas por kilogramo. Son de difícil extracción, pero se puede emplear un molidor de carne comercial para su extracción. Las semillas se pueden almacenar a temperatura ambiente, protegidas de los insectos, por un período de 9 meses con una mínima pérdida de su viabilidad (Skolmen 1990).

4. MULTIPLICACIÓN

Para generar nuevas plántulas existen dos métodos: se puede generar a partir de semillas o a partir de estacas.

4.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS

La germinación es el proceso que inicia con la toma de agua por la semilla seca y termina cuando una parte de esta emergen y atraviesan las estructuras envolventes que la rodean (Azcón y Talón 2013). Azcón (2000), citado por Ramos (2012) sugiere que para que se realice dicho proceso, es necesario un tratamiento pre germinativo ya que es muy importante para su desarrollo y más en cultivos *in vitro* ya que de esto depende el rompimiento de la dormancia externa e interna de las semillas.

Juárez *et al.* (2001) mencionan que por lo regular la propagación de esta especie es por semilla botánica, sin embargo, la latencia que presenta esta semilla dificulta una rápida germinación.

Prokopiuk y Chifa (2000) recomiendan que las semillas del género *Prosopis* deban pasar por un tratamiento pre germinativo. En su estudio, mencionan que para las semillas de *Proposis alba* es un buen método el lijado manual o conocido como escarificación. Este tratamiento consiste en adelgazar el endocarpo de la semilla hasta que el endospermo sea visible.

Acosta *et al.* (2012) mencionan en una de sus investigaciones que uno de los tratamientos pre germinativos con mayor porcentaje de germinación en laboratorio fue la inmersión de las semillas en agua caliente a una temperatura no superior a 80°C, dejándolas enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas antes de su siembra.

Por otra parte, Galera (2000) menciona que un tratamiento económico y eficaz para acelerar la germinación es el uso de agua caliente por un determinado tiempo para no afectar al embrión.

De la misma manera, Juárez *et al.* (2001) mencionan que obtuvieron un aumento en la germinación al mantenerse en remojo durante 8 minutos en agua a temperatura de 75 °C y que a partir de esta temperatura su viabilidad tiende a disminuir ya que temperaturas muy altas pueden afectar al embrión.

4.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La propagación de algarrobo también puede ser posible a partir de esquejes. Por lo general, los esquejes de plantas jóvenes enraízan más fácilmente que los de plantas adultas. Las tasas de enraizamiento son mucho más altas con medidas para la conservación de alta humedad relativa del aire (cubierta plástica, humedecimiento). Los sustratos aireados como arena o gravilla son más aptos que tierra y a una temperatura radicular de 35 °C estimula el crecimiento de raíces. Las hormonas de crecimiento como AIB (ácido indolbutírico) favorecen el enraizamiento de los esquejes. Se han obtenido resultados exitosos con diferentes especies de *Prosopis* con el uso de mezclas de AIB y AIA (ácido indolacético) y tiamina (Dostert *et al.* 2012).

5. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y USOS

En nuestro país el principal uso del algarrobo es la madera como fuente de energía; hojas, ramas y frutos para alimento del ganado y para la producción de algarrobina. La principal producción de carbón en el Perú proviene de esta especie y el principal producto que se exporta es la algarrobina proveniente de sus legumbres. (Dostert *et al.* 2012).

El algarrobo es una de las principales especies que generan ingreso económico a un gran número de familias que habitan cerca a los bosques secos del norte de nuestro país.

6. SITUACIÓN DE LOS BOSQUES NATURALES DE ALGARROBO EN EL PERÚ

La costa norte del Perú, debido a sus condiciones climáticas, es la zona donde principalmente se encuentran bosques de algarrobo abarcando los departamentos de Lambayeque, Piura y Tumbes. Se puede encontrar esta especie en otras regiones del Perú, pero de forma reducida y discontinua (Cairati 2013).

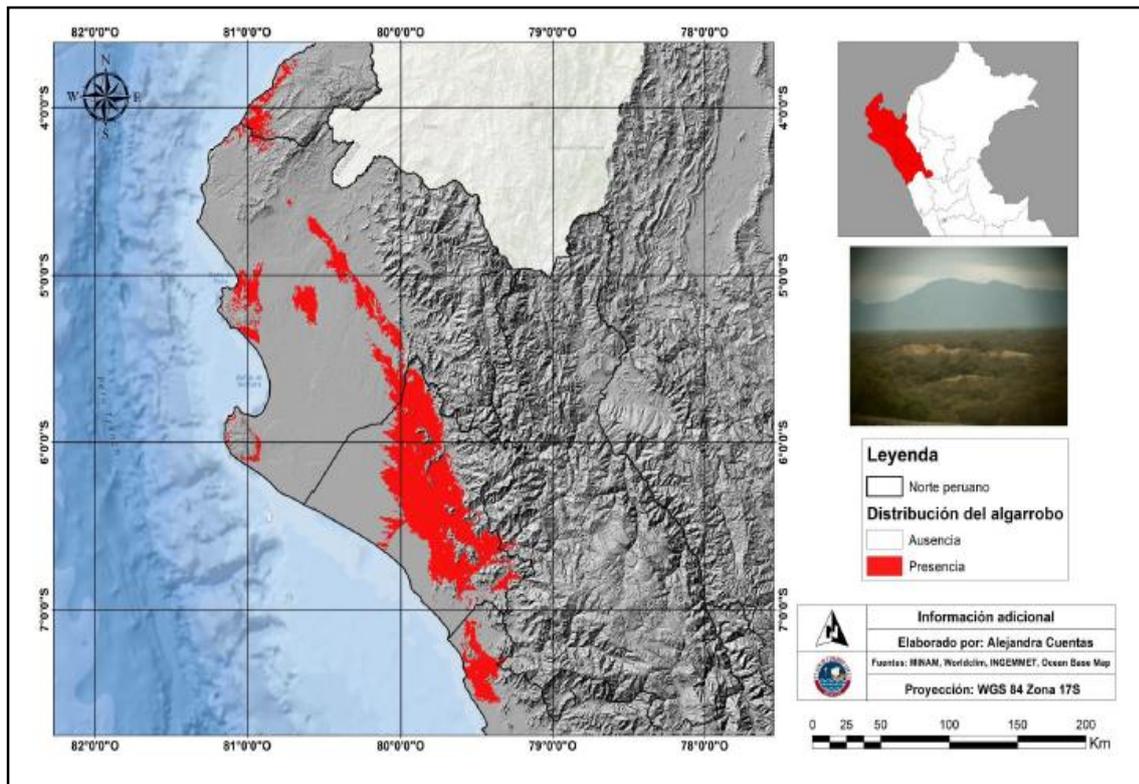


Figura 1: Presencia – Ausencia de algarrobo (*Prosopis pallida*) en la costa norte del Perú

FUENTE: Cuentas (2015)

Los algarrobales tienen una extensión de 2 627 030,98 hectáreas distribuida en el Perú, representando el 66 por ciento de los bosques secos del norte del Perú (Llerena *et al.* 2014). Estas extensiones en la actualidad se encuentran amenazadas por diferentes factores. Como lo menciona Díaz (2013), existe una pérdida de bosque seco del Santuario Natural Pómac entre el 2000 y 2008 de hasta 20 por ciento de área boscosa. Igualmente, Bravo y Rodríguez (2003) determinaron un cambio en los bosques secos de un sector de Piura, donde encontraron pérdidas de biomasa principalmente por aprovechamiento maderable.

En la actualidad existe entonces una gran explotación de los bosques secos del país, con principal impacto en el algarrobo, ya que es la especie predominante de este tipo de ecosistemas. Un principal problema para la pérdida de estas extensiones es la importancia que le da el país al sector agricultura, ya que ocurre una fragmentación de zonas de bosques naturales para abrir paso a campos de cultivos de agricultura para exportación, eliminando así grandes hectáreas de bosques secos (Cuentas 2015)

Los resultados de los análisis de Cuentas (2015) muestran una gran explotación en importantes zonas representativas de bosques secos como lo son el Santuario Natural Bosque Pómac y el Área de Conservación Privada de Chaparrí. La autora menciona que estos ecosistemas tienen años de explotación de los recursos forestales y sus bosques peligran debido a la expansión de zonas de cultivo y la tala ilegal de madera de algarrobo principalmente.

Además de las actividades antrópicas, el cambio climático es uno de los factores que afectan a los ecosistemas del norte de nuestro país. Si bien el algarrobo es una especie que se adapta a condiciones severas, las variaciones del clima generan cambios fenológicos, plagas y enfermedades ocasionando mortandad de individuos (Paico 2014).

Wust (2015) menciona que año tras año se talan algarrobos a pesar de que se considera una especie en peligro, y que si esto continua se generaría un colapso en la calidad de vida del norte. Ya que es una fuente importante como alimento para el ganado y posteriormente efectos generados por el cambio climático.

7. PROYECTOS DE REFORESTACIÓN CON ALGARROBO

El algarrobo es una de las especies más emblemáticas en los bosques secos del norte de Perú. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes proyectos que se llevaron a cabo entre los años 1976 y 2006 (Tabla1).

Las experiencias en reforestación con algarrobo son variadas, existen plantaciones desde 20 hectáreas hasta una de las más grandes extensiones de aproximadamente 270 000 hectáreas elaborado por el Proyecto Algarrobo, como medida de contingencia frente a la ocurrencia del fenómeno de «El Niño» en el año 1998 en la región de Piura (MINAGRI 2010).

Tabla 1: Superficie reforestada bosques secos

<i>Ubicación</i>	<i>Superficie (Ha)</i>	<i>Año</i>	<i>Entidad responsable</i>
Algarrobo El Papayo	1100	1976	MINAG
Parque Kurt Beer	80	1978	MINAG
Bayóvar	20	1980	ORDENORTE
Peña blanca Kurt Beer, Vice, SILJOMIVIL, etc.	20	1981	INIA
Campus Universitario UDEP	40	1984	UDEP
Sojo	150	1990	Predio privado
C.C. Castilla	50	1990-1991	FONCODES
Sechura, Mala Vida	5000	1993	Proyecto Algarrobo
Gongorá	15	1995	Privado
Sechura, Médano Blanco	10000	1996	Proyecto Algarrobo
C.C. Ignacio Távara	200	2006	AIDER

FUENTE: MINAGRI (2010)

En la actualidad también se presentan proyectos de reforestación con algarrobo en los bosques secos del norte del país. En el año 2015, el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) a través de la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre ATFFS – PIURA en conjunto con el Comité de Gestión Comunal Panamericana reforestaron dos hectáreas de bosque seco del centro poblado Mala Vida ubicado en el distrito Cristo nos Valga. Para el proyecto se emplearon aproximadamente 1000 plantones de algarrobo proporcionados por la Estación Experimental Vista Florida del Instituto Nacional de Innovación Agraria (Zapata 2015).

Además, surge la importancia del manejo de la regeneración natural que se produce en los bosques secos. Debido a las intensas lluvias que se presentaron durante los primeros meses del año 2017, bastantes brotes de algarrobo se produjeron en la zona norte del país. Debido a ello

muchos comuneros se disponen a proteger y realizar los mantenimientos de estas plántulas que han comenzado a emerger (SERFOR 2017).

8. MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO*

La micropropagación hace referencia a la propagación en pequeña escala de especies vegetales a partir de células diferenciadas que permitirán obtener finalmente una planta completa. La propagación *in vitro* es una técnica de propagación vegetativa que se basa en una constante división mitótica que permite replicar el genotipo de la planta madre a los diferentes clones que se formarán (Monteuuis 2016). Se menciona sobre la regeneración de plantas, que existen diferentes vías para la formación de un nuevo individuo de acuerdo al explante empleado y tipo de medio de cultivo (Figura 2).

9. TIPOS DE MICROPROPAGACIÓN

9.1. ORGANOGÉNESIS

La organogénesis consiste en la formación de órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes cultivados *in vitro* (Torrey 1966, citado por Villareal 2015).

9.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Barrueto (2005) define la embriogénesis somática como la generación de un embrión somático y posteriormente a plántulas a partir de una célula somática.

La formación del embrión somático puede ser de forma directa a partir de una sola célula en suspensión en un medio de cultivo o fijada a un substrato, y de forma indirecta ocurre igualmente a partir de una sola célula que forma parte de un tejido no organizado (callo) o de un órgano que se cultiva *in vitro* (Barrueto 2005).

La embriogénesis somática por su gran capacidad multiplicativa y sus posibilidades de automatización se está convirtiendo en una vía principal para la regeneración clonal de plantas de especies forestales. En muchos países la están empleando para establecer plantaciones operativas o para la conservación de genotipos selectos y la instalación de ensayos clonales (Celestino *et al.* 2005).

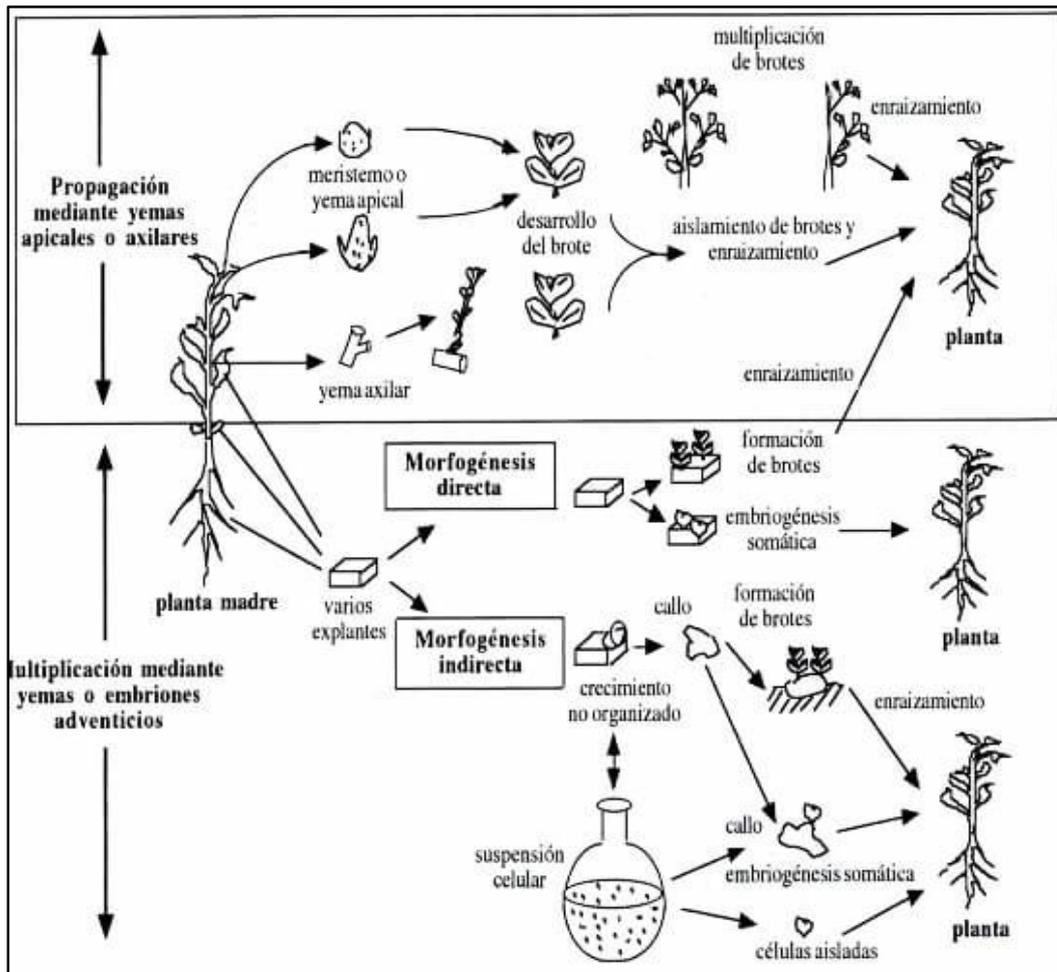


Figura 2: Vías de regeneración de plantas por cultivo de tejidos

FUENTE: Lindsey y Jones (1989)

10. MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE YEMAS APICALES

Para una producción libre de virus y plantas genéticamente estables, Gutiérrez *et al.* (2003), citado por Remache (2011) mencionan que la mejor técnica es la propagación a partir de tejidos meristemáticos ya sea a partir de yemas apicales o axilares.

Al cultivar la yema en el medio de cultivo, se origina la formación de tejidos que dan lugar a un nuevo brote. Es un método muy efectivo y es muy usado para plantas desde herbáceas hasta especies leñosas. (Remache 2011; Villareal 2015)

Las especies forestales leñosas se caracterizan por tener un tejido lignificado que proporciona rigidez a las paredes celulares. Son de crecimiento lento y ciclo vegetativo corto. Por lo que se recomienda como una medida de propagación *in vitro* usar las yemas laterales o apicales (Ramos 2012).

11. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación a partir de tejidos vegetales presenta cinco etapas: (0) Acondicionamiento de plantas madre, (1) Establecimiento del cultivo, (2) multiplicación de vástagos o embriones, (3) enraizamiento y (4) aclimatación de las plántulas. Normalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. Por otra parte, en el caso de la embriogénesis somática la etapa de enraizamiento es reemplazada por la etapa del desarrollo del embrión somático para la diferencia de los ápices caulinares y radiculares (Olmos *et al.* 2010).

11.1. ETAPA 0: ACONDICIONAMIENTO DE PLANTAS MADRE

La selección del material vegetal que se emplea para el cultivo de tejidos vegetales es una de las etapas más importantes pues una buena calidad de explantes seleccionados puede reducir o evitar dos grandes problemas de la propagación *in vitro*: la contaminación y oxidación de los explantes (Olmos *et al.* 2010).

Para obtener explantes de buena calidad es importante tener en cuenta el tipo de órgano que se usará como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación del año en la cual se extrae el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario del explante. La edad fisiológica del explante es un factor importante en la respuesta de los tejidos en cultivo, ya que varían en requerimiento de nutrientes y hormonas cuando el material proviene de plantas con diferente edad fisiológica. Por lo general, se emplean plantas en estado activo: vigorosas y sanas (Olmos *et al.* 2010; Adema 2015).

11.2. ETAPA 1: ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

En esta etapa es importante la selección de los explantes que se utilizarán para la propagación clonal *in vitro* y además el aislamiento y la esterilización de los explantes. El éxito de esta etapa se debe a una buena calidad de explantes que se empleen para la propagación clonal (Olmos *et al.* 2010).

Adema (2015) menciona que los explantes más utilizados para iniciar la propagación clonal *in vitro* son las yemas apicales, estacas uninodales portando yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas. Sin embargo, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos de la planta, siendo de gran importancia en la posterior respuesta del explante; el tamaño, tipo y época de recolección del material vegetal.

Los explantes obtenidos de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas responden mejor que aquellos que son tomados de plantas adultas o yemas en reposo (Villalobos y García 1982, citado por Adema 2015).

El tamaño del explante es un factor que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que es más pequeño tiene menos probable la contaminación y más difícil la regeneración. Por otra parte, explantes muy grandes son más susceptibles a ser contaminados y más fáciles de emplear para la regeneración. La obtención de cultivos no contaminados puede lograrse tanto con técnicas preventivas como curativas (Adema 2015; Olmos *et al.* 2010).

11.2.1. DESINFECCIÓN DEL EXPLANTE Y ASEPSIA

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende en gran medida de la prevención y disminución de la contaminación microbiana. Hoy en día, la contaminación es uno de los principales problemas para los trabajos de propagación *in vitro* en los diferentes laboratorios de biotecnología (Adema 2015).

El diseño arquitectónico de las áreas del laboratorio, el tipo y tamaño de explante, higiene ambiental y la técnica de cultivo de los operarios son factores muy importantes que pueden evitar la contaminación en los trabajos de micropropagación (Adema 2015)

Considerando que la asepsia y el material de trabajo son primordiales, se debe considerar el uso de la autoclave para poder esterilizar los medios de cultivo y que estos estén libres de algún patógeno que pueda evitar el desarrollo de los tejidos a propagar. Al momento de abrir un frasco con medio ya esterilizado es necesario que el aire esté libre de patógenos por lo que se emplea cámaras de flujo laminar que permiten trabajar en condiciones estériles y libre de micropartículas (Barrueto 2005).

Así como el material con el que se va a trabajar debe ser esterilizado, los explantes también deben pasar por un tipo de desinfección. Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. El proceso de desinfección debe permitir eliminar los patógenos con el menor daño posible a los explantes (Adema 2015). La Tabla 2 muestra algunos de los desinfectantes más usados para la eliminación de estos microorganismos. La concentración y el tiempo de exposición son muy variables y dependerán mucho del tipo y tamaño del explante (Barrueto 2005)

Tabla 2: Agentes desinfectantes de explantes

Agente desinfectante	Concentración (%)	Tiempo (min)
Alcohol etílico	75 - 95	0,5 - 1
Cloruro de mercurio	0,1 - 1,0	1 - 5
Hipoclorito de calcio	7 - 10	5 - 20
Hipoclorito de sodio	2,5 - 9,0	5 - 20
Peróxido de hidrógeno	2 - 10	5 - 12

FUENTE: Barrueto (2005)

Los explantes provenientes de plantas madre provenientes de campo o invernadero requieren tiempos largos y mayores concentraciones, pero pueden causar algún tipo de daño en los tejidos por lo que es necesario realizar una evaluación de los posibles tratamientos (Jordan 2005).

La técnica de desinfestación de semillas para la producción de plántulas es una forma prometedora de obtener plántulas libres de patógenos y por lo tanto reducir la contaminación en el proceso de propagación (Medel *et al.* 2001).

La desinfección superficial de explantes principalmente semillas incluye varios pasos: el lavado de los explantes en agua corriente, luego la inmersión en etanol al 70 por ciento por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio y un posterior enjuague con agua estéril (Olmos *et al.* 2010).

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general estos patógenos incluyen a los superficiales del material vegetal, a los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. Como contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* se mencionan a los hongos filamentosos, bacterias y las levaduras. Muchos de ellos no provocan daño a las plantas en el campo, pero se convierten en un patógeno *in vitro*. Tienen un efecto negativo con los explantes ya que compiten por los nutrientes del medio y provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de algún metabolito tóxico. De esta manera, pueden reducir las tasas de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta (Olmos *et al.* 2010; Adema 2015).

Barrueto (2015) menciona que la concentración y los tiempos de exposición del agente desinfectante de los tratamientos dependen del tipo de explante que se va a emplear. Es por ello que se busca la evaluación de diferentes tratamientos para encontrar el más idóneo para el explante que se vaya a usar.

11.3. ETAPA 2: MULTIPLICACIÓN

El objetivo principal de esta etapa consiste en mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder derivar parte de ellos a la etapa siguiente (enraizamiento). Es importante tomar en cuenta que, en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración, es mejor evitar la formación de callos para disminuir los riesgos de variación somaclonal. El medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de desarrollo de los explantes son un rol importante en esta etapa (Olmos *et al.* 2010).

Las condiciones en las que crece el explante responde a la interacción de tres factores: (a) el estado del explante, (b) el recipiente de cultivo y (c) el ambiente externo o condiciones del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantes a un mismo medio varía con el número de subcultivos, el tipo de explante subcultivado y el método de repique. Es por ello, que el medio de cultivo debe optimizarse con la finalidad de obtener la mayor tasa de multiplicación posible (Olmos *et al.* 2010).

En la etapa de multiplicación existen dos fases: la de inducción consiste en el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para favorecer la diferenciación, mientras que en la fase de multiplicación propiamente dicha se quiere de un balance hormonal para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular, en este caso se emplean más las citoquininas (Olmos *et al.* 2010).

11.4. ETAPA 3: ENRAIZAMIENTO

Esta etapa consiste en la formación de raíces adventicias. En muchas especies herbáceas esta etapa es sencilla a diferencia de especies leñosas que por su limitada capacidad rizogénica presentan mayor dificultad (Olmos *et al.* 2010).

El enraizamiento se puede generar en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso, se puede usar una gran variedad de sustratos y reguladores de crecimiento para inducir la rizogénesis. Se emplean medios de cultivo solidificados con agar y los reguladores de crecimiento mayormente usados son las auxinas. El empleo de agar presenta ciertas ventajas y desventajas sobre el enraizamiento. Por una parte, la rizogénesis de especies forestales en agar

se favorecería al producirse un enraizamiento más sincrónico como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. No obstante, las raíces que se producen por este medio son usualmente muy gruesas y no poseen pelos radiculares. Además, que el uso de agar está relacionado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos (Olmos *et al.* 2010).

El enraizamiento *ex vitro* permite que tanto el enraizamiento y la aclimatación sean simultáneos y evita la formación de callos en la base de los vástagos, permitiendo de esta manera una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las primeras etapas del trasplante puede reducir seriamente la tasa de supervivencia (Olmos *et al.* 2010).

11.5. ETAPA 4: ACLIMATACIÓN

La micropropagación es una herramienta que permite obtener una gran cantidad de plántulas en una menor cantidad de tiempo. Sin embargo, esta técnica se ve afectada por la pérdida de plantas en la etapa de aclimatación en condiciones *ex vitro* (Briones 2015).

Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen en condiciones muy especiales en envases casi completamente cerrados en condiciones de alta humedad. Por lo que la fisiología de las plantas es diferente presentando estomas «flojos» por la falta de intercambio gaseoso con el ambiente además de la falta de cutícula en las hojas haciéndolas susceptibles a la pérdida de humedad (Briones 2015; Barrieto 2005).

Por esta razón es necesario evaluar el desarrollo de las plántulas en condiciones naturales, exponiéndolas a ambientes donde la temperatura, la radiación y la humedad no están siendo controladas como en laboratorio. La importancia de esta etapa es para permitir que la planta modifique las características con las que crece a nivel *in vitro* y se adapte a condiciones ambientales no controladas (Briones 2015).

Durante la etapa de aclimatación se pueden observar dos períodos: un período de adaptación con poco crecimiento de los brotes seguido de un período de rápido crecimiento (Briones 2015).

12. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son soluciones acuosas; compuestas por compuestos inorgánicos (sustancias minerales) y compuestos orgánicos (azúcares, reguladores de crecimiento, agua, vitaminas, aminoácidos entre otros) que en condiciones óptimas permiten el crecimiento de los explantes vegetales (Boeri 2015; Ramos 2012). Del mismo modo, es importante su asepsia ya que un medio de cultivo contaminado podría afectar el material a propagar.

Los elementos necesarios para la preparación del medio de cultivo pueden variar en las etapas que pasa el explante durante la propagación y según sea la técnica que se va a emplear, debido a ello existen diferentes formulaciones y deben ser ajustadas según las condiciones del laboratorio. Estas fórmulas difieren en la cantidad y concentración de los elementos que lo conforman (Rojas *et al.* 2004).

12.1. COMPUESTOS INORGÁNICOS

12.1.1. SALES MINERALES

Las sales minerales que encontramos disueltas en el agua dentro del medio de cultivo son denominados macro y micro elementos. Estas sales se encargan de dar el soporte nutritivo de las plántulas. Las sales contienen macronutrientes (N, K, P, Ca, Mg, S,) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B), que son requeridos por cualquier planta para su desarrollo normal. Comercialmente se pueden conseguir medios de cultivo ya elaborados. Todos estos medios son recomendados para usarse en una o varias especies y explantes (Barrueto, 2005; Rojas *et al.* 2004). Entre los más empleados para el cultivo de tejidos de especies leñosas se tiene el medio MS (Murashige y Skoog 1962) y el medio WPM (Woody Plant Medium o Medio de plantas leñosas)

a. MS (Murashige y Skoog 1962)

El medio MS es el más común empleado en el cultivo de tejidos vegetales. Este medio fue elaborado por Murashige y Skoog (1962), donde modificaron las composiciones de las sales minerales hasta tener un balance óptimo para la propagación *in vitro* de muchas especies vegetales.

A pesar de que este medio de cultivo es muy empleado en la mayoría de plantas, no siempre es el más adecuado para ciertas especies debido a que tiene un gran contenido de sales. El medio MS es muy rico en sales (Anexo 1) pues contiene concentraciones altas de iones amonio NH_4^+ , iones nitrato NO_3^- , iones cloro Cl^- y MoO_4^- (Martínez *et al.* 2015; Zegarra 2014).

b. **Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1981)**

Conocido también como medio de plantas leñosas, este medio fue elaborado por Lloyd y McCown (1981) y posee una menor concentración de sales (Anexo 2) a diferencia del medio MS. Esta especialmente elaborado para especies leñosas que presentan toxicidad en altas concentraciones de sales (Martínez et. al 2015).

12.2. COMPUESTOS ORGÁNICOS

12.2.1. FUENTE DE CARBONO

Como el explante no puede elaborar su propio alimento, en la preparación del medio se emplea como fuente de energía, como fructuosa, glucosa y principalmente sacarosa. Su adición al medio se justifica debido a que el explante o las plántulas que se generan en propagación *in vitro*, generalmente presentan bajas tasas fotosintéticas debido a las condiciones en las que se desarrollan y no se comportan totalmente autotróficos (Barrueto 2005; Rojas *et al.* 2004).

12.2.2. VITAMINAS

En general, las vitaminas forman parte de enzimas, por lo que son importantes para desempeñar una acción catalítica normal. En este sentido, son cofactores de las enzimas, igual que muchos elementos químicos presentes entre los macro y micronutrientes. En cultivo de tejidos vegetales básicamente son utilizadas las del complejo B, siendo la B₁ probablemente la más frecuentemente incluida. Entre otras vitaminas se emplean también la tiamina, piridoxina, entre otros (Barrueto 2005).

12.2.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO

El componente más importante en el medio de cultivo son los reguladores de crecimiento. La adición de estas fitohormonas puede estimular o detener el crecimiento o diferenciación de algunos órganos de la planta. Estos reguladores de crecimiento pueden ser naturales (hormonas) o sintéticos (reguladores de crecimiento). Entre los principales se encuentran las auxinas, citoquininas y giberelinas (Rojas *et al.* 2004).

a. **Auxinas**

Azcón y Talón (2013) mencionan que las auxinas son hormonas de crecimiento. Estas inducen al alargamiento y división celular. Se adicionan junto con las citoquininas en la etapa de multiplicación o sin la presencia de ellas para la etapa de enraizamiento. Las auxinas más usadas en la micropropagación son el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (AIB) (Boeri 2015; Roca y Mroginski 1991).

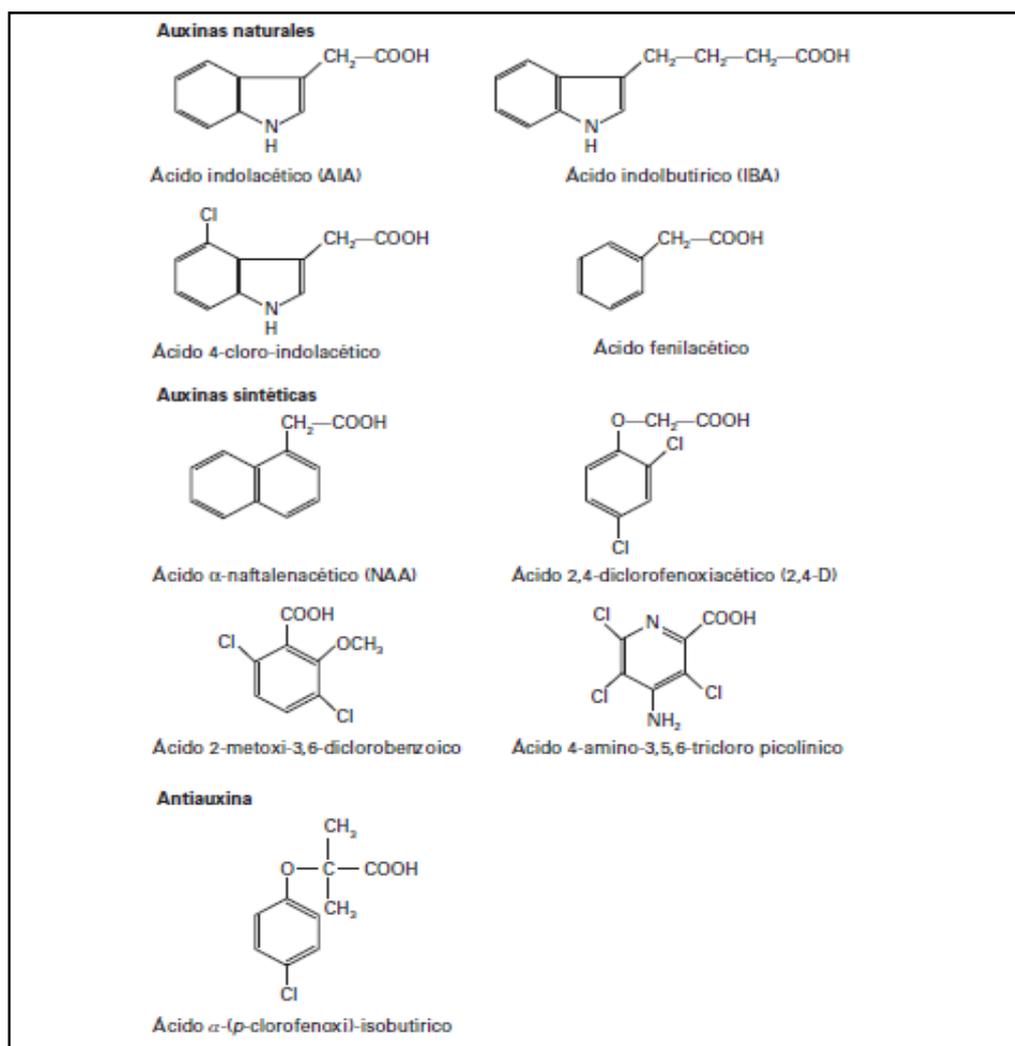


Figura 3: Estructura química de algunas auxinas naturales y sintéticas

FUENTE: Azcón y Talón (2013)

b. Citoquininas

Las citoquininas son hormonas que dentro de la planta se encargan de promover la división celular, retrasar el envejecimiento de las hojas y la promoción de la expansión celular. Es por ello que se usan en la etapa de multiplicación para incentivar las divisiones mitóticas.

Promueven la proliferación de tallos e inducen la formación de brotes adventicios. Las citoquininas más usadas en la multiplicación de plantas *in vitro* son cinetina (KIN), bencilaminopurina (BAP) y zeatina (ZEA) (Boeri 2015; Roca y Mroginski 1991; Azcón y Talón 2013).

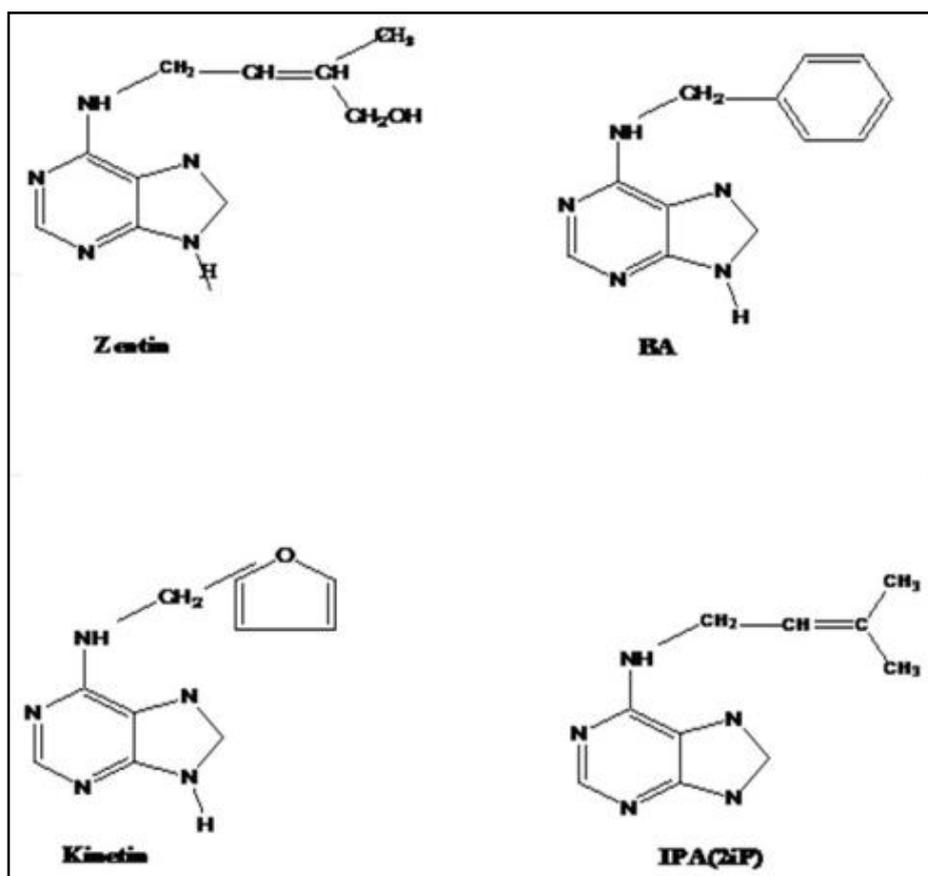


Figura 4: Estructura química de algunas citoquininas

FUENTE: Abobkar et al. (2012)

c. Giberelinas

Las giberelinas se encuentran en las plantas e inducen al alargamiento de las células y a su vez a la ruptura de la dormancia de embriones en semillas. Por lo general la más usada en propagación *in vitro* es el ácido giberélico (AG₃) (Boeri 2015).

12.2.4. AGENTES SOLIDIFICANTES

Los agentes solidificantes son sustancias que ayudan a crear un medio de soporte para los tejidos u órganos que vamos a cultivar. El más empleado para los medios de cultivo solidos es el agar (Rojas et al. 2004).

13. APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA Y EL CULTIVO *IN VITRO* EN EL SECTOR FORESTAL

La madera posee marcadas propiedades físicas y estructurales que la hace un material valioso para la humanidad desde tiempos muy remotos por lo que la demanda mundial de productos forestales está aumentando rápidamente. Se estima que esta demanda aumentará en los próximos años y que pronto podría alcanzarse la capacidad de carga de las tierras forestales. Por lo que la menor disponibilidad de tierras aptas para plantaciones y la gran demanda de ejecución de prácticas ecológicas determinan una gran necesidad de investigar los aspectos forestales sobre el aumento de la productividad (turnos cortos y altos índices de producción) y calidad (maderas superiores, formas, uniformidad del fuste, resistencia a plagas, etc.) de los árboles que tienen importancia económica. En este contexto, la biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las ya conocidas por la silvicultura para cumplir dos objetivos principales: (a) mantener la gran diversidad de los bosques para su conservación y (b) mejoramiento genético en las plantaciones (Martínez *et al.* 2010; Fenning y Gershenzon 2002; FAO 2016).

El cultivo de tejidos es una tecnología importante para los países que se encuentran en desarrollo con metas a la producción vegetal. El cultivo de tejidos comprende a la micropropagación, el aislamiento y cultivo de embriones, la regeneración a partir de callos o de suspensiones celulares, el cultivo de protoplastos, anteras y microesporas. Estas técnicas se emplean para la multiplicación a gran escala de plantas de gran calidad y libre de enfermedades (Martínez *et al.* 2010)

Las técnicas de micropropagación en especies forestales surgen como desarrollo de la biotecnología forestal debido a las altas tasas de reforestación que cada vez aumentan en diferentes partes del mundo. Con el fin de conservar la diversidad genética de las diferentes especies forestales se comienzan a implementar protocolos de micropropagación *in vitro* para especies forestales con el fin de obtener plantaciones con una mayor productividad y mayor cantidad de plántulas para el establecimiento de planes de reforestación (Martínez *et al.* 2010).

Una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* en especies forestales es la crioconservación que consiste en el mantenimiento de células, tejidos u órganos de cultivos en los que se reduce la velocidad de crecimiento o se suspende (mediante la inmersión en nitrógeno líquido). La diversidad genética de especies forestales está seriamente amenazada sobre todo en el caso de las latifoliadas tropicales y especies no industriales (Merkle y Dean 2000, citado por Martínez

et al. 2010). En este contexto, la aplicación actual más resaltante de la crioconservación de especies forestales es la que incluye las estrategias de los cambios de fase para desarrollar una forestación clonal de alto valor, además es una forma particular de conservación de los recursos genéticos para su empleo en programas de mejoramiento (Martínez *et al.* 2010).

Otra aplicación del cultivo *in vitro* en el sector forestal es la regeneración de plantas que es una vía que se está usando para la multiplicación rápida de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación *ex situ*. La intensa depredación del bosque ha conducido a la desaparición de algunas especies forestales y puesto en riesgo a una gran parte de ellas. Por lo tanto, la regeneración de plantas *in vitro* es una forma de poder conservar estas especies con una gran producción a escala. Existen dos vías conocidas para la propagación: (a) organogénesis y (b) embriogénesis somática. Esta última se está considerando como la opción más apropiada para la propagación de especies forestales ya que permite una mayor tasa de multiplicación (Martínez *et al.* 2010; Häggman 1991).

Y es el desarrollo de estas técnicas de cultivo de tejidos que ha generado avances muy significativos en los sistemas de transferencia de genes seleccionados a células vegetales y en la producción de plantas transgénicas. De ahí que se han comenzado a desarrollar investigaciones en árboles modificados genéticamente donde se puede modificar ciertos rasgos de interés como lo son la resistencia a herbicidas, floración reducida, resistencia a insectos e incluso a la formación de lignina para obtener una pulpa para papel de mayor calidad. A su vez se vienen desarrollando más técnicas de identificación en la variación de ADN entre las especies forestales y con ello el desarrollo de la biotecnología forestal. (Fenning y Gershenzon 2002; Martínez *et al.* 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. UBICACIÓN DEL ENSAYO EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Silvicultura (LAS) de la Facultad de Ciencias Forestales (FCF) de la Universidad Nacional Agraria La Molina y 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), ambos ubicados en el distrito de La Molina, departamento de Lima.

2. CARACTERÍSTICAS MICROAMBIENTALES

2.1. CUARTO DE CULTIVO

Temperatura: $26\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Humedad relativa: 70%

Intensidad lumínica: 5440 lx

Fotoperíodo: 16 horas luz/ 8 horas oscuridad

3. ZONA DE OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se emplearon 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.

4. 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 presentados en la Tabla 3 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, como se muestra en la Figura 5.

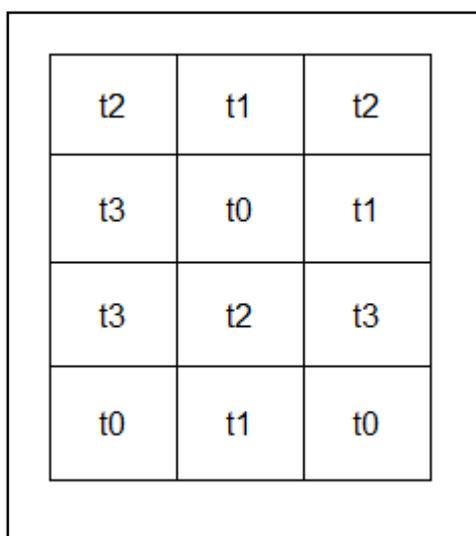


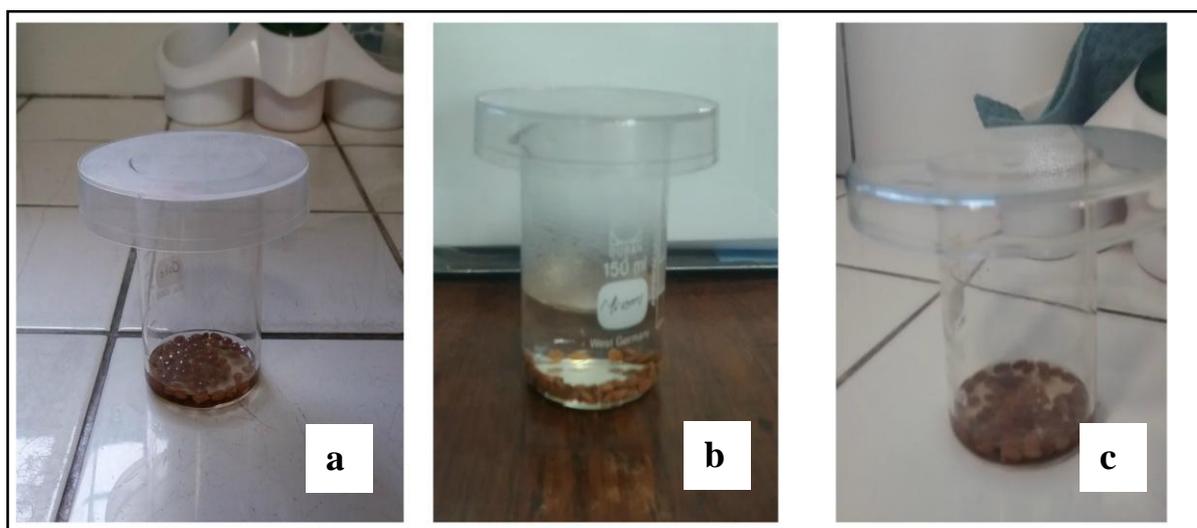
Figura 5: Distribución de los tratamientos en la bandeja de siembra

FUENTE: Elaboración propia

Tabla 3: Tratamientos pregerminativos

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>
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

FUENTE: Elaboración propia



(a) Acetona 100%, (b) agua caliente 80°C y (c) ácido sulfúrico 72%

Figura 6: Inmersión de semillas durante 10 minutos en tratamientos pregerminativos

FUENTE: Elaboración propia

4.1. PERÍODO DE EVALUACIÓN

Se evaluó el número de semillas germinadas por tratamiento y la evaluación se realizó tres veces por semana en un período de 30 días. Las semillas germinadas se extrajeron de la bandeja en el momento de la evaluación con el fin de evitar alguna confusión y realizar un mal conteo.

5. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

Previamente a la germinación de semillas para la obtención de explantes para la fase de multiplicación, se requiere definir un protocolo adecuado para disminuir la contaminación en los tubos. Para lo cual se preparó medio de cultivo y se realizó la desinfección superficial de semillas y se desinfectaron en hipoclorito de sodio (NaOCl).

5.1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Se preparó medio de cultivo MS Sigma (2,2g/L) adicionado con sacarosa (30g/L), se enrazó con agua destilada en una probeta y se ajustó el pH a $5,7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl). Como agente solidificante se empleó agar Caisson (7g/L) se diluyó calentándolo en microondas y posteriormente se dispensó 10ml en cada tubo de ensayo. En total se vertió el medio en 270 tubos de ensayo, se tapó con papel aluminio y se esterilizó en autoclave con una presión de 15psi a 121 ° C por 15 minutos.

5.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE SEMILLAS

Previo a la desinfección se sumergieron las semillas en agua caliente a 80 °C durante 10 minutos como tratamiento pregerminativo para aumentar el porcentaje de germinación. Luego las semillas se lavaron con detergente común y se enjuagaron con agua potable hasta eliminar el resto de detergente. Después se enjuagaron con agua destilada tres veces y se dejaron remojar en el fungicida Benomyl (2g/L) durante una hora (Figura 7).

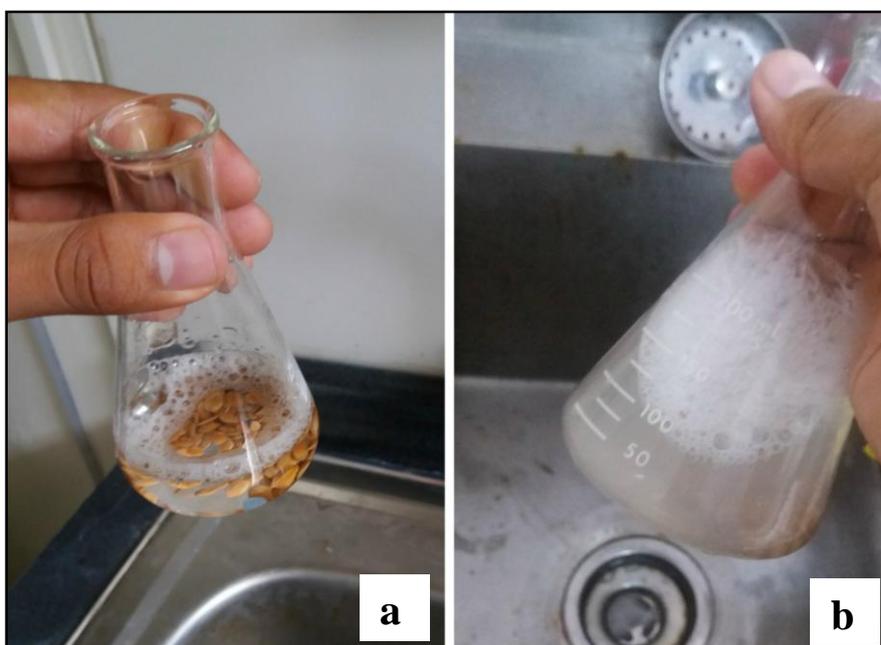
Posteriormente bajo condiciones de cámara de flujo laminar, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 70 por ciento por un minuto. Después se sumergieron en hipoclorito de sodio de acuerdo a los tratamientos en evaluación en diferentes matraces, como se muestra en la Figura 8. Se plantearon nueve tratamientos con tres concentraciones de hipoclorito de sodio en tres tiempos de inmersión diferentes (Tabla 4).

Para finalizar se sembró cada semilla dentro de un tubo de ensayo con medio de cultivo preparado anteriormente. Se tapó con papel aluminio y se selló con *parafilm*.

Tabla 4: Tratamientos para la desinfección de semillas de *Prosopis pallida*

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración NaOCl (%) V/V</i>	<i>Tiempo (min)</i>
t1	1,2	15
t2	1,2	20
t3	1,2	25
t4	1,5	15
t5	1,5	20
t6	1,5	25
t7	1,8	15
t8	1,8	20
t9	1,8	25

FUENTE: Elaboración propia



(a) Lavado con detergente y (b) Inmersión de semillas en benomyl

Figura 7: Desinfección de semillas

FUENTE: Elaboración propia



Figura 8: Inmersión de semillas en los nueve tratamientos de desinfección

FUENTE: Elaboración propia

5.2.1. VARIABLES EVALUADAS

a. Porcentaje de unidades contaminadas

A los 50 días de la siembra se contó la cantidad de tubos que mostraron presencia de patógenos, tipo hongos y/o bacterias.

b. Porcentaje de plántulas establecidas

A los 50 días de la siembra se contó la cantidad de plántulas que se establecieron por cada tratamiento en cada una las repeticiones.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial tomando como factores la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión para lo cual se utilizaron nueve tratamientos con tres repeticiones de diez unidades experimentales cada uno.

5.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el procesamiento de los datos se empleó el análisis de varianza empleando el *software* «Infostat» y la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza.

5.3.2. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 25mm diámetro x 150mm de longitud conteniendo 10ml de medio de cultivo donde se sembró una semilla de cada uno de los tratamientos en estudio.

6. OBTENCIÓN DE EXPLANTES *IN VITRO*

Para la obtención de explantes para la fase de multiplicación, se realizó la germinación *in vitro* de semillas de *Prosopis pallida*.

Para ello, se remojaron las semillas en agua caliente a una temperatura de 80°C durante 10 minutos. Se siguió el mismo proceso de desinfección superficial mencionado anteriormente y se aplicó el mejor tratamiento de desinfección que resultó de la etapa anterior (1,2 por ciento de NaOCl durante 15 minutos)

Las semillas se sembraron dentro de tubos de ensayo con medio de cultivo MS e incubaron en el cuarto de cultivo a 26 °C y fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad.

7. FASE DE MULTIPLICACIÓN

Se plantearon 16 tratamientos (medio de cultivo adicionado con citoquininas) para la multiplicación de *Prosopis pallida*. Se emplearon dos medios de cultivo diferentes adicionando dos tipos de citoquininas diferentes en cuatro concentraciones distintas (Tabla 5).

Tabla 5: Tratamientos para la multiplicación de *Prosopis pallida* a partir de yemas apicales

<i>Tratamiento</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Citoquinina</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
t1	MS	BAP	0,0
t2	MS	BAP	0,5
t3	MS	BAP	1,0
t4	MS	BAP	1,5
t5	MS	ZEA	0,0
t6	MS	ZEA	0,5
t7	MS	ZEA	1,0
t8	MS	ZEA	1,5
t9	WPM	BAP	0,0
t10	WPM	BAP	0,5
t11	WPM	BAP	1,0
t12	WPM	BAP	1,5
t13	WPM	ZEA	0,0
t14	WPM	ZEA	0,5
t15	WPM	ZEA	1,0
t16	WPM	ZEA	1,5

MS = Murashige y Skoog (1962) WPM = Medio de plantas leñosas BAP = Bencilaminopurina
ZEA = Zeatina

FUENTE: *Elaboración propia*

7.1. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE EXPLANTE

En principio se planteó trabajar con las yemas apicales provenientes de plántulas germinadas *in vitro*. Sin embargo, al realizar el ensayo, no se obtuvo el resultado esperado, por lo que se buscó determinar el tipo de explante. Luego se trabajó con yemas apicales con sus cotiledones, pero tampoco se obtuvo los resultados esperados y se presentó la necrosis de la yema apical. Para cada prueba se analizaron los datos obtenidos y se realizó una tercera prueba donde se empleó como explante la yema apical con sus cotiledones y utilizó otro tipo de tapa para los tubos de ensayo.

7.2. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES

7.2.1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Cada uno de los medios MS (4,43g/L) y WPM (2,47g/L), ambos adicionados de sacarosa (30g/L), se enrazó con agua destilada y distribuyó en 16 frascos de acuerdo a los 16 tratamientos que se emplearon en esta etapa. A cada uno se le adicionó la concentración de citoquininas de cada tratamiento. Luego, se ajustó el pH de cada tratamiento a 5,7 con la

adición de NaOH y/o HCL. Posteriormente se adicionó agar (7g/L) y calentó hasta que el agar este completamente disuelto. Se distribuyó cada tratamiento en los tubos respectivos, se tapó con papel aluminio y se esterilizó en autoclave a una presión de 15psi a 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar.

7.2.2. INTRODUCCIÓN DE YEMAS APICALES

Para este ensayo se extrajeron las yemas apicales de las plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* y se colocaron en los tubos de ensayo con los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. Todo esto se hizo con ayuda de un bisturí y una pinza larga en condiciones estériles de cámara de flujo laminar. Luego se incubaron a 26 °C y fotoperiodo de 16 h luz/ 8h de oscuridad durante cuatro semanas.

Debido a que las yemas apicales introducidas no elongaron ni formaron brotes, no continuó con el ensayo de multiplicación.

7.2.3. VARIABLES EVALUADAS

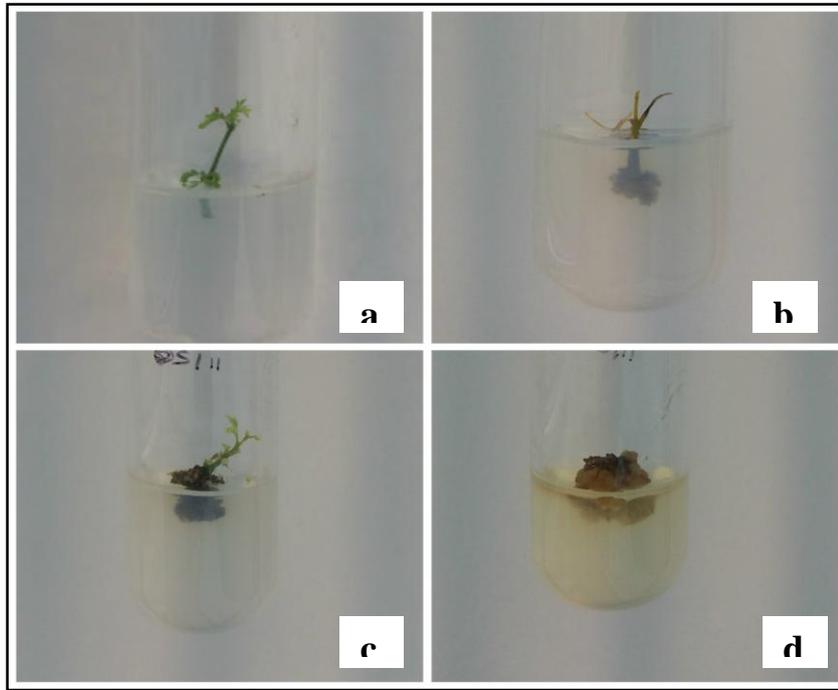
a. Formación de callos

Como las yemas apicales presentaron callos se evaluó la presencia de callos haciendo uso de una escala de cuatro grados de acuerdo a la porción de explante que presentó el callo (Tabla 6).

Tabla 6: Escala de callo presente en el explante

Grado	Descripción
Grado 0	Ausencia de callo
Grado I	Presencia de callo en la base del explante
Grado II	Presencia de callo en el 50% del explante
Grado III	Presencia de callo en todo el explante

FUENTE: Elaboración propia



(a) Grado 0, (b) Grado I, (c) Grado II y (d) Grado III

Figura 9: Grados de callosidad

FUENTE: Elaboración propia

7.2.4. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 25mm diámetro x 150mm de longitud conteniendo 10ml de medio donde se colocó una yema apical (Figura 10).



Figura 10: Yema apical sembrada *in vitro*

FUENTE: Elaboración propia

7.3. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON SUS COTILEDONES

7.3.1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Se realizó el mismo procedimiento para la preparación de medio de cultivo que la etapa anterior con la variación de que se empleó el MS a media fuerza (2,22 g/L) y se dispensó 30ml en cada frasco.

Tabla 7: Tratamientos para la multiplicación de *Prosopis pallida* a partir de yemas apicales con cotiledones

<i>Tratamiento</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Citoquinina</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
t1	MS/2	BAP	0,0
t2	MS/2	BAP	0,5
t3	MS/2	BAP	1,0
t4	MS/2	BAP	1,5
t5	MS/2	ZEA	0,0
t6	MS/2	ZEA	0,5
t7	MS/2	ZEA	1,0
t8	MS/2	ZEA	1,5
t9	WPM	BAP	0,0
t10	WPM	BAP	0,5
t11	WPM	BAP	1,0
t12	WPM	BAP	1,5
t13	WPM	ZEA	0,0
t14	WPM	ZEA	0,5
t15	WPM	ZEA	1,0
t16	WPM	ZEA	1,5

MS/2 = Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración WPM = Medio de plantas leñosas
BAP = Bencilaminopurina ZEA = Zeatina

FUENTE: Elaboración propia

7.3.2. INTRODUCCIÓN DE YEMAS APICALES CON SUS COTILEDONES

Con ayuda de un bisturí y una pinza larga en condiciones *in vitro*, se extrajeron secciones de yemas apicales con cotiledones y 1,5 a 2 cm del hipocótilo por debajo del nudo cotiledonar provenientes de plántulas germinadas *in vitro* (Figura 11). Las yemas apicales se mantuvieron en los frascos por cuatro semanas esperando se elongación y se incubaron en el cuarto de cultivo. Sin embargo, en la segunda semana de incubación, se observó la necrosis de las yemas apicales.



Figura 11: Sección de yema apical con sus cotiledones y parte de hipocótilo

FUENTE: Elaboración propia

A pesar de que se observó la necrosis apical, si hubo una producción de nudos y brotes, por lo que, a las cuatro semanas, se realizó el corte de las yemas axilares las cuales fueron subcultivadas en medios frescos conteniendo el mismo tratamiento del cual provenían. Se esperaba realizar hasta tres subcultivos, sin embargo, solo se pudo realizar el primero ya que al provenir de explantes débiles las yemas axilares en algunos casos no prosperaron y en otros formaron brotes muy pequeños los cuales pasando las cuatro semanas se necrosaron.

7.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo trifactorial tomando como factores principales el tipo de medio de cultivo, el tipo de citoquinina y la concentración de está para lo cual se utilizaron 16 tratamientos en tres repeticiones de diez unidades experimentales cada uno.

a. Análisis estadístico

Se usó el análisis de varianza empleando el *software* «Infostat» y la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza.

b. **Unidad experimental**

La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de 25mm diámetro x 150mm de longitud conteniendo 30ml de medio de cultivo con una yema apical con sus cotiledones (Figura 12).



Figura 12: Frasco con sección de yema apical y sus cotiledones

FUENTE: Elaboración propia

7.3.4. VARIABLES EVALUADAS

a. **Formación de brotes y nudos axilares**

Se contabilizó la cantidad de brotes y nudos axilares por cada yema apical por tratamiento a las cuatro semanas.

7.4. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON SUS COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN

7.4.1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Se realizó el mismo procedimiento para la preparación de medio de cultivo que la etapa anterior con la diferencia de que se selló con tapas de algodón y gasa para permitir el

intercambio gaseoso y disminuir la concentración de humedad. Debido a los datos obtenidos en las etapas anteriores, se redujo el número de tratamientos empleando solo el medio de cultivo WPM (Tabla 8).

Tabla 8: Tratamientos seleccionados para la multiplicación de *Prosopis pallida* a partir de yemas apicales con cotiledones en medio WPM

<i>Tratamiento</i>	<i>Citoquinina</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
t1	Sin citoquinina	0,0
t2	BAP	0,5
t3	BAP	1,0
t4	BAP	1,5
t5	ZEA	0,5
t6	ZEA	1,0
t7	ZEA	1,5

BAP = Bencilaminopurina ZEA = Zeatina

FUENTE: Elaboración propia

7.4.2. INTRODUCCIÓN DE YEMA APICAL CON SUS COTILEDONES

Con ayuda de un bisturí y una pinza larga en condiciones *in vitro*, se extrajeron secciones de yemas apicales con cotiledones y 1,5 a 2 cm de hipocótilo por debajo del nudo cotiledonar, provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, se introdujo una yema apical con sus cotiledones. Las yemas apicales se mantuvieron en los tubos de ensayo por cuatro semanas en condiciones de cuarto de cultivo.

Transcurrido este período, se realizó un segundo subcultivo donde las yemas apicales y axilares (microestacas) provenientes de cada explante se sembraron en tubos conteniendo 10ml del medio de cultivo y citoquininas de acuerdo a cada tratamiento descrito anteriormente (Figura 13).

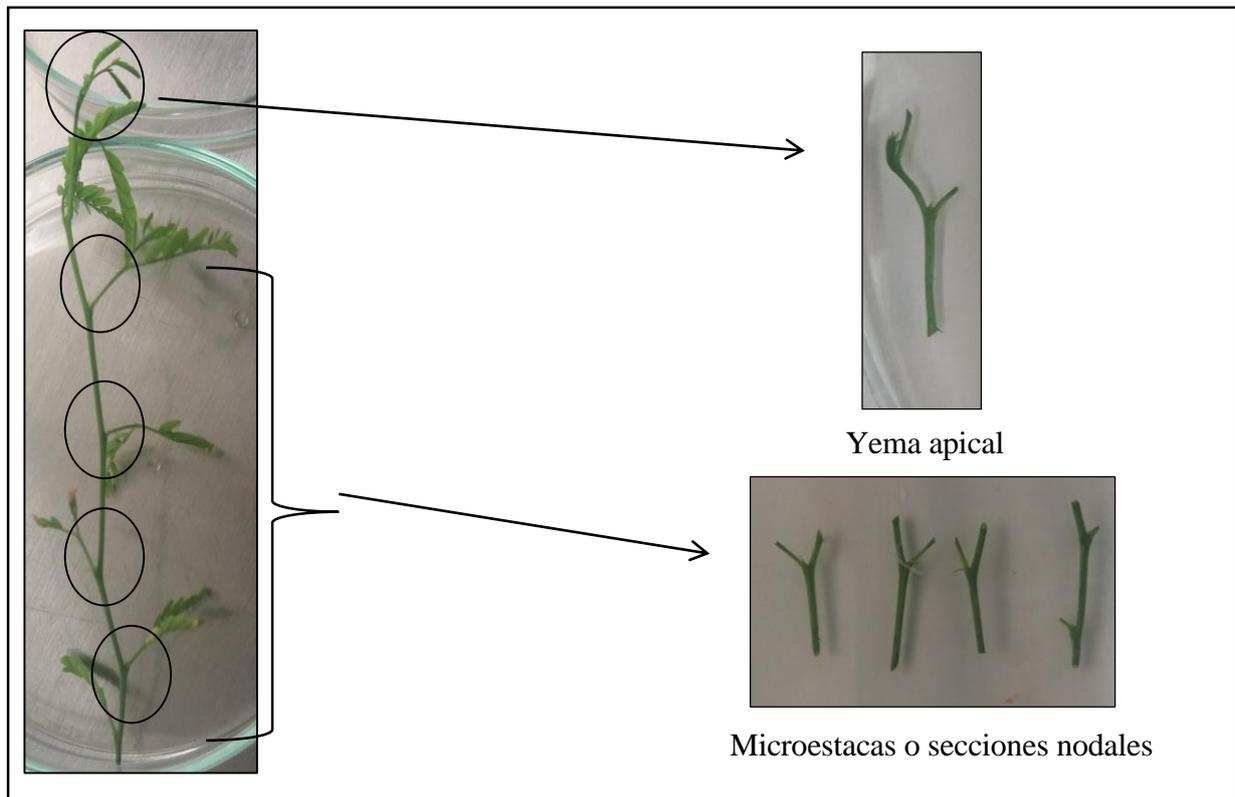


Figura 13: Secciones de plántulas utilizados para segundo subcultivo

FUENTE: Elaboración propia

7.4.3. VARIABLES EVALUADAS

a. Formación de nudos

Se contabilizó la cantidad de secciones nodales por cada yema apical por tratamiento en el primer subcultivo a las cuatro semanas.

b. Altura de la vitro plántula

Se midió la altura de las yemas apicales en centímetros en el primer subcultivo a las cuatro semanas.

c. Formación de brotes

Se contabilizó la cantidad de brotes por cada sección nodal y apical sembrada por tratamiento en el segundo subcultivo a las seis semanas.

7.4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial tomando como factores principales el tipo de citoquinina y la concentración de ésta, para lo cual se utilizaron siete tratamientos con tres repeticiones de diez unidades experimentales cada uno.

a. **Análisis estadístico**

Se usó el análisis de varianza empleando el *software* «Infostat» y la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza.

b. **Unidad experimental**

La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 25mm diámetro x 150mm de longitud conteniendo 10ml de medio de cultivo teniendo una yema apical con sus cotiledones (Figura 14).

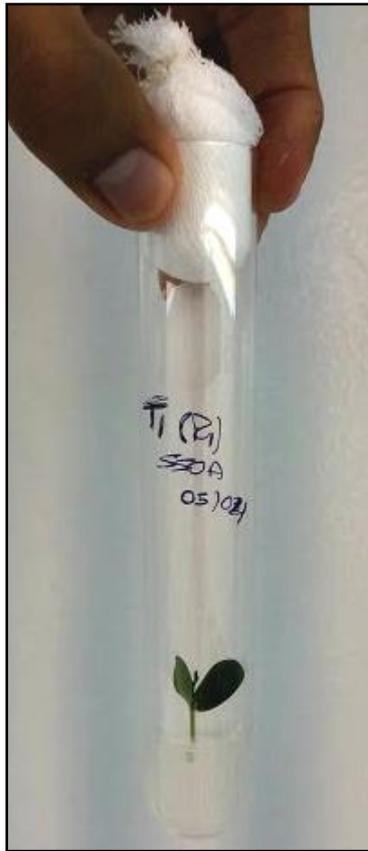


Figura 14: Yema apical sembrada en tubo de ensayo con tapa de algodón

FUENTE: Elaboración propia

8. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Se plantearon 7 tratamientos para definir el protocolo adecuado para el enraizamiento de microestacas de *Prosopis pallida*. Se empleó el medio WPM adicionado de diferentes tipos de auxinas en dos concentraciones diferentes (Tabla 9).

Tabla 9: Tratamientos para el enraizamiento de microestacas de *Prosopis pallida* en medio WPM

<i>Tratamiento</i>	<i>Auxina</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
t1	Sin auxinas	0,0
t2	ANA	0,5
t3	ANA	1,0
t4	AIB	0,5
t5	AIB	1,0
t6	AIA	0,5
t7	AIA	1,0

ANA = Ácido naftalenacético AIB = Ácido indolbutírico AIA = Ácido indolacético

FUENTE: *Elaboración propia*

8.1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Se preparó el medio de cultivo WPM (2,47 g/L) adicionando sacarosa (30g/L), se enrazó con agua destilada y se distribuyó en siete matraces de acuerdo a cada tratamiento programado para esta etapa. A cada uno se le adicionó diferentes concentraciones de auxinas de acuerdo al tratamiento y se ajustó el pH a $5,7 \pm 0,1$ con la adición de NaOH y /o HCL. Posteriormente se adicionó agar (7g/L) y se calentó hasta que el agar este completamente disuelto. Se distribuyó cada tratamiento en los tubos respectivos, se tapó con tapones hechos con algodón y gasa; se esterilizó en autoclave con una presión de 15psi a 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar.

8.2. INTRODUCCIÓN DE MICROESTACAS EN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO

Para esta etapa, se extrajeron los brotes obtenidos de la fase de multiplicación (microestacas) y se sembraron en los tubos distribuidos en cada tratamiento. Después de cinco semanas se realizó la evaluación.

8.2.1. VARIABLES EVALUADAS

a. Porcentaje de enraizamiento

Luego de culminado la etapa de enraizamiento (5 semanas), se evaluó el porcentaje de microestacas que presentaron raíces en cada tratamiento.

b. Número de raíces

Se contó el número raíces que se desarrollaron por cada plántula en cada uno de los tratamientos.

c. Longitud de raíces

Se midió la longitud de la raíz principal en cada uno de los tratamientos empleando un papel milimetrado y se representó en cm.

8.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial tomando como factores el tipo de auxina y su concentración para lo cual se utilizaron siete tratamientos con tres repeticiones de cinco unidades experimentales cada uno.

8.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó el análisis de varianza empleando el *software* «Infostat» y la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza.

8.3.2. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituido por un tubo de ensayo de 25mm diámetro x 150mm de longitud conteniendo 10ml de medio de cultivo donde se sembró una microestaca por tubo (Figura 15).

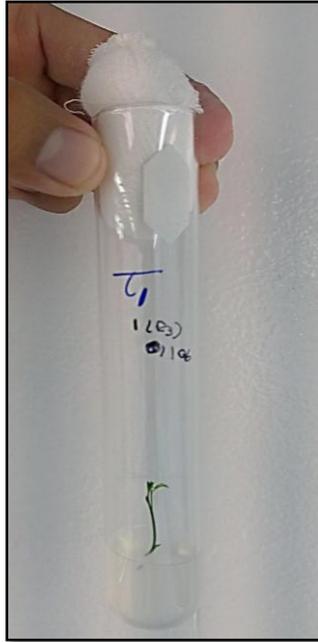


Figura 15: Microestaca sembrada en medio de enraizamiento

FUENTE: Elaboración propia

9. FASE DE ACLIMATACIÓN

Para la etapa de aclimatación se trabajó con dos tipos de sustratos: (a) sustrato premix #8 y (b) pastillas jiffys #30

9.1. ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS

Las plántulas provenientes de la etapa de enraizamiento se llevaron al invernadero y se distribuyeron en los dos sustratos mencionados anteriormente. Las pastillas jiffys se hidrataron con agua destilada por tres horas para su formación mientras que el sustrato premix se colocó en vasos de plástico transparente. Se sembró una plántula en cada pastilla jiffys y en cada vaso con sustrato premix, como se muestra en la Figura 16. Se realizó el riego de las plántulas con agua destilada tres veces a la semana durante un periodo de 30 días. Transcurrido este período, se realizaron las evaluaciones respectivas

9.1.1. VARIABLE EVALUADA

a. Porcentaje de aclimatación

Se evaluó el porcentaje de plántulas aclimatadas en términos de sobrevivencia. Se hizo el monitoreo por un período de 4 semanas y se contaron las plántulas que lograron aclimatarse a las condiciones naturales en este periodo.

9.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial tomando como factor el tipo de sustrato con tres repeticiones de 10 unidades experimentales cada uno.

9.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó el análisis de varianza empleando el *software* «Infostat» y la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza.

9.2.2. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por cada plántula con los sustratos mencionados anteriormente.



Figura 16: Aclimatación de plántulas de algarrobo en (a) pastillas jiffys y (b) sustrato premix.

FUENTE: Elaboración propia

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ENSAYO PRELIMINAR DE TRATAMIENTOS PRE GERMINATIVOS

La evaluación de la germinación de las semillas se realizó tres días a la semana por un período de 30 días. Los resultados de los porcentajes de germinación demuestran que el mejor tratamiento pregerminativo fue agua caliente durante 10 minutos (Figura 17).

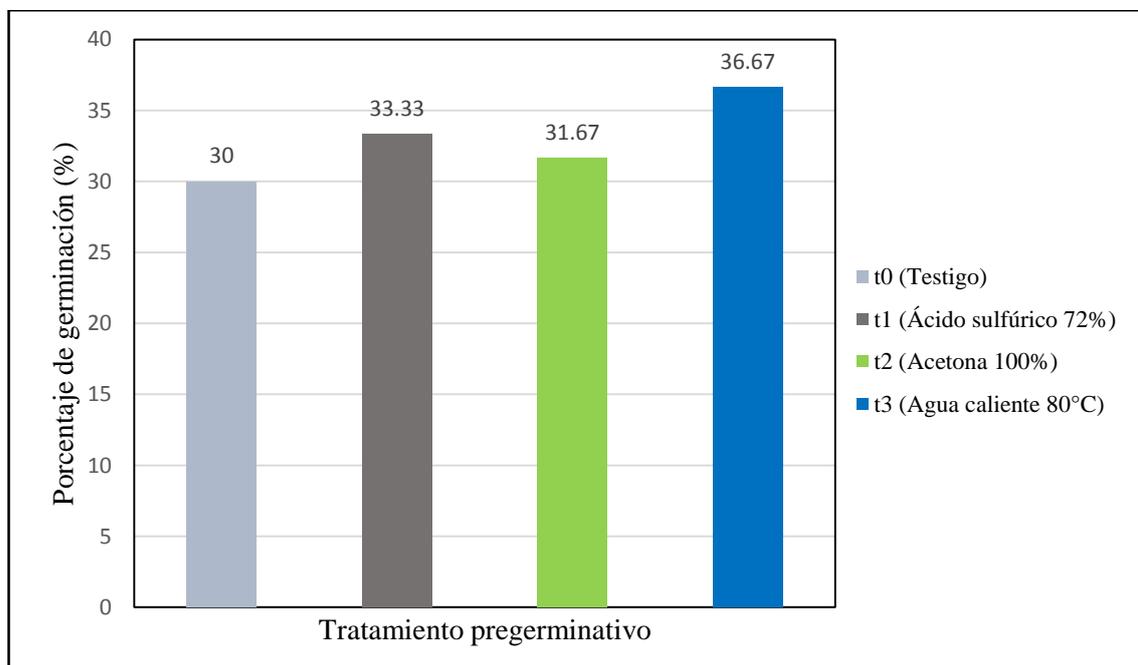


Figura 17: Porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos pre germinativos.

Se observa que el mayor porcentaje de germinación se obtuvo con el tratamiento de agua caliente (36,67 por ciento) seguido del tratamiento de acetona al 100 por ciento con 33,33 por ciento de porcentaje de germinación. Si bien el tratamiento con ácido sulfúrico al 72 por ciento aceleró ligeramente la germinación (31,67 por ciento) no hubo una gran diferencia con el grupo testigo (30 por ciento).

El mejor tratamiento fue el de agua caliente a 80°C. 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, pero no resultó como

uno de los mejores. Del mismo modo los resultados obtenidos son similares a los presentados por Sobrevilla *et al.* (2013), quienes reportaron buenos resultados en *Prosopis laevigata* (20 por ciento) sobre el porcentaje de germinación 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* evaluados en la investigación. De la misma manera, Tapia *et al.* (2012) no tuvieron buenos resultados con la acetona al 100 por ciento con un tiempo de inmersión de 30 minutos para *Prosopis chilensis*. Por lo que se deduce que la acetona 100 por ciento tiene buenos efectos a mayor tiempo de inmersión.

El ácido sulfúrico al 72 por ciento 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 por ciento de porcentaje de germinación) siendo el segundo mejor tratamiento que obtuvieron de los nueve que evaluaron. A diferencia de ellos, Sobrevilla *et al.* (2013) obtuvo 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. 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.

2. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE SEMILLAS

El análisis de varianza para las variables porcentaje de plántulas establecidas y el porcentaje de contaminación no presentó diferencias estadísticamente significativas para la concentración de hipoclorito de sodio, para el tiempo de inmersión ni para la interacción concentración de hipoclorito con tiempo de inmersión (Anexo 5).

Sin embargo, se debió seleccionar el mejor tratamiento de los nueve planteados para definir el protocolo de desinfección por lo que se realizó el análisis de promedios para el porcentaje de plántulas establecidas y el porcentaje de tubos que presentaron contaminación con algún hongo y/o bacteria.

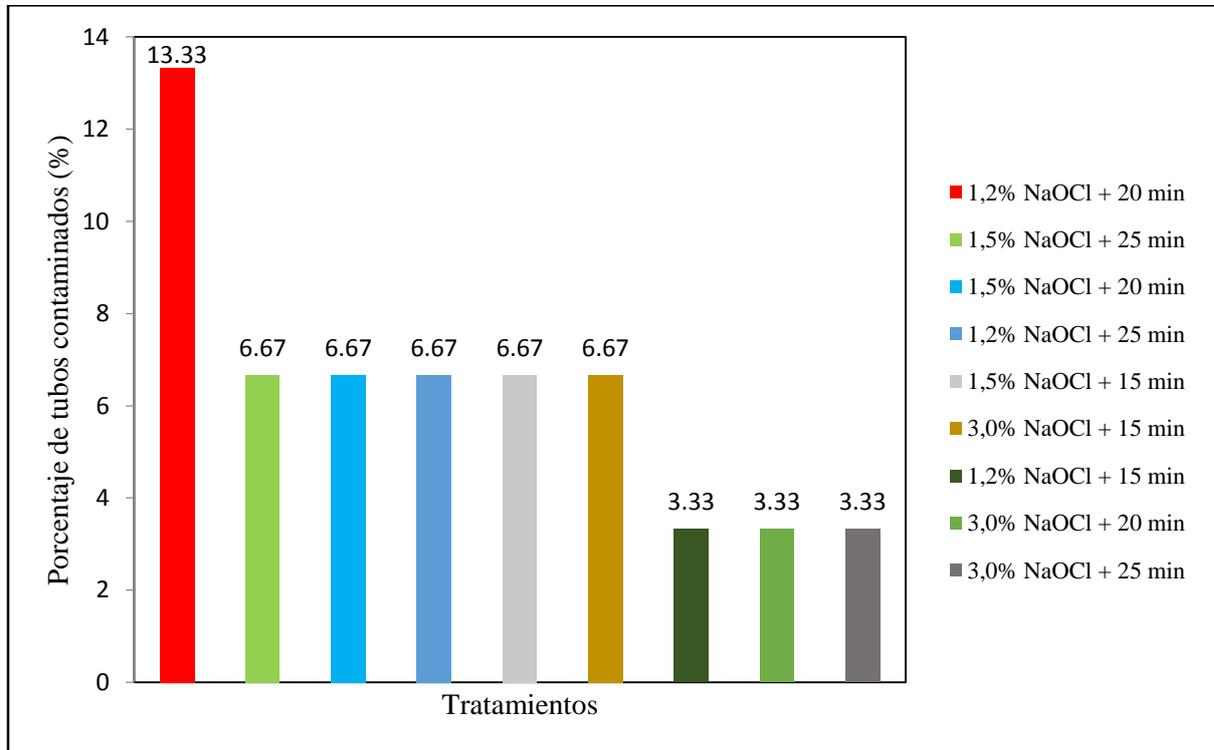


Figura 18: Porcentaje de tubos contaminados por tratamiento

En la Figura 18, Se observa que los tratamientos t1 (1,2 por ciento de NaOCl durante 15 minutos), t8 (1,8 por ciento de NaOCl durante 20 minutos) y t9 (1,8 por ciento de NaOCl durante 25 minutos) fueron los que presentaron menor contaminación con 3,33 por ciento de contaminación cada uno.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de hipoclorito de sodio no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 1,2; 1,5 y 3,0 (Anexo 5); el porcentaje de tubos contaminados fue de 7,78; 6,67 y 4,44 por ciento respectivamente. Siendo 1,8 por ciento la concentración presentó un menor porcentaje de contaminación (Figura 19).

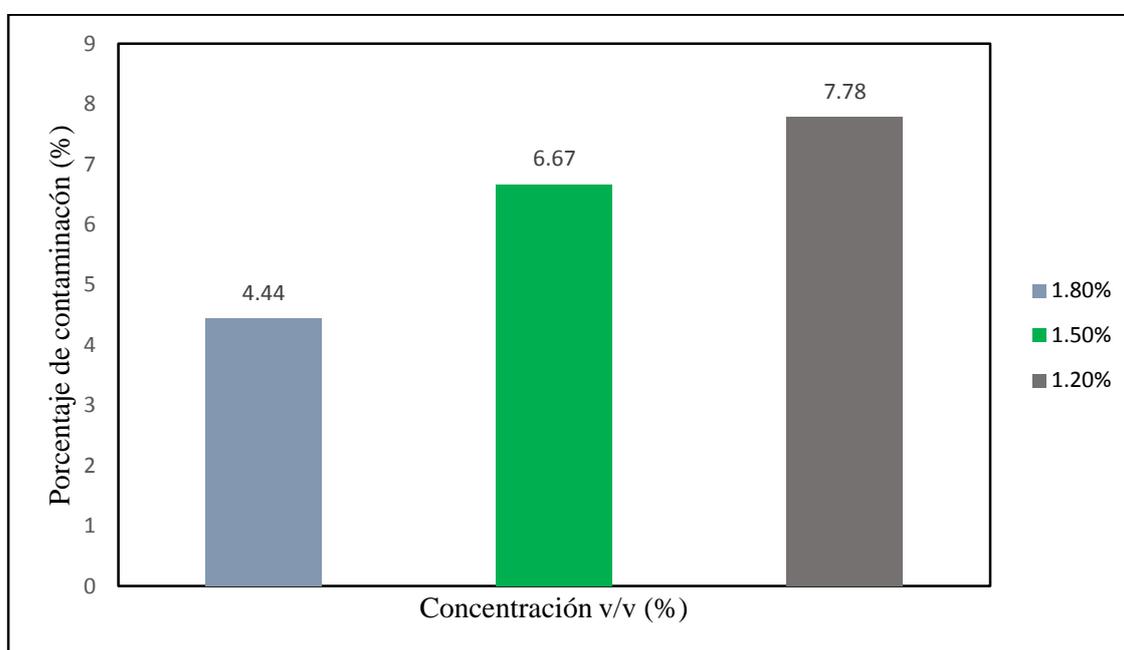


Figura 19: Porcentaje de contaminación por concentración de NaOCl

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tiempo de inmersión no presentó diferencias estadísticamente significativas para los tiempos 15, 20 y 25 min (Anexo 5); el porcentaje de tubos contaminados fue de 7,78; 5,56 y 5,56 por ciento respectivamente. Siendo 15 minutos el tiempo que presentó un menor porcentaje de contaminación (Figura 20).

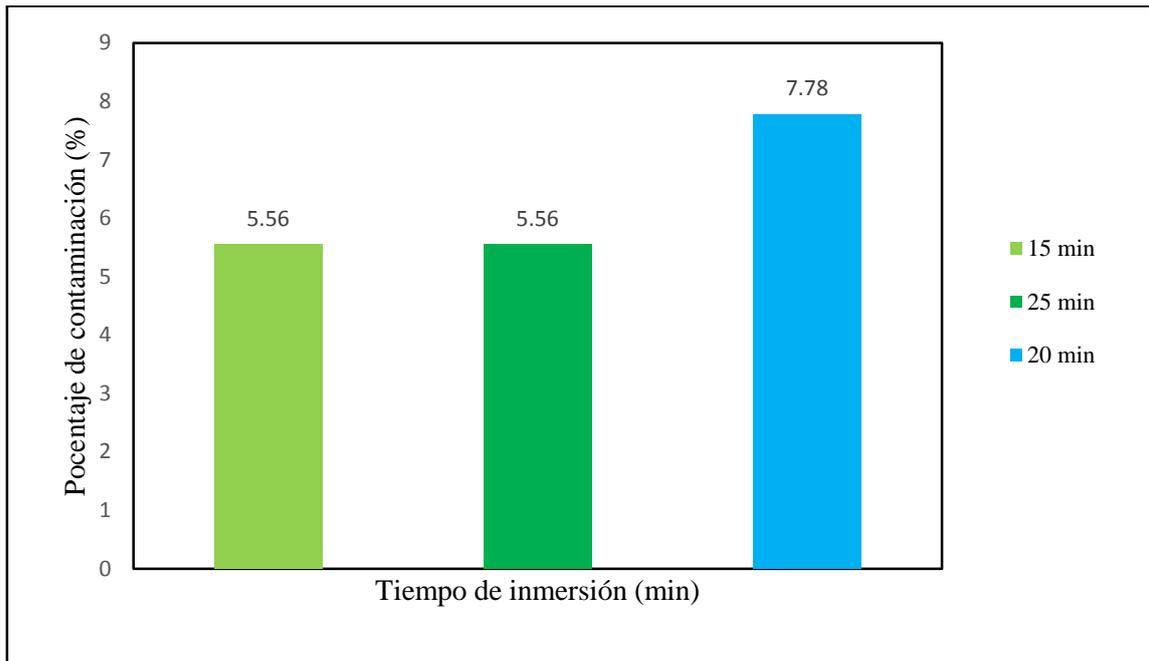


Figura 20: Porcentaje de contaminación por tiempo de inmersión

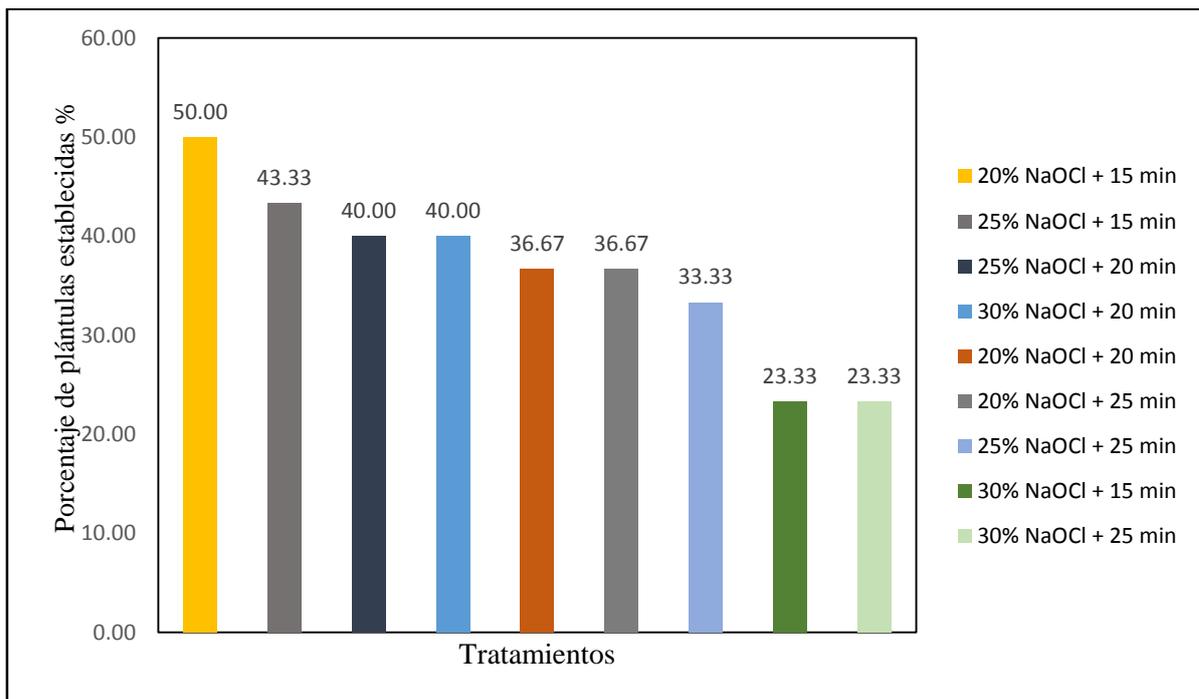


Figura 21: Porcentaje de plántulas establecidas por tratamiento.

En la Figura 21, se observa que t1 (1,2 por ciento durante un tiempo de inmersión de 15 minutos) es el tratamiento con el que se obtuvo un mayor porcentaje con 50 por ciento de plántulas establecidas seguido del tratamiento t4 (1,5 por ciento de hipoclorito de sodio en un tiempo de 15 minutos) con 43,33 por ciento de plántulas establecidas.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de hipoclorito de sodio no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 1,2; 1,5 y 1,8 (Anexo 5); el porcentaje de plántulas establecidas fue de 41,11; 38,89 y 28,89 por ciento respectivamente. Siendo 1,2 por ciento la concentración que presentó un mayor porcentaje de plántulas establecidas (Figura 22).

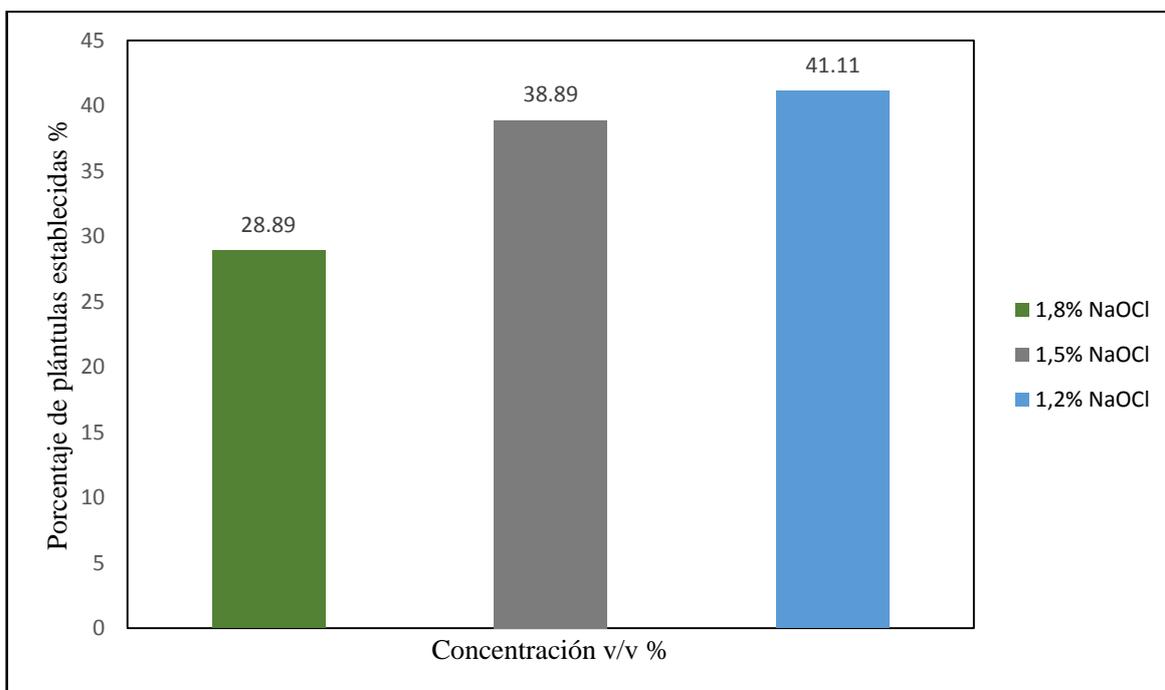


Figura 22: Porcentaje de plántulas establecidas por concentración de NaOCl

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tiempo de inmersión no presentó diferencias estadísticamente significativas para los tiempos 15, 20 y 25 min (Anexo 5); el porcentaje de tubos contaminados fue de 38,89; 38,89 y 31,11 por ciento respectivamente. Siendo 15 y 20 minutos los tiempos que presentaron un mayor porcentaje de plántulas establecidas (Figura 23).

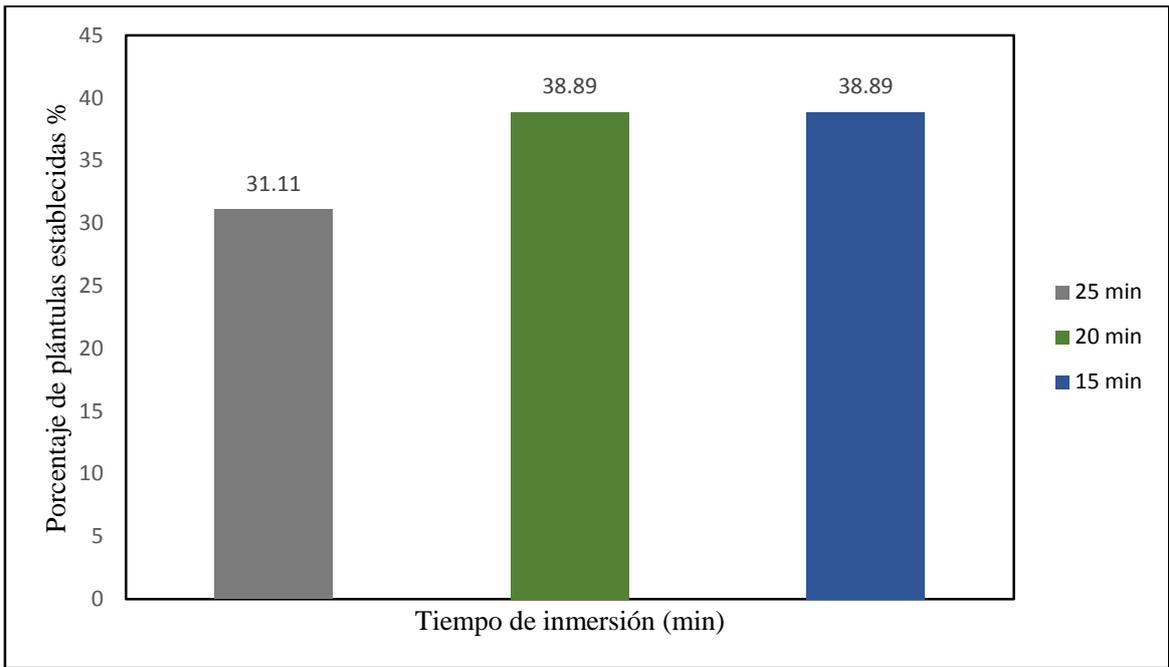
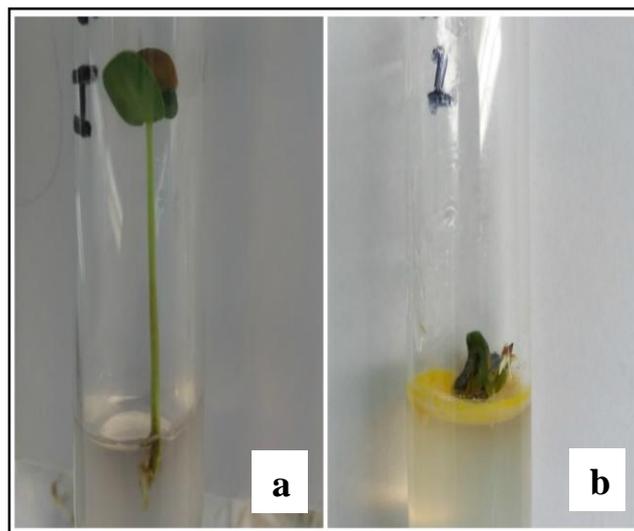


Figura 23: Porcentaje de plántulas establecidas por tiempo de inmersión

Para seleccionar el tratamiento adecuado para la desinfección de semillas de *Prosopis pallida* se buscó aquel que presentó un mayor porcentaje de plántulas y la menor contaminación (Figura 12). De acuerdo a las medias obtenidas, el tratamiento que se adecua mejor a estas características es el tratamiento de 1,2 por ciento de NaOCl durante 15 minutos (t1).



(a) Plántula germinada libre de contaminantes y (b) Semilla contaminada

Figura 24: Plántulas de algarrobo germinadas

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*. Los autores realizaron diferentes pruebas de técnicas de desinfección tanto en embriones como en semillas. Demostraron que 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 la contaminación de las semillas.

En el caso del presente trabajo, el tratamiento con agua caliente realizado a las semillas antes de ser desinfectadas puede que elimine 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 desinfectante para obtener un menor porcentaje de contaminación lo que explicaría que un tratamiento con un bajo porcentaje de hipoclorito de sodio de lugar a una menor contaminación.

Borges *et al.* (2009) evaluaron tratamientos de desinfección para segmentos uninodales de plantas madre de *Dioscorea alata*, donde trabajaron con nueve tratamientos en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y en diferentes tiempos de inmersión. Como resultado obtuvieron como el mejor tratamiento, una concentración de 1,5 por ciento de NaOCl durante 30 minutos de inmersión. En este caso, al aumentar la concentración disminuía la contaminación, pero también el establecimiento de los explantes, esto debido a que mayores concentraciones del desinfectante pueden causar daños en el material vegetal y por lo tanto generar la necrosis de los tejidos. El mismo caso lo presenta Ramírez *et al.* (2002) en el caso del establecimiento *in vitro* de ápices de guanábano, donde se comprueba el efecto tóxico del hipoclorito de sodio por encima del 2 por ciento. Es por ello que los tratamientos con concentraciones de 1,5 por ciento de NaOCl sean los que presentan el mayor porcentaje de plántulas establecidas. Si bien en el caso de semillas, el agente desinfectante no afecta directamente a los tejidos vegetales, debido al tratamiento pre germinativo previo que se realiza a las semillas, la testa se debilita permitiendo el ingreso del agente desinfectante cuando se realiza la desinfección de las semillas, afectando así al embrión y por lo tanto al establecimiento de las plántulas.

3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

3.1. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES

En esta etapa se planteó inicialmente extraer las yemas apicales provenientes de plántulas de *Prosopis pallida* germinadas *in vitro*. Sin embargo, al realizar la siembra de las yemas apicales se observó la necrosis de los explantes y no hubo ninguna formación de brotes como se esperaba obtener. No obstante, luego de algunas semanas de instalados los explantes se observó la formación de callos, por lo que evaluó la formación de tejido calloso de acuerdo a la Tabla 5.

En la Figura 25 se puede observar la clasificación de los grados de callosidad establecidos para la evaluación de cada uno de los tratamientos.

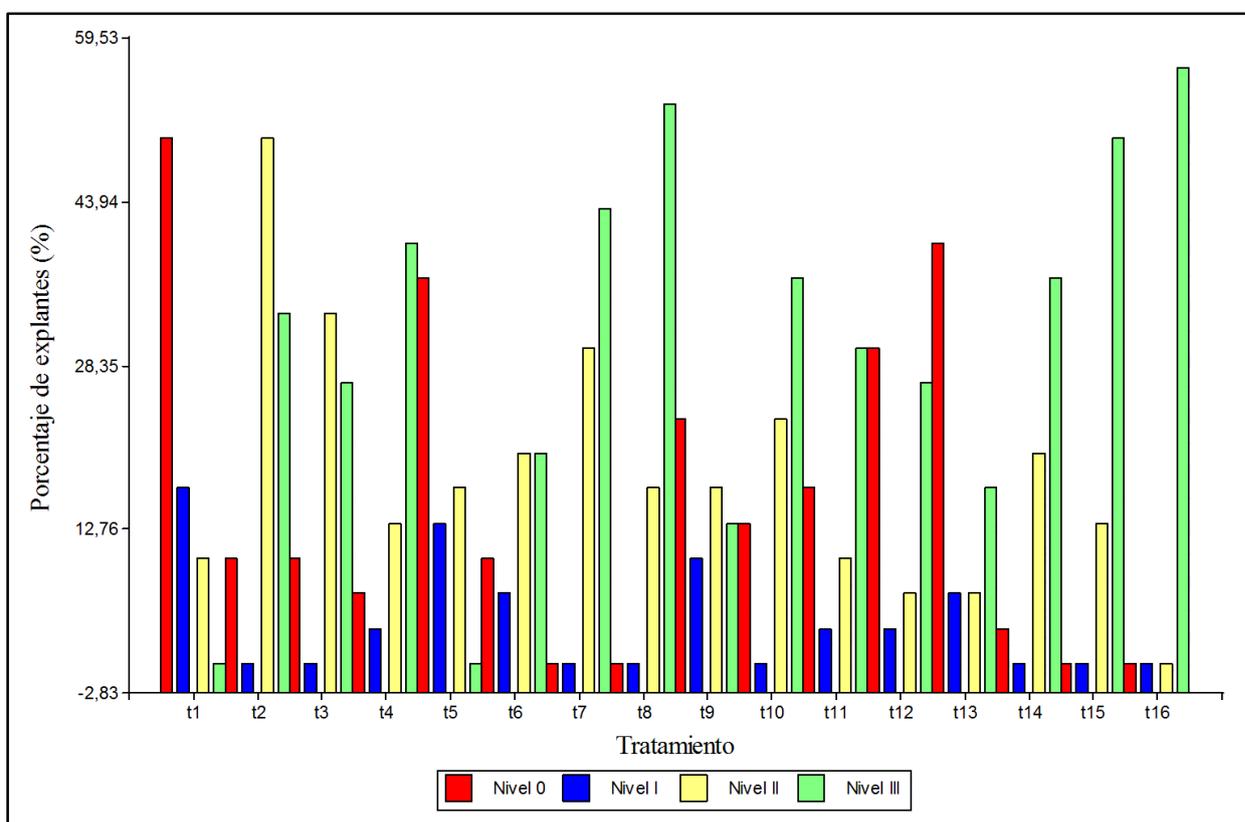


Figura 25: Porcentaje de explantes en los diferentes niveles de callosidad por tratamiento

Se observa la cantidad de explantes que presentaron los diferentes niveles de callosidad. En su mayoría los tratamientos con mayor concentración de citoquininas (t4, t8 y t16) indiferente de que sea BAP o ZEA muestran el mayor porcentaje en el nivel III. Las yemas apicales instaladas al no producir brotes y el explante en contacto con el medio comienzan a

formar la callosidad por la presencia de las citoquininas. Se observa incluso que los medios que no presentan citoquininas (t1, t5, t9 y t13) son los que presentan mayores valores en el Grado I, donde solo se presenta la callosidad en la base del explante y los tratamientos con el medio MS presentaron 0 por ciento de explantes que mostraron callosidad del Nivel III. Por lo que el efecto de la concentración de las citoquininas influye en la formación de callos del explante.

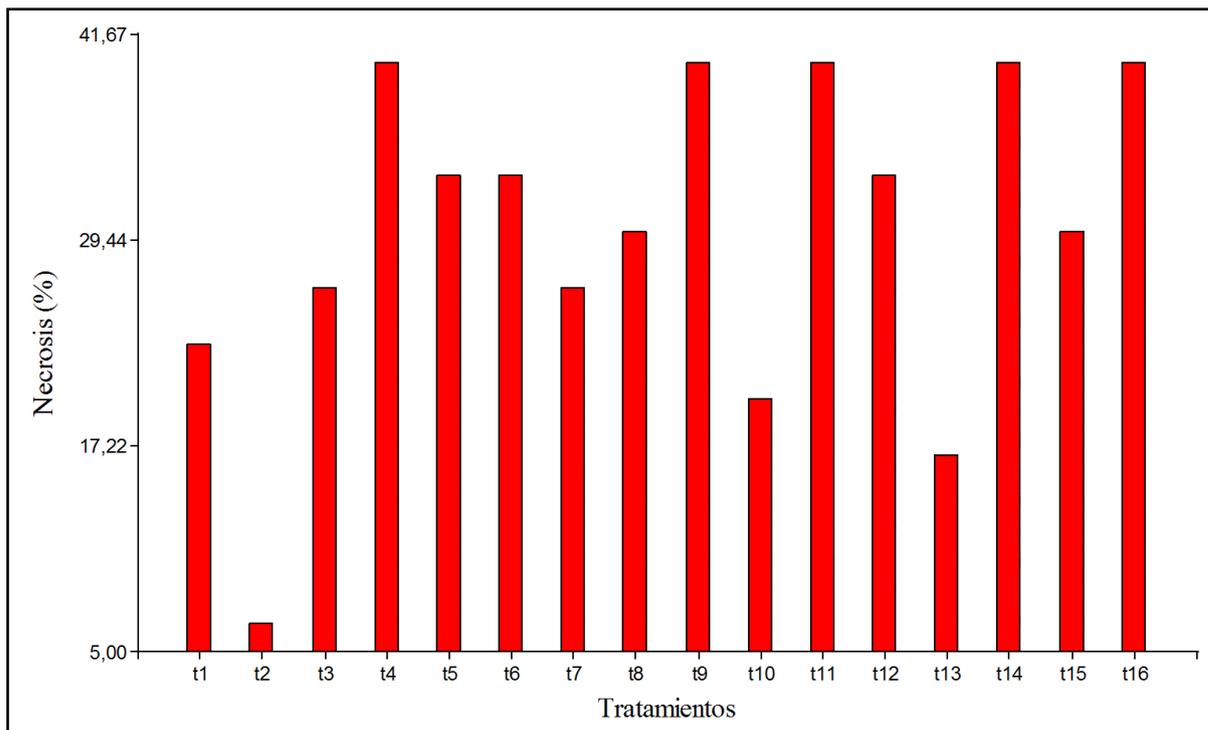


Figura 26: Porcentaje de explantes necrosados por tratamiento

En la Figura 26 se observa los explantes que se necrosaron. Se observó que algunos explantes no formaron tejido calloso y tampoco se establecieron, necrosándose a las dos semanas de ser instalados. Así también, una parte de los explantes del Grado 0, luego de dos semanas de la evaluación se necrosaron también.

Según Buendía (2017) para el género *Prosopis*, es recomendable no dejar pasar mucho tiempo después de germinadas las semillas para obtener los explantes, en este caso las yemas apicales, ya que se debilitan conforme pasan más tiempo en las condiciones de los tubos de ensayo. En esta investigación, para la extracción de las yemas se dejaron crecer las plántulas hasta tres semanas con tal de obtener explantes con mayor tamaño, lo cual puede haber sido un factor que haya influido en los ensayos. Asimismo, Buendía (2017) también

comenta que el medio MS es uno de los medios más ricos en nutrientes y que es recomendable usar el 50 por ciento de la concentración ya que la relación carbono/nitrógeno causa un rápido crecimiento y una muerte más rápida de los explantes y de igual forma en su investigación Flor (2017) mencionó que la concentración de MS generaba un desorden en el crecimiento de las plántulas y presentaban el marchitamiento observado en las yemas apicales, lo que se tomó en cuenta para realizar otra investigación.

El género *Prosopis* y muchas especies de la familia de leguminosas son recalcitrantes al cultivo *in vitro*, es decir que son difíciles de propagar por esta vía y dentro de un período de cultivados comienzan a presentar clorosis y muerte de las yemas apicales en los explantes. (Harris 1992; Martínez 2010; Raj 2010). Lo cual coincide con lo observado en las yemas apicales y por lo que no se obtuvo los resultados esperados debido a que al trabajar con una especie recalcitrante se debe determinar el explante adecuado con el cual realizar la propagación.

De acuerdo con los autores mencionados anteriormente la propagación del género *Prosopis* es complicada y se obtienen bajos porcentajes de brotes; sin embargo, existen nuevas investigaciones con diferentes explantes como yemas apicales y cotiledones (Flor 2013; Minchala *et al.* 2014), nudos cotiledonares (Buendía *et al.* 2007), secciones nodales (Yao *et al.* 1989) entre otras investigaciones que han proporcionado excelente información para la propagación *in vitro* del género *Prosopis*. Raj (2010) menciona que la formación de brotes es demasiado baja cuando se emplea solo la yema apical para el género *Prosopis*, sin embargo, que si se dejan los dos cotiledones junto con la yema apical se forman una mayor cantidad de brotes.

Esto explicaría la razón por la cual los explantes vivos, en algunos casos, elongaron sin la formación de brotes. Resultados similares se observaron en el trabajo de Huang *et al.* (1994) quienes trabajaron con yemas apicales provenientes de plántulas de *Acacia mearnsii* en la etapa de multiplicación con similares concentraciones de BAP empleadas en el presentado trabajo, obteniendo una muy baja producción de brotes. Por el contrario, Flor (2013) para la fase de multiplicación de *Prosopis pallida* utilizó como explante las yemas apicales con sus cotiledones provenientes de plántulas germinadas *in vitro* y obtuvo mejores resultados que los autores mencionados.

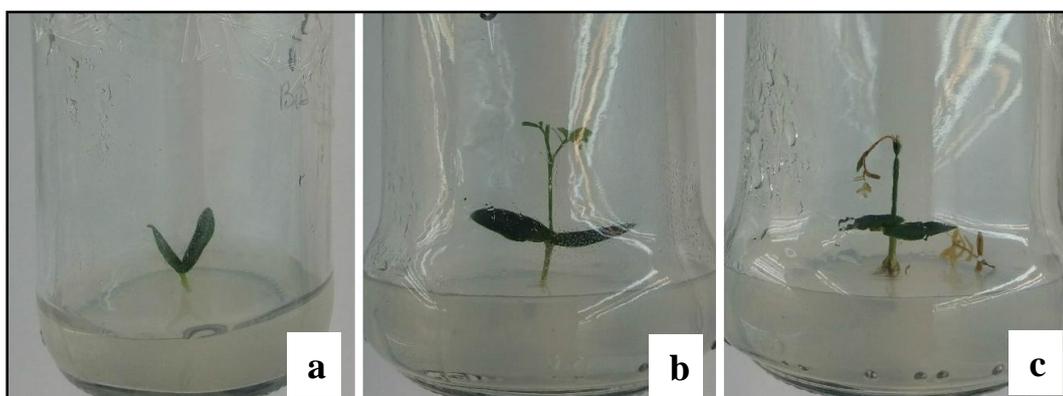
En este contexto, es muy importante seleccionar el explante adecuado dependiendo de qué especie se desea propagar, si bien las yemas apicales pueden obtener buenos resultados en otras especies, no necesariamente funciona de esa forma para el género *Prosopis*. Por lo que en esta investigación se decidió realizar otro ensayo empleando las yemas apicales con los cotiledones.

3.2. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON SUS COTILEDONES

Como se mencionó anteriormente, las yemas apicales no producen una gran cantidad de brotes. Se sugiere dejar los cotiledones para que el explante pueda producir brotes que posteriormente serán subcultivadas; esto se debe a que en su mayoría las leguminosas almacenan todas sus reservas en los cotiledones (Raj 2010; Sarmiento 2012).

Por lo tanto, se realizó un nuevo ensayo con la yema apical y sus dos cotiledones. Sin embargo, luego de la segunda semana de introducida, la yema apical se amarilló y finalmente se necrosó, indistintamente del tratamiento en el que se encontraba, de la misma forma que el ensayo anterior (Figura 27).

En este nuevo ensayo, se decidió dejar los dos cotiledones y una porción de hipocótilo junto con la yema apical. Sin embargo, las yemas apicales no se desarrollaron como se esperaba y se obtuvo un bajo desarrollo de secciones nodales. Como la yema apical se necrosó, el explante no aumentó de tamaño y en cada yema axilar se formaron brotes. Es por ello que se evaluó la cantidad de nudos formados y el número de brotes que se produjeron en los explantes por cada tratamiento a pesar de la necrosis de la yema apical.



(a) Yema apical recién sembrada, (b) yema apical con una semana de cultivo y (c) yema apical con tres semanas de cultivo

Figura 27: Yema apical sembrada en medio de multiplicación

3.2.1. NÚMERO DE NUDOS

El análisis de varianza para el número de nudos formados presentó diferencias estadísticamente significativas para los factores medio de cultivo y concentración citoquininas y no presentó diferencias significativas para el tipo de hormona ni para la interacción de los tres factores (Anexo 9).

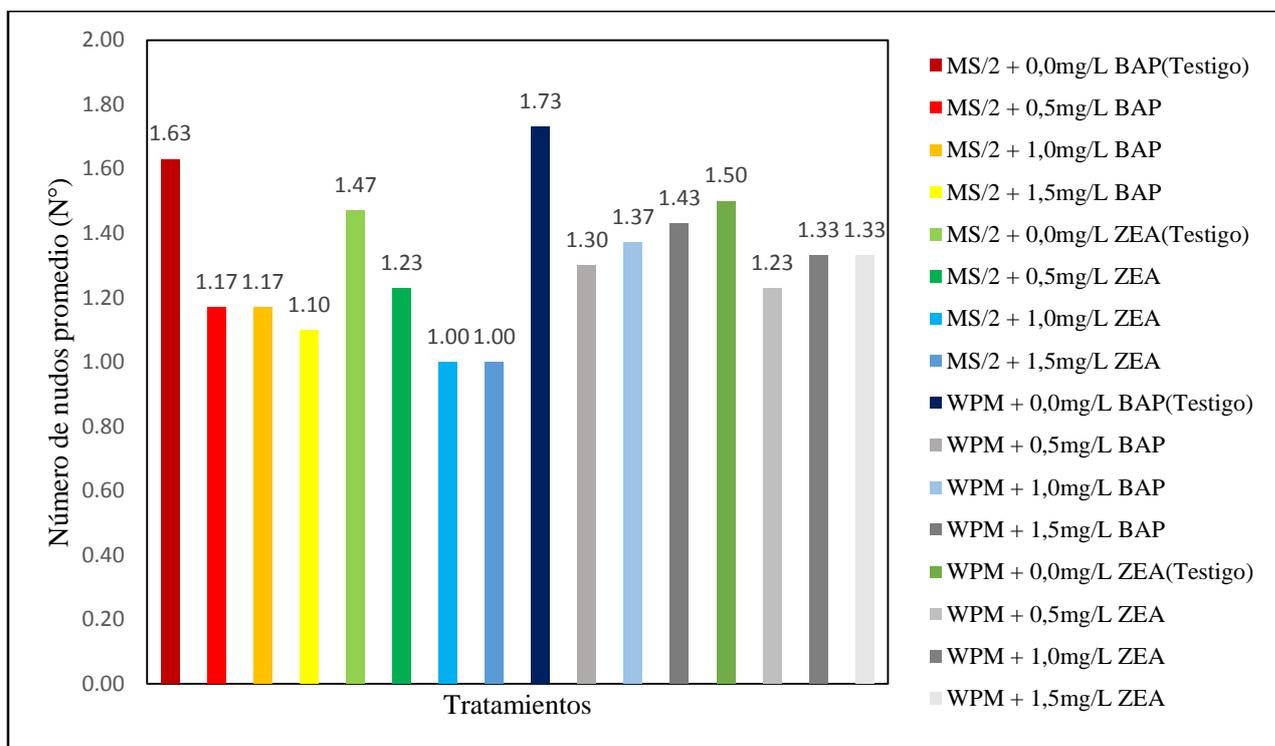


Figura 28: Número de nudos promedio formados en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida* por tratamiento

Se observa que el mejor tratamiento para la mayor cantidad de nudos formados es el t9 (WPM sin hormonas) con 1,73 nudos seguido del t1 y t13 (medio de cultivo sin hormonas) con 1,63 y 1,50 nudos, respectivamente. Se observa además que una mayor concentración de hormonas afecta a la formación de nudos, por lo que los tratamientos con menor número promedio de nudos (1,00) son el t8 (MS/2 + 1,5 mg/L ZEA) y el t7 (MS/2 + 1,0 mg/L ZEA) ambos con 1,00 nudo en promedio (Figura 28).

El efecto que tiene el medio de cultivo y la concentración de las citoquininas, tanto de manera individual como su interacción tienen un rol importante en el desarrollo *in vitro*. El número de nudos desciende conforme se aumenta la concentración de hormonas probablemente porque el algarrobo logra desarrollar las vías de biosíntesis de citoquininas de manera óptima por lo que en un inicio ya cuenta con una concentración de citoquininas

endógenas, y por lo tanto se podría atribuir al medio de cultivo el efecto de producir mayor cantidad de número de nudos (Dodds y Roberts 2004, citado por Flor 2013), ya que los tratamientos t9 y t13 son los que presentan mayores valores de formación de nudos.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de medio presentó diferencias estadísticamente significativas para los medios MS/2 y WPM (Anexo 9); el número de nudos fue de 1,22 y 1,40 respectivamente. Siendo el WPM el que presentó una mayor cantidad de nudos formados (Figura 29).

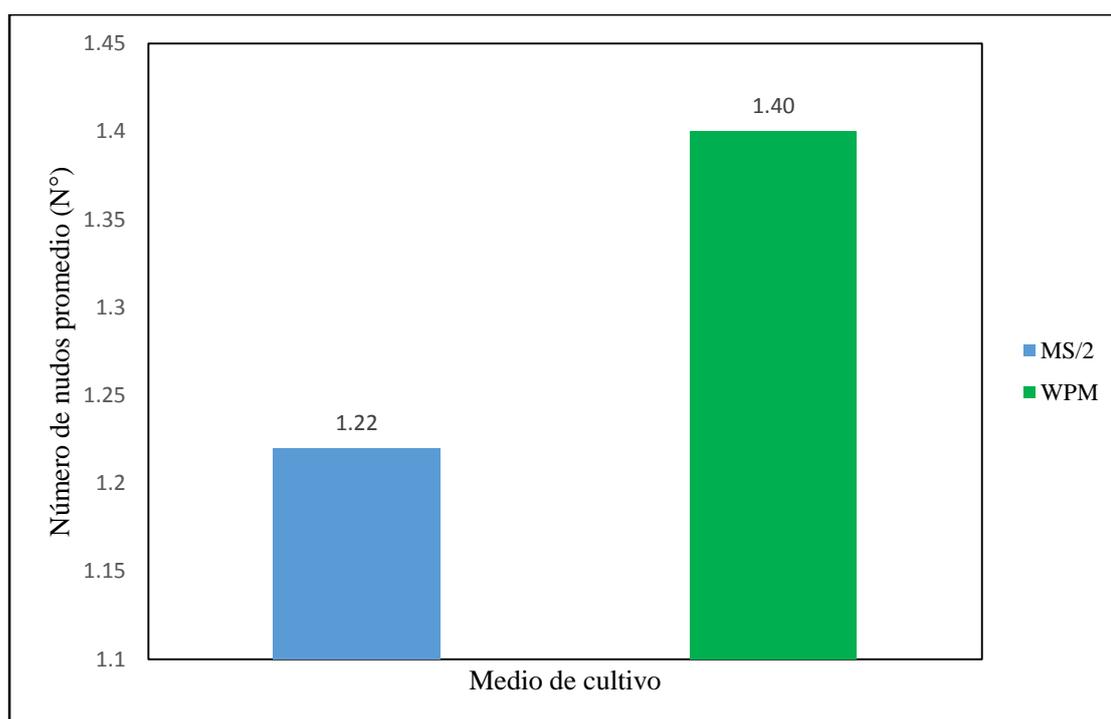


Figura 29: Número de nudos promedio por explante por medio de cultivo

Correira y Cortezzi (1995) trabajaron en la propagación *in vitro* de *Acacia meamsii*, donde obtuvieron al principio un desorden en el crecimiento de las yemas introducidas debido a la concentración completa de MS, por lo que reducir la concentración a la mitad, permitió obtener mejores resultados a los tratamientos adicionados con citoquininas, así como también mencionan que obtuvieron mejores resultados con el medio de cultivo WPM. Además, indican que luego de 30 días de cultivadas las yemas apicales, estas se necrosaron, al igual que en el presente trabajo donde se observaba la necrosis de la yema apical luego de 14 días. Tal como lo reportó Buendía (2017), el medio MS es uno de los más ricos en nutrientes y para algunas plantas leñosas es mejor usarlo a la mitad de la concentración. Esto coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación ya que a pesar de emplear

el medio MS a la mitad de la concentración continúa con una mayor cantidad de iones amonio que el WPM, lo que demostraría un mejor efecto de este último en el desarrollo de los explantes.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las hormonas BAP y ZEA (Anexo 9); el número de nudos fue de 1,36 y 1,26; respectivamente. Siendo BAP el que presentó una mayor cantidad de nudos formados (Figura 30).

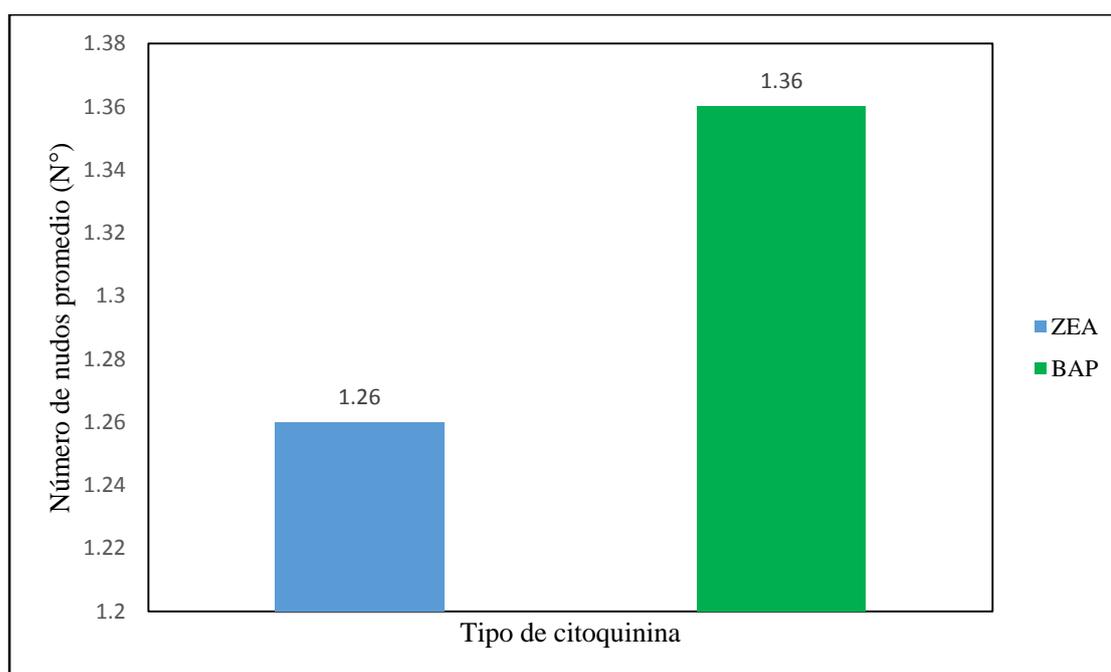


Figura 30: Número promedio de nudos por tipo de citoquinina

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de citoquinina presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L (Anexo 9); el número de nudos fue de 1,58; 1,23; 1,22 y 1,22; respectivamente. Siendo la concentración sin citoquininas (0,0 mg/L) la que presentó una mayor cantidad de nudos formados (Figura 31).

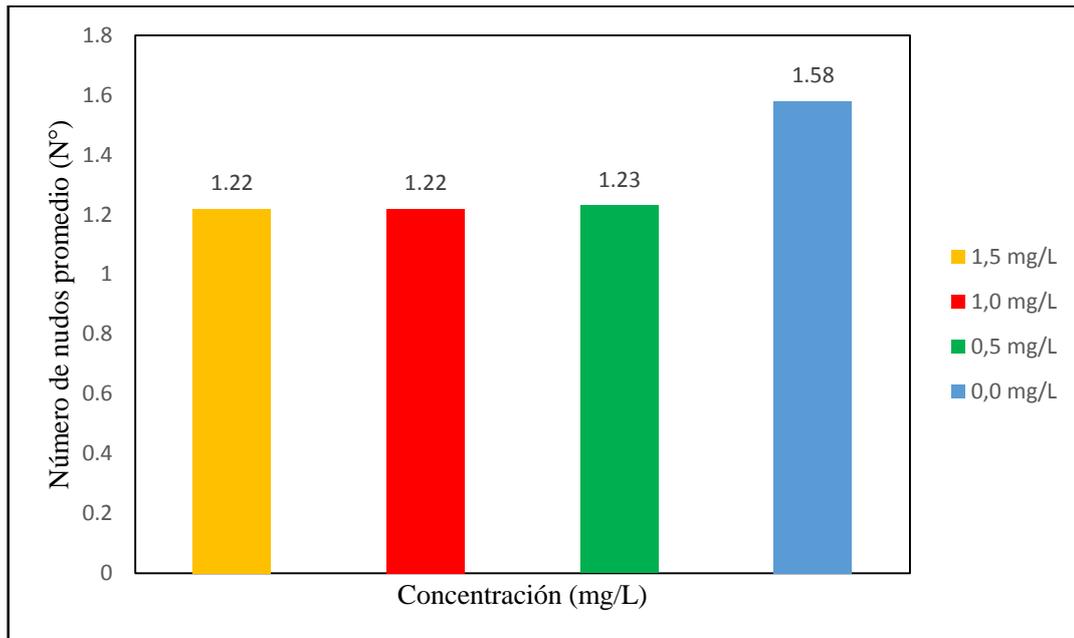


Figura 31: Número de nudos promedio por concentración de citoquinina

Minchala *et al.* (2014) obtuvieron, con una mayor concentración de BAP (2,0 mg/L), 9,6 nudos en promedio en la propagación de *Prosopis limensis*. Por el contrario, los resultados presentados en esta investigación mostraron que a mayor concentración de BAP, la cantidad de nudos disminuye, presentando el t4, el mayor tratamiento con BAP solo 1,10 nudos en promedio. Esta diferencia se puede deber a que se esperaba una mayor elongación de los explantes, y dentro del trabajo realizado pasada la segunda semana de introducido el explante, no se elongó la yema apical debido a que se necrosó, produciendo así una menor cantidad de nudos a diferencia de los resultados presentado por los autores.

La necrosis de la yema apical puede deberse a diversos factores, incluso a la presencia de citoquininas en el medio de cultivo (Bairu y Kane 2011), sin embargo, ya que hay antecedentes de trabajos con citoquininas en el género *Prosopis* se descarta la posibilidad que sea la adición de citoquininas el factor por el cual se continúa observando el amarillamiento y necrosis de la yema apical.

La aeración en los frascos que se emplean para la propagación juega un rol importante en el desarrollo de los explantes. El intercambio gaseoso es un factor crucial para la translocación de nutrientes a través del xilema. Dado que la mayoría de sistemas de cultivo de tejidos vegetales emplean frascos herméticamente cerrados para prevenir la evaporación, en algunos casos, estos sellos crean algunas condiciones físicas y químicas que dificultan el

desarrollo de la planta. En recipientes cerrados herméticos se observa la acumulación de gases como el CO₂ (dióxido de carbono) y el C₂H₄ (etileno), los cuales influyen en el crecimiento y pueden afectar procesos de diferenciación y morfogénesis (Bairu *et al.* 2009; Cañal *et al.* 2001).

Según Sha *et al.* (1985), citado por Correira y Cortezzi (1995) la necrosis de la yema apical puede estar relacionado a la deficiencia de nutrientes como resultado de altos niveles de humedad en el contenedor que se emplea. En su trabajo con *Acacia mearnsii* no presentaron problemas de almacenamiento de humedad en los frascos y permitieron un adecuado intercambio gaseoso evitando la acumulación de los gases mencionados anteriormente. Cuba *et al.* (2014) en su trabajo con *Colobanthus quitensis*, también muestra un amarillamiento de la yema apical y su posterior necrosis. Sin embargo, esto se debe a que usa un tipo de sellado que permite la liberación de la humedad, siendo los requerimientos de esta especie otros. Por lo tanto, con los resultados obtenidos se puede afirmar la importancia de la optimización de las condiciones microclimáticas de los frascos para la propagación *in vitro* de *Prosopis pallida*. En la presente investigación se trabajó con papel aluminio como material de sellado para los frascos, lo que generaba una gran acumulación de humedad en esto, afectando el desarrollo de microestacas de *Prosopis pallida*. Por lo tanto, al presentar repetidamente la necrosis de la yema apical se decidió emplear tapas de algodón para el sellado en un tercer ensayo.



Figura 32: Frasco sellado con papel aluminio y presencia de vapor en las paredes

3.2.2. NÚMERO DE BROTES

El análisis de varianza para el número de brotes formados no presentó diferencias estadísticamente significativas para el medio de cultivo, el tipo y concentración de citoquininas ni para la interacción de estos tres factores (Anexo 9).

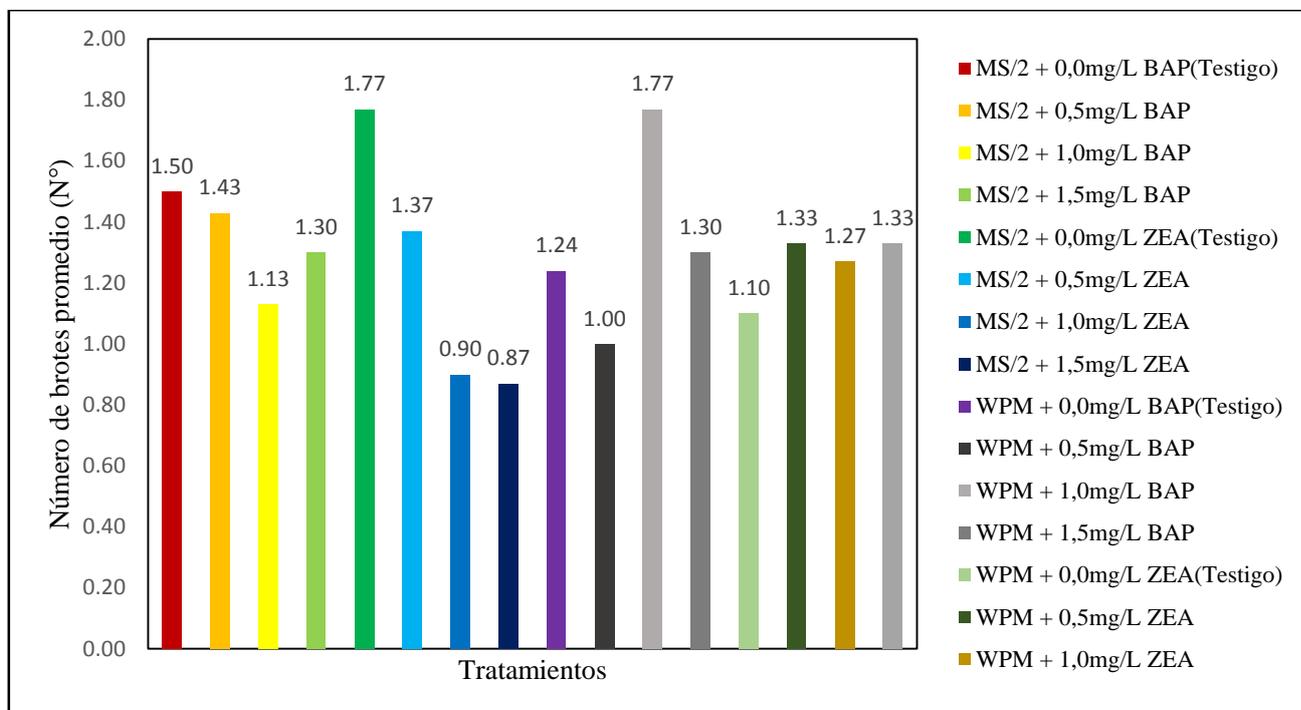


Figura 33: Número de brotes promedio formados en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida* por tratamiento

Se observa que los mejores tratamientos son t5 (MS ½ sin hormonas) y t11 (WPM + 1,0 mg/L BAP) los cuales presentaron 1,77 brotes, mientras que con t8 (MS ½ + 1,5 mg/L ZEA) se obtuvo una menor formación de brotes (Figura 33).

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de medio no presentó diferencias estadísticamente significativas para los medios MS/2 y WPM (Anexo 9); el número de brotes fue de 1,28 y 1,29; respectivamente. Siendo el WPM el que presentó una mayor cantidad de brotes formados (Figura 34).

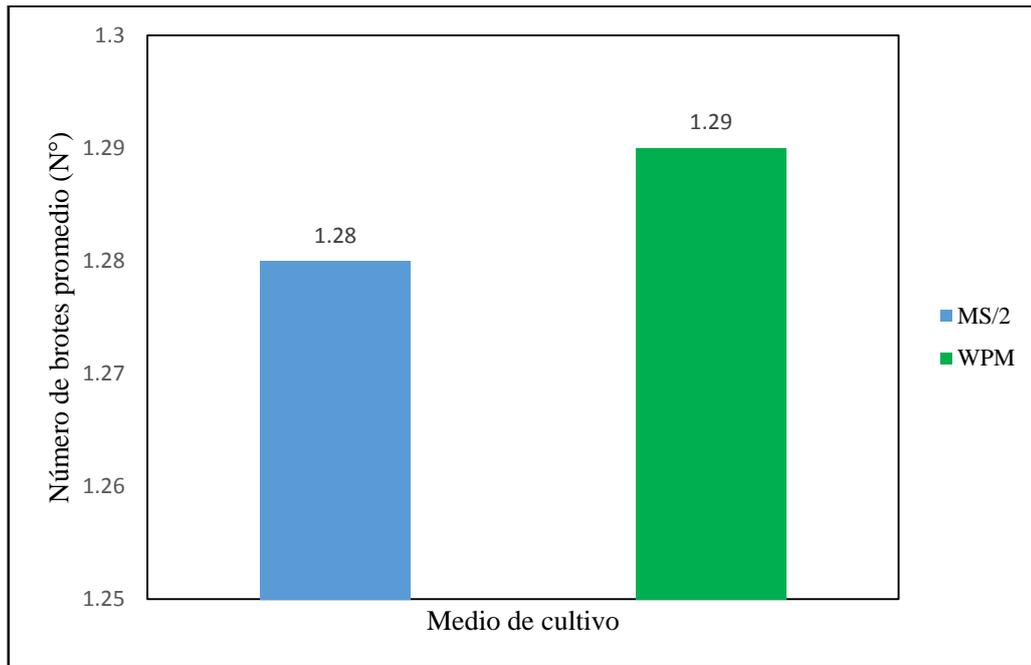


Figura 34: Número brotes promedio por medio de cultivo

El medio de cultivo WPM produce en promedio mayor cantidad brotes. Esto se debe a que la nutrición de nitrógeno es muy importante para la propagación del género *Prosopis*; los iones amonio en el medio de cultivo son inhibidores para la producción de brotes (Raj, 2010). El medio de cultivo MS contiene una gran cantidad de iones amonio incluso reduciendo su concentración a la mitad aún es más alto que el WPM.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para BAP y ZEA (Anexo 9); el número de brotes fue de 1,33 y 1,24; respectivamente. Siendo BAP el que presentó una mayor cantidad de brotes formados (Figura 35).

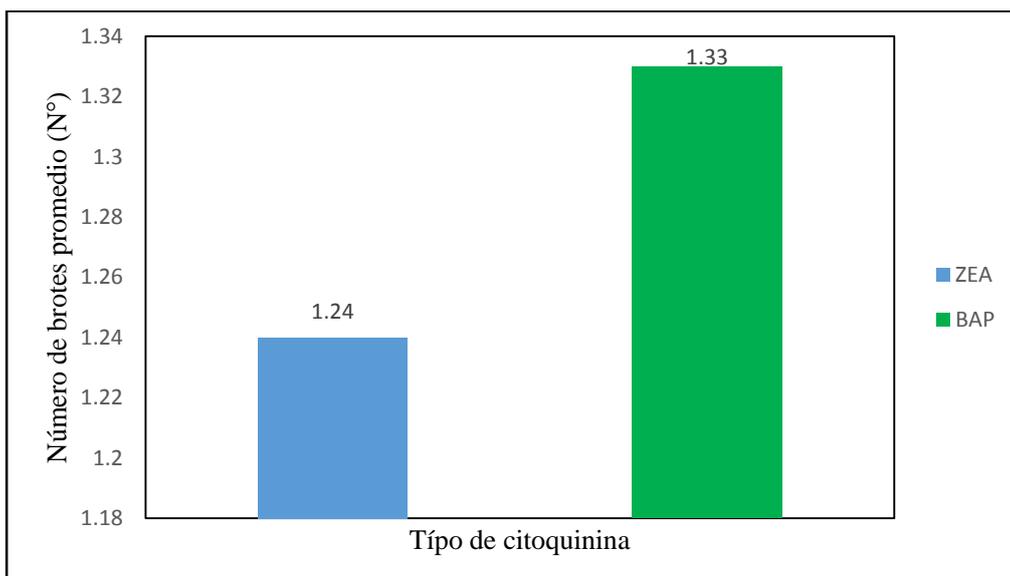


Figura 35: Número promedio de brotes por tipo de citoquinina

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L (Anexo 9); el número de brotes fue de 1,40; 1,28; 1,27 y 1,20; respectivamente. Siendo la concentración sin hormonas (0,0 mg/L) el que presentó una mayor cantidad de brotes formados (Figura 36).

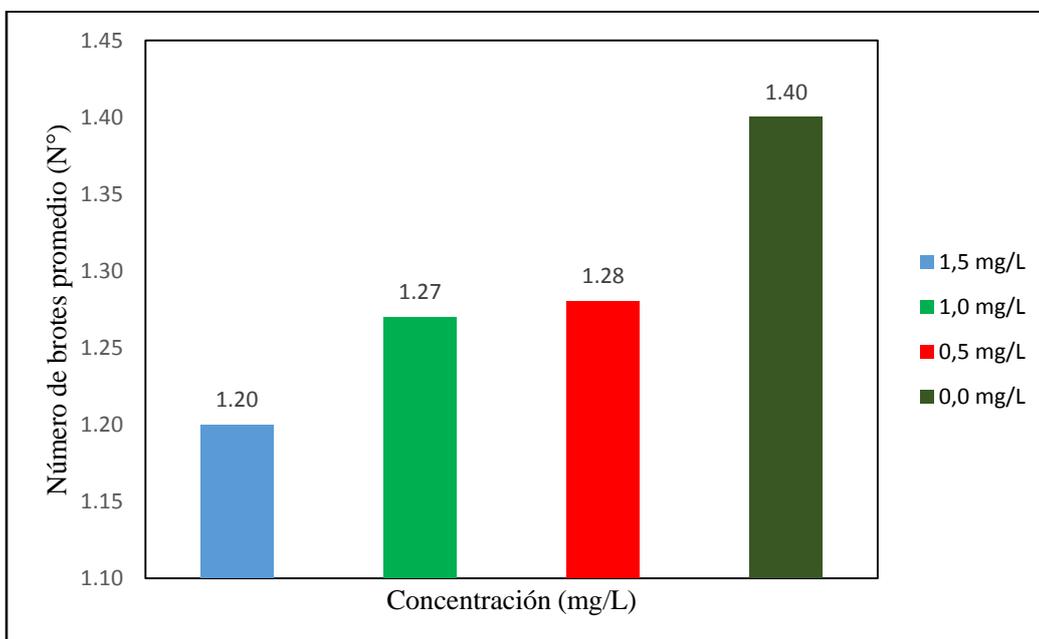


Figura 36: Número promedio de nudos por concentración de citoquinina

Minchala *et al.* (2014) obtuvieron en promedio 2,8 brotes empleando 2,0 mg/L de BAP; lo que difiere de los resultados de esta investigación ya que se obtuvo un mayor número de brotes empleando medio de cultivo sin presencia de citoquininas. Por otro lado, se puede observar una mayor brotación en los resultados de los autores debido a que el periodo de cultivo de su investigación fue de 90 días mientras que el de la presente fue de 28 días, además que luego de formarse los brotes, estos también se necrosaron conforme pasaban tiempo el frasco.

Como se mencionó anteriormente, el sellado con tapas de papel aluminio afecta el desarrollo de la yema apical y se observa la necrosis de la misma por el exceso de vapor de agua que se genera en los frascos. Esto, genera que se desarrollen los brotes ya que se pierde la dominancia apical, sin embargo, estos también se necrosan y es por ello que no se obtienen los resultados esperados (Figura 37).



Figura 37: Necrosis de yema apical y formación de brotes en yema axilar

3.3. ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON SUS COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN

A partir de los ensayos realizados, se decidió realizar un nuevo ensayo empleando solo el medio de cultivo WPM, por presentar mejores resultados. Además, se cambió las tapas de papel aluminio por tapas elaboradas de algodón para permitir el intercambio gaseoso y la liberación de la humedad.

3.3.1. NÚMERO DE NUDOS

El análisis de varianza para el número de nudos formados en el primer subcultivo no presentó diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de citoquininas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 11).

Se observa que las yemas apicales sembradas en el t1 (muestra control sin citoquininas) presentaron el mayor número valor con 3,57 nudos mientras que t4 (BAP 1,5 mg/L) y t7 (ZEA 1,5 mg/L) presentaron los menores valores con 2,03 y 2,13 números de nudos respectivamente (Figura 38).

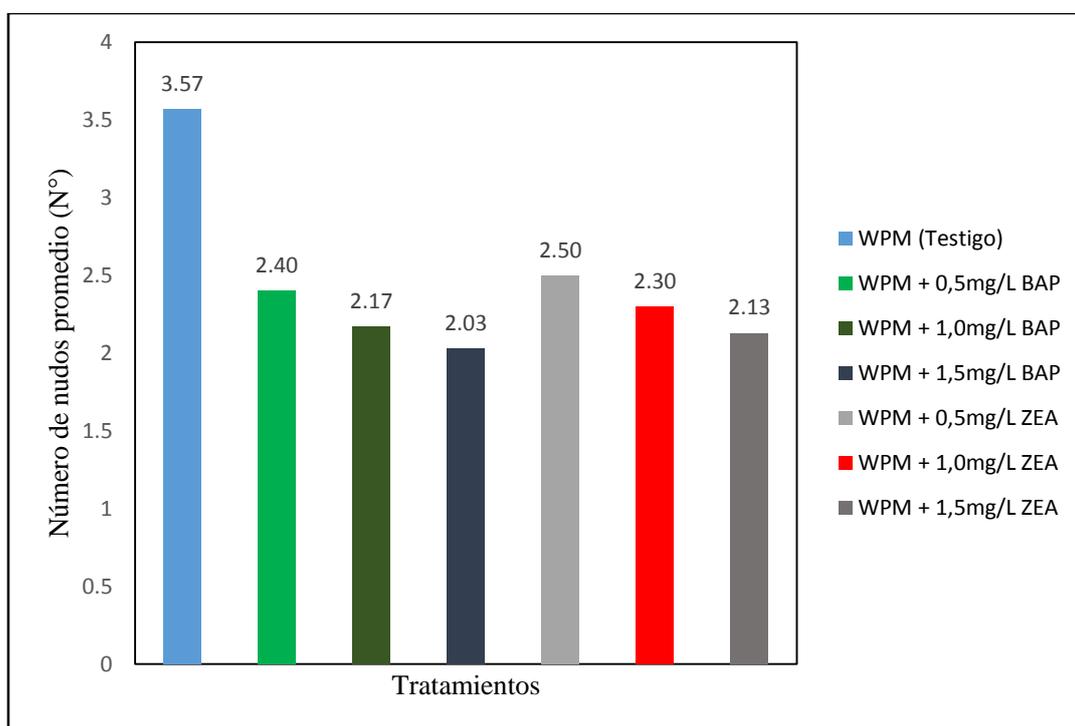


Figura 38: Número de nudos promedio formados en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida* por tratamiento empleando tapas de algodón

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para BAP y ZEA (Anexo 11); el número de nudos fue de 2,31 y 2,20; respectivamente. Siendo ZEA el que presentó una mayor cantidad de nudos formados (Figura 39).

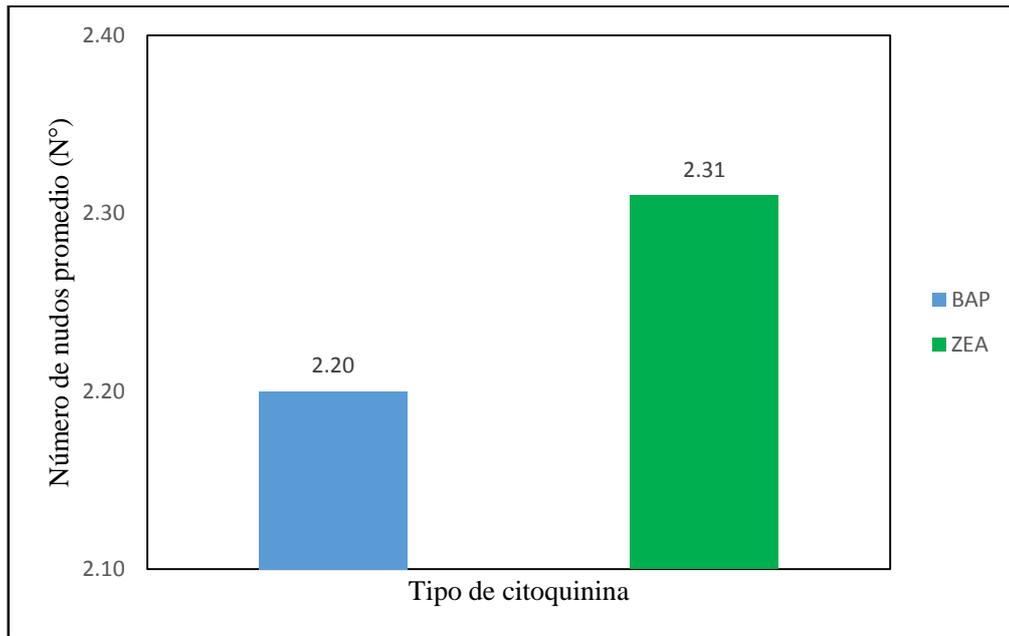


Figura 39: Número promedio de nudos por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L (Anexo 11); el número de nudos fue de 2,45; 2,23 y 2,08; respectivamente. Siendo la concentración 0,5 mg/L la de mayor cantidad de nudos formados.

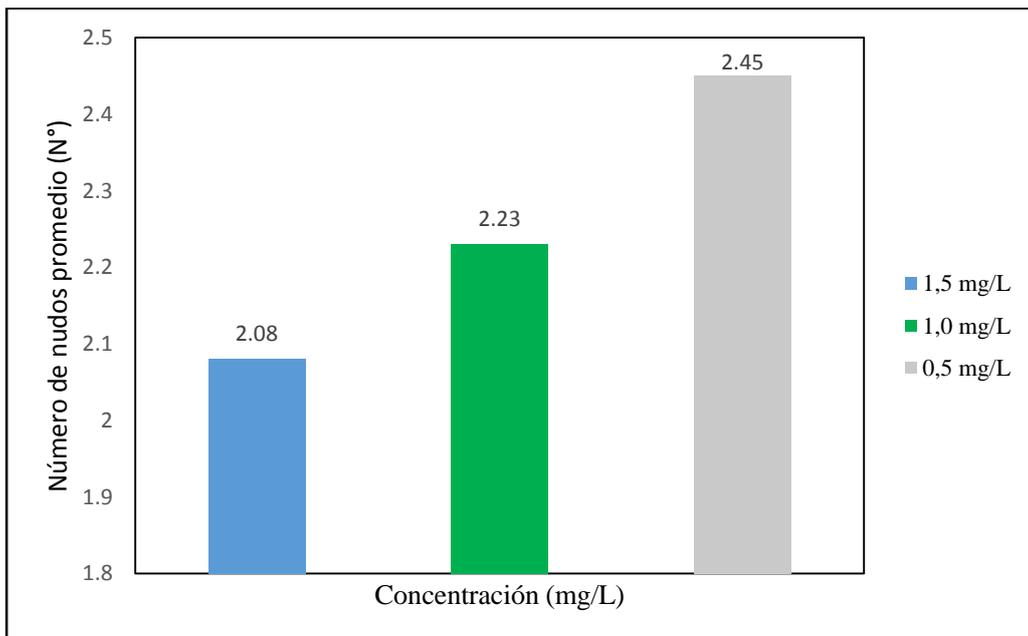


Figura 40: Número de nudos promedio por concentración

Minchala *et al.* (2014) reporta un valor de 9,6 nudos en promedio en medio de cultivo adicionado con 2,0 mg/L de BAP. Por el contrario, en la presente investigación se obtuvo un valor de 3,57 en un medio de cultivo sin hormonas, y se observó que al aumentar la concentración de citoquininas, el número de nudos disminuye. Esto se puede deber al medio de cultivo empleado, ya que se trabajó con WPM, a diferencia de los autores mencionados; además ellos emplearon un período de incubación de 90 días, mientras que en la presente investigación se mantuvo los explantes por un período de 28 días. Se puede observar entonces que WPM sin la adición de hormonas obtiene casi el mismo efecto que los autores, pero en menor tiempo.

3.3.2. ALTURA DE PLÁNTULAS

El análisis de varianza para la altura de plántulas en el primer subcultivo no presentó diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de citoquininas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 11).

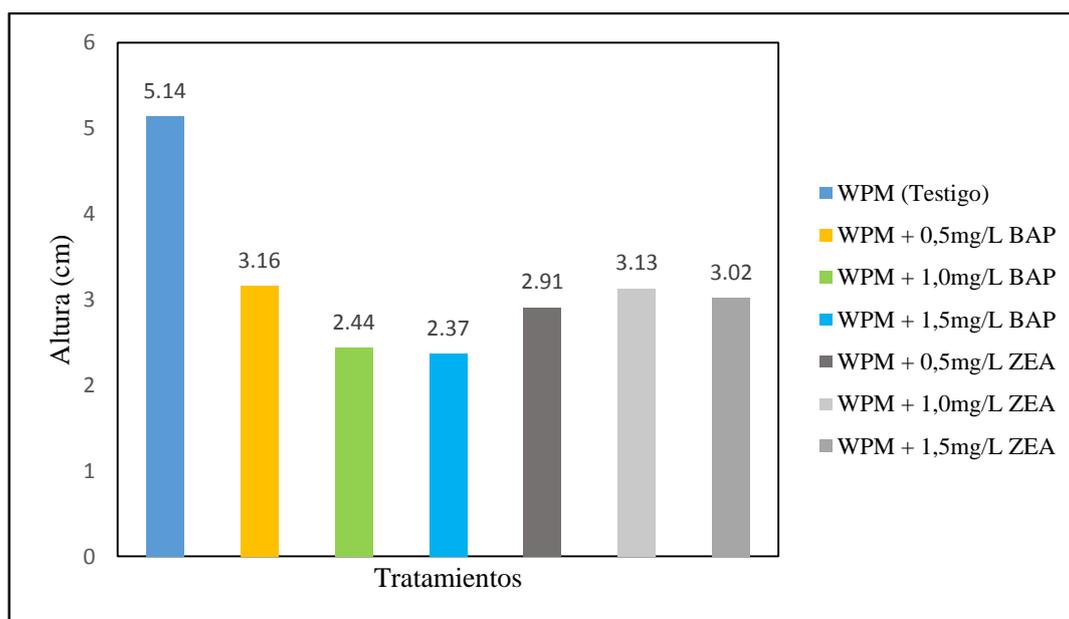


Figura 41: Altura promedio de los explantes por tratamiento en la introducción de yemas apicales empleando tapas de algodón

Se observa que las yemas apicales introducidas en el t1 (tratamiento control sin citoquininas) presentó la mayor altura con 4,65 cm. Las yemas apicales introducidas en el t2 (BAP 0,5 mg/L) presentaron la mayor altura con 3,16 cm, de los tratamientos adicionados con hormonas mientras que t4 (BAP 1,5 mg/L) presento el menor valor con 2, 37cm (Figura 41).

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para ZEA y BAP (Anexo 11); las alturas que se alcanzaron fueron de 3,02 y 2,66 cm; respectivamente. Siendo ZEA el que presentó una mayor altura de plántula (Figura 42).

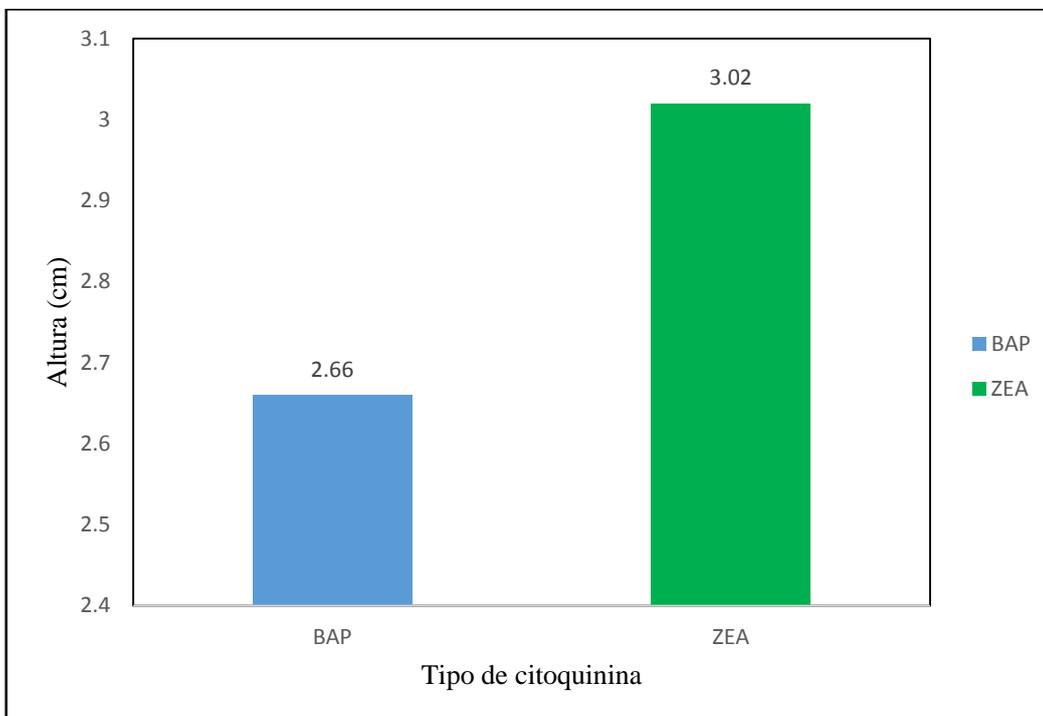


Figura 42: Altura promedio de plántulas por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de citoquininas no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L (Anexo 11); las alturas que se alcanzaron fueron de 3,04; 2,79 y 2,70 cm respectivamente. Siendo 0,5mg/L la concentración que presentó mayor altura de plántulas (Figura 43).

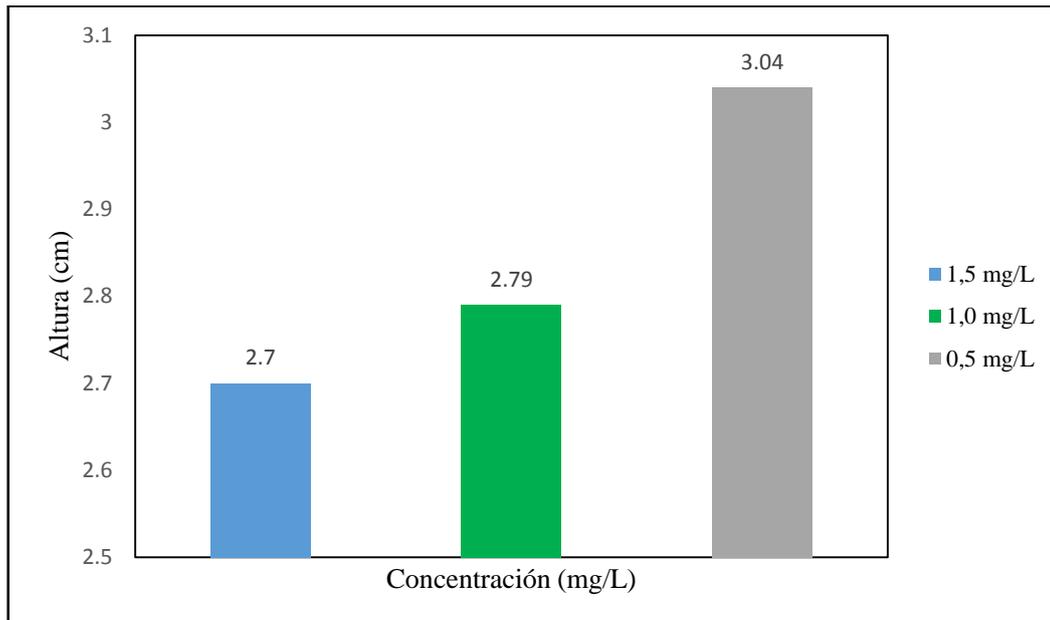
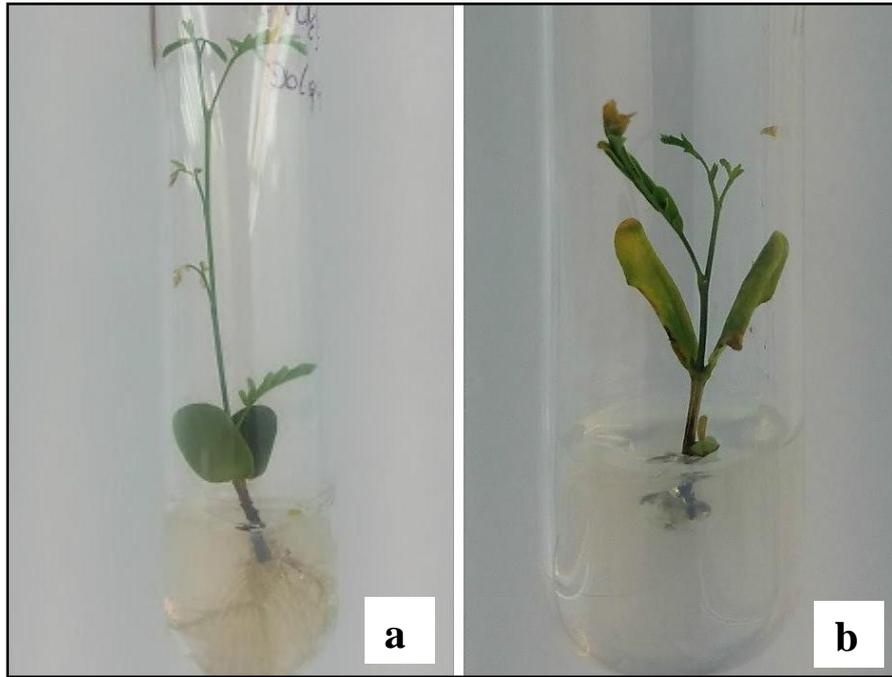


Figura 43: Altura promedio de plántulas por concentración de citoquinina

Los datos presentados son similares a los obtenidos por Flor (2013), quien obtuvo una mayor altura en el tratamiento con medio de cultivo sin adición de hormonas. Además, el autor menciona que obtuvo una menor altura con una dosis de 0,9 mg/L de BAP. En la presente investigación se observa una relación inversa entre los niveles de citoquinina y la altura de la plántula. Se obtuvo un valor de 2,70 cm de altura promedio con 1,5 mg/L de citoquinina. Se obtiene incluso mejores valores que el autor, quien usó una mayor concentración de citoquinina, posiblemente porque se empleó el medio de cultivo WPM mientras que el autor empleó MS/2.

Los resultados de la investigación se basan en que una adición de concentraciones mayores de citoquininas resulta en una dominancia apical reducida, disminuyendo el tamaño del tallo logrando entrenudos más cortos (Jordán y Casaretto 2006). Esto demostraría el potencial regenerativo de la especie y que posee un gran nivel de hormonas endógenas. Por lo tanto, una adición de hormonas exógenas no causa un efecto en la altura de plántula inhibiendo la elongación del tallo (Rojas 1993, citado por Pedroza 2009; Flor 2013).



(a) Siembra en medio libre de citoquininas y (b) Siembra en medio con citoquininas

Figura 44: Elongación de la yema apical a las cuatro semanas de siembra

3.3.3. NÚMERO DE BROTES

El análisis de varianza para el número de brotes formados en el segundo subcultivo no mostró diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de citoquininas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 13).

Se observa que las yemas apicales introducidas en el t1 (tratamiento control sin citoquininas) presento el mayor número promedio de brotes con 2,40 mientras que t3 (BAP 1,0 mg/L) y t7 (ZEA 1,5 mg/L) presentaron los menores valores con 0,87 y 0,77 números de brotes, respectivamente (Figura 45).

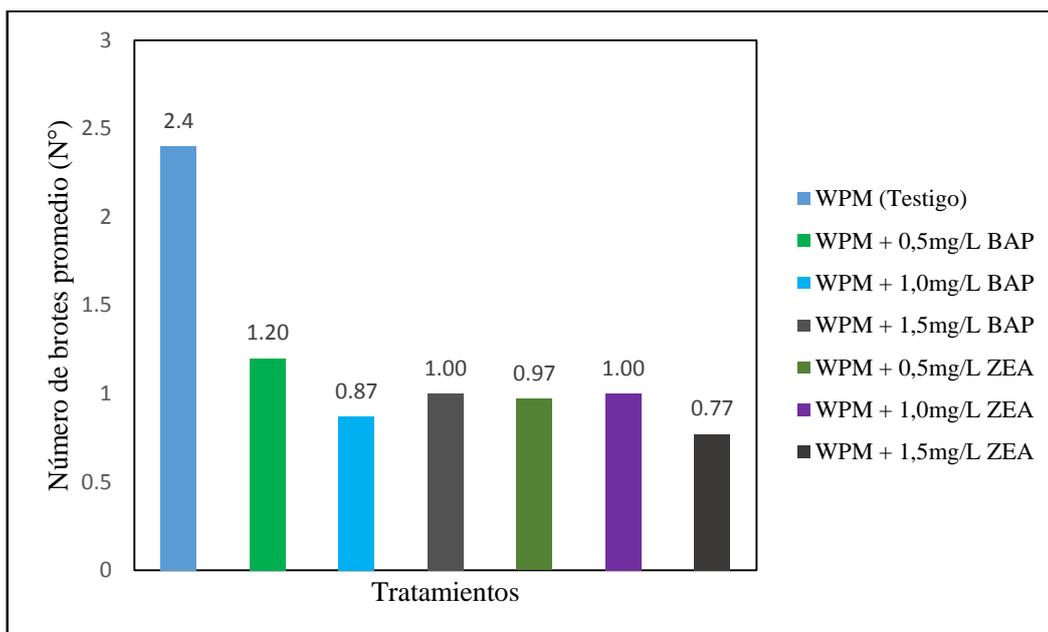


Figura 45: Número de brotes promedio formados en el subcultivo de yemas apicales y axilares de *Prosopis pallida* por tratamiento empleando tapas de algodón

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para BAP y ZEA (Anexo 13); el número de brotes fue de 1,02 y 0,91; respectivamente. Siendo BAP el que presentó una mayor cantidad de brotes formados (Figura 46).

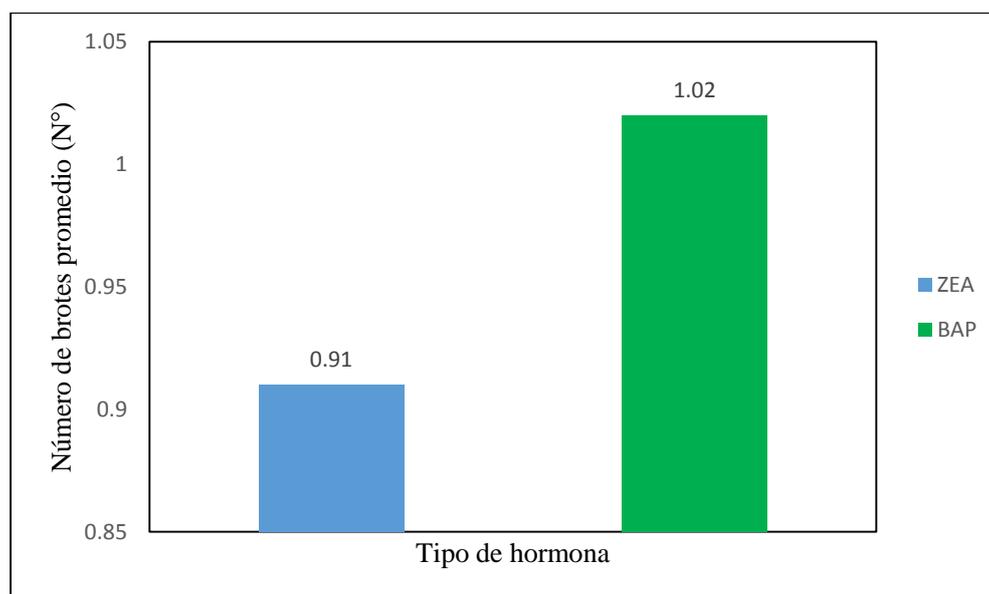


Figura 46: Número brotes por tipo de citoquinina empleando tapas de algodón

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de citoquinina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L (Anexo 13); el número de brotes fue de 1,08; 0,93 y 0,88; respectivamente. Siendo la concentración 0,5 mg/L la de cantidad de brotes formados (Figura 47).

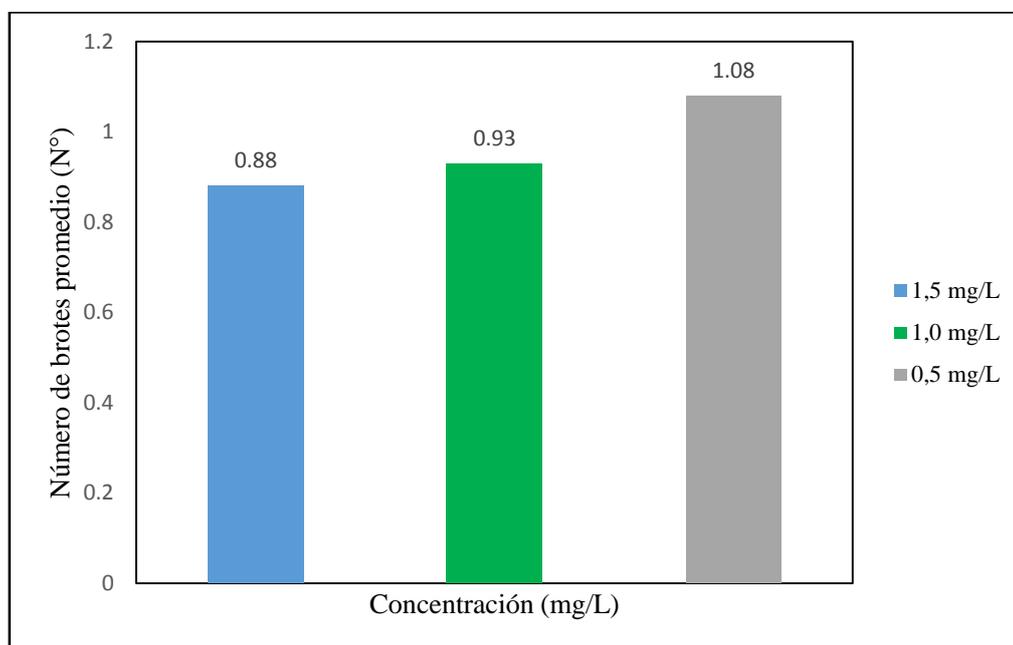


Figura 47: Número de brotes promedio por concentración de citoquinina empleando tapas de algodón

Se observa que una mayor concentración de citoquininas disminuye la formación de brotes, indistintamente sea BAP o ZEA, estos resultados son constatados por Flor (2013), quien observó la misma tendencia obteniendo mayor formación de brotes en un medio sin adición de citoquininas. El autor menciona que esto muestra la ineficaz acción de las citoquininas exógenas, y la presencia de hormonas endógenas en el género *Prosopis*.

Minchala *et al.* (2014) reportan 2,8 brotes en promedio adicionando 2,0 mg/L de BAP. Estos resultados difieren de los mostrados en la presente investigación lo cual se debería a que el período de incubación fue menor al de los autores ya que en este trabajo se cultivaron los explantes durante 42 días mientras que ellos evaluaron en 90 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 promedio el número de brotes obtenidos en esta investigación ha sido baja, razón por la cual no se pudo continuar realizando más subcultivos. Resultados similares presentan Minchala *et al.* (2014) y Buendía *et al.* (2007). Amutha *et al.* (2006), citado por Flor (2013) menciona que en la mayoría de especies forestales se reportan bajas tasas de multiplicación debido a su naturaleza recalcitrante dificultando la propagación *in vitro*.



Figura 48: Formación de brotes en microestaca subcultivada

4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

4.1. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO

El análisis de varianza para el porcentaje de enraizamiento no mostró diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de auxinas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 15).

Se observa que las microestacas introducidas en el t4 (WPM + 0,5 mg/L AIB) presentaron el mayor valor con 53,3 por ciento mientras que t1 (muestra control sin hormonas) presentó el menor valor con ninguna microestaca enraizada en 35 días de incubación (Figura 49).

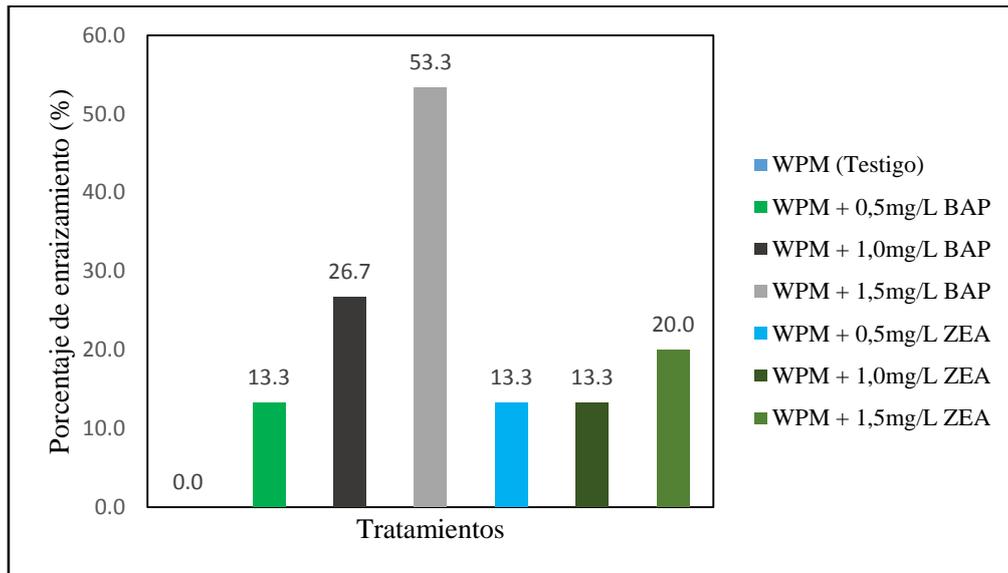


Figura 49: Porcentaje de microestacas enraizadas por tratamiento

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de auxina no presentó diferencias estadísticamente significativas para ANA, AIB y AIA (Anexo 15); el porcentaje de enraizamiento fue de 20; 16,67 y 33,33 por ciento, respectivamente. Siendo AIB el que presentó mayor porcentaje de enraizamiento (Figura 50).

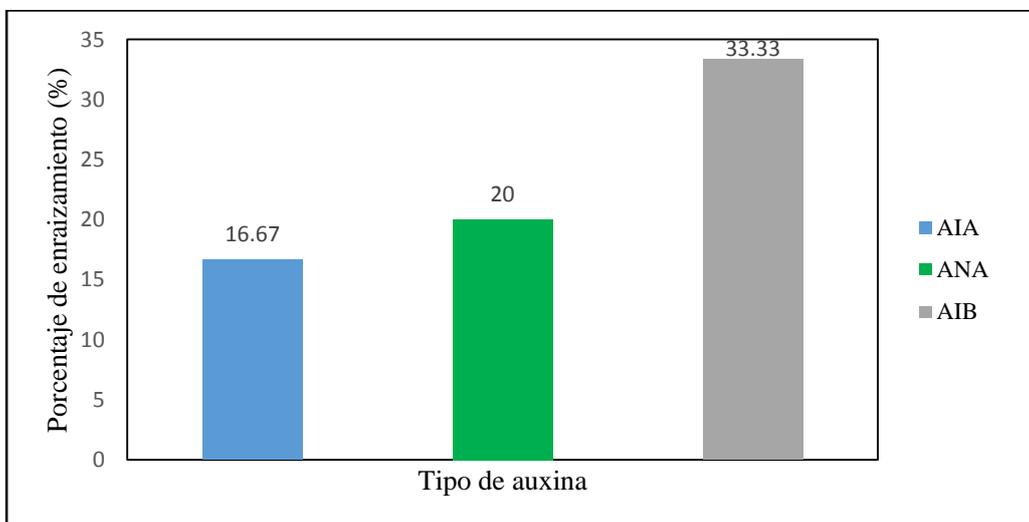


Figura 50: Porcentaje de enraizamiento por tipo de auxina

Se observa que el mejor porcentaje de enraizamiento (33,33 por ciento) se obtiene con AIB independientemente de la concentración de ésta. El AIB es una auxina fuertemente activa, es similar al AIA, y en una mayoría de especies ha demostrado ser más efectiva que cualquier otra auxina. El ANA es una auxina también sintética de similar estabilidad AIB y

más efectiva que el AIA (Bidwell 1979; Mesen 1998). Esto se comprueba en la Figura 50, donde se observa una mayor eficacia del AIB, seguida del ANA y por último el AIA, el cual indujo un menor porcentaje de enraizamiento.

Similares resultados presentaron Caro *et al.* (2002) quienes obtuvieron mejores resultados de enraizamiento cuando AIB era empleado como regulador de crecimiento para la propagación de *Prosopis chilensis*. Minchala *et al.* (2014) también presentaron mejores resultados de enraizamiento con la adición de AIB al medio de cultivo en *Prosopis limensis*.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de auxina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de 0,5 mg/L y 1,0 mg/L (Anexo 15); el porcentaje de enraizamiento fue de 26,67 y 20 por ciento respectivamente. Siendo 0,5 mg/L la que presentó un mayor porcentaje de enraizamiento (Figura 51).

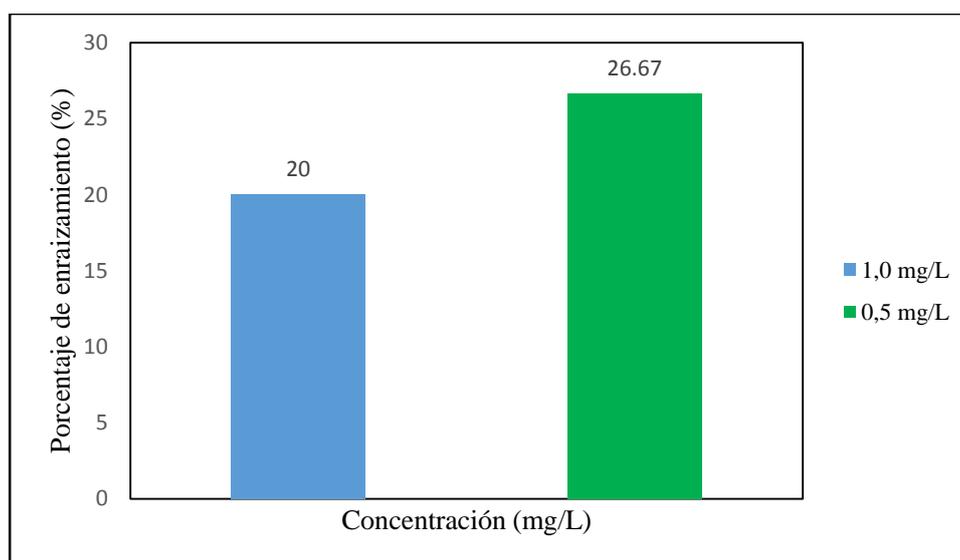


Figura 51: Porcentaje de enraizamiento por concentración de auxina

Se observa que se obtiene un mayor porcentaje de enraizamiento con una concentración menor de auxinas, lo que demuestra que no se requieren grandes cantidades, debido a la posibilidad de un gran contenido de hormonas endógenas. Los resultados presentados son similares a los obtenidos por Flor (2013), quien observa mejores valores de enraizamiento con concentraciones menores de auxinas, obteniendo un mejor resultado con una concentración 0,3 mg/L de AIB.

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 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.

En todos las microestacas enraizadas se observó la formación de callos en su base, sin embargo, luego se observó el inicio de la rizogénesis y posteriormente la formación de raíces propiamente dicho. De igual forma, Jordan *et al.* (1985) observaron la proliferación de callo previo a la formación de raíces. Flor (2013) trabajó con concentraciones de auxinas por debajo de 0,5 mg/L debido a que encontró información de esta formación callosa en el enraizamiento de *Acacia macracantha* en concentraciones de 0,6 y 0,9 mg7L. Sin embargo, el autor también observó callosidad incluso por debajo de las concentraciones mencionadas, pero luego se inició la rizogénesis como en la presente investigación.



Figura 52: Microestaca enraizada de *Prosopis pallida* con callo en el cuello de la plántula

4.2. LONGITUD DE RAÍCES

El análisis de varianza para la longitud de raíces no presentó diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de auxinas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 15).

Se observa que las microestacas introducidas en el t4 (WPM + 0,5 mg/L AIB) presentaron mayor valor de longitud con 1,47 seguido de t7 (WPM + 0,5 mg/L AIA) con un valor de 0,6 mientras que t1 (tratamiento control sin auxinas) presentó el menor valor para el periodo de 35 días (Figura 53).

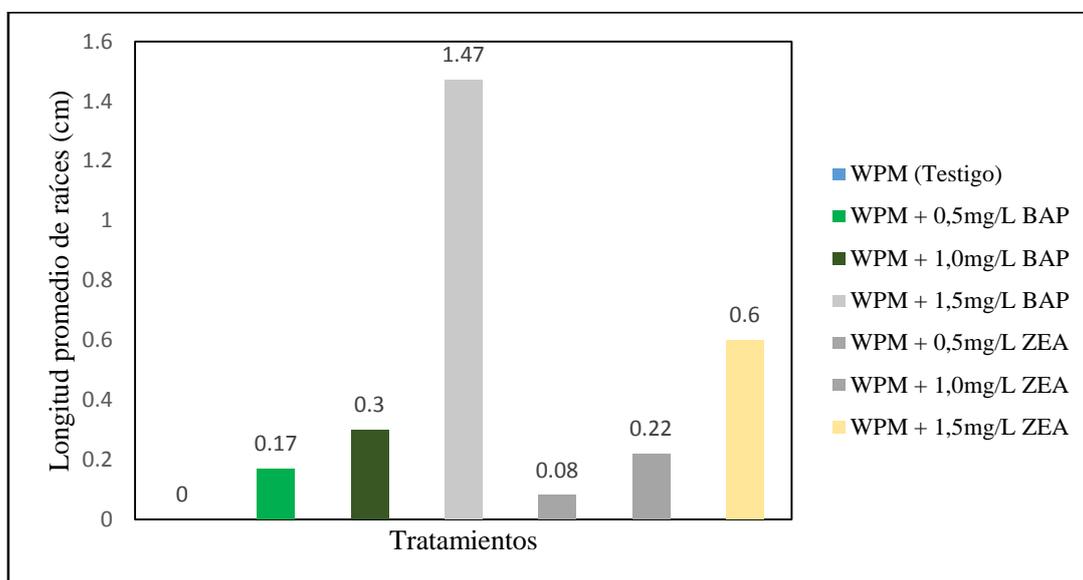


Figura 53: Longitud promedio de raíces por tratamiento

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de auxina no presentó diferencias estadísticamente significativas para AIB, AIA y ANA (Anexo 15); la longitud de raíces fue de 0,78; 0,41 y 0,23 cm, respectivamente. Siendo AIB el que presentó una mayor longitud de raíces (Figura 54).

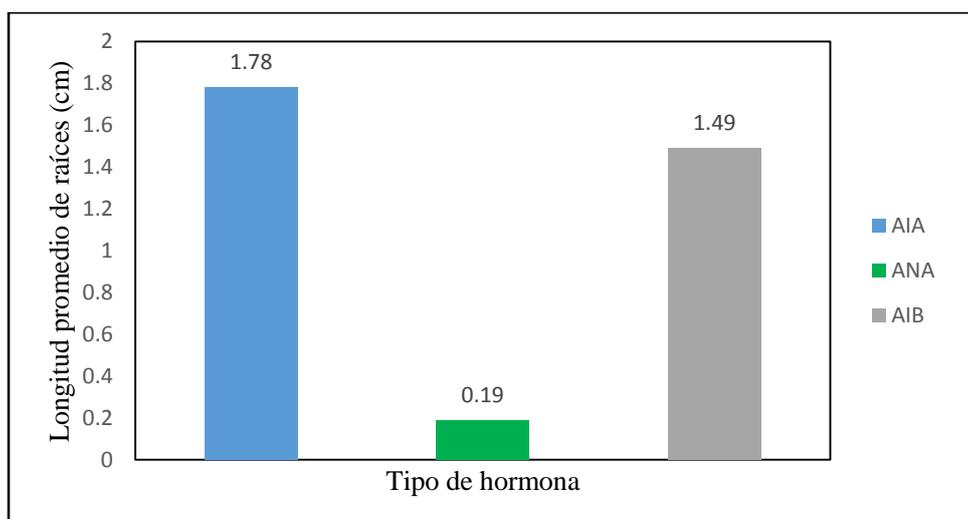


Figura 54: Longitud de raíces por tipo de auxina

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de auxinas no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de 0,5 mg/L y 1,0 mg/L (Anexo 15); la longitud de raíces fue de 0,62 y 0,33 cm, respectivamente. Siendo 0,5 mg/L la que presentó una mayor longitud de raíces (Figura 55).

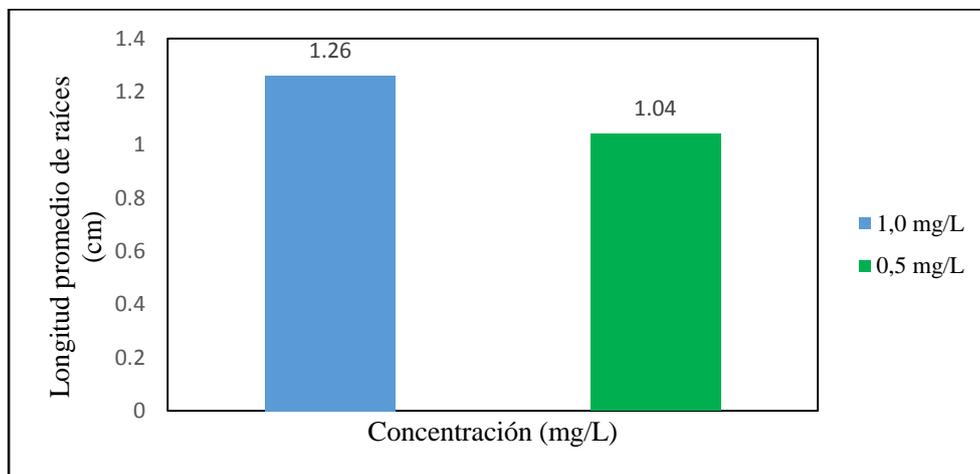


Figura 55: Longitud de raíces por concentración de auxina

En la Figura 54, se observa un mayor efecto del AIB la longitud de raíces, mientras que en la Figura 55 se puede observar mejores valores con una concentración de 0,5 mg/L.

Minchala *et al.* (2014) obtuvieron un valor de 0,7 cm con una concentración de 1,0 mg/L AIB en el enraizamiento de microestacas de *Prosopis limensis*, mientras que Flor (2013) presentó una longitud de raíz de 1,10 cm con un medio de cultivo MS sin la adición de auxinas. En la presente investigación se obtuvieron como mayor valor 1,47 cm con t4 (WPM + 0,5mg/L), quizás por una mayor efectividad del medio de cultivo WPM que el MS/2 empleado por los autores mencionados

4.3. NÚMERO DE RAÍCES

El análisis de varianza para el número de raíces no presentó diferencias estadísticamente significativas para el tipo y concentración de auxinas ni para la interacción de estos dos factores (Anexo 15).

Se observa que las microestacas introducidas en el t4 (WPM + 0,5 mg/L AIB) presentaron mayor número de raíces (1,47) seguido de t7 (WPM + 1,0 mg/L AIA) con un valor de 0,87 mientras que t1 presentó el menor valor para el periodo de 35 días (Figura 56).

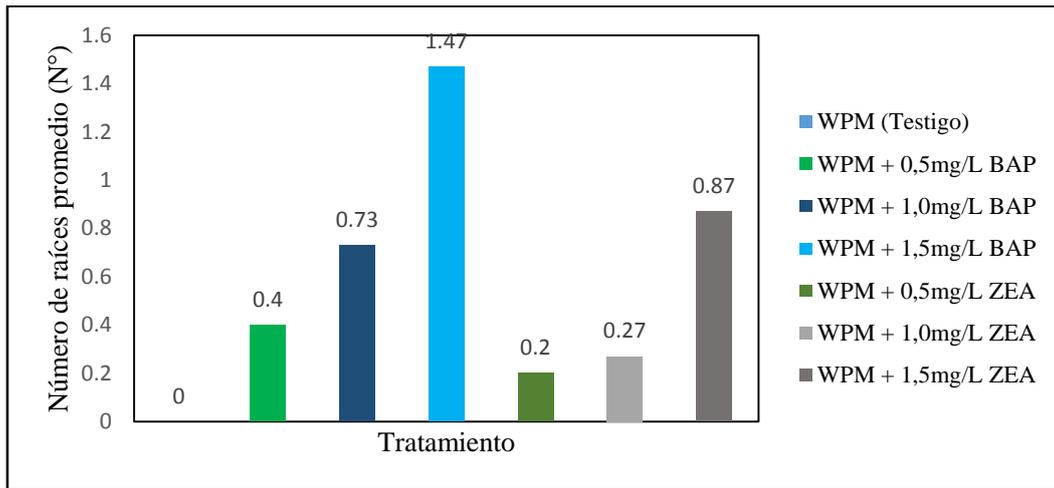


Figura 56: Número promedio de raíces por tratamiento

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal tipo de auxina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las hormonas AIB, ANA, AIA (Anexo 15); el número de raíces fue de 0,83; 0,57 y 0,57; respectivamente. Siendo AIB el que presentó un mayor número de raíces (Figura 57).

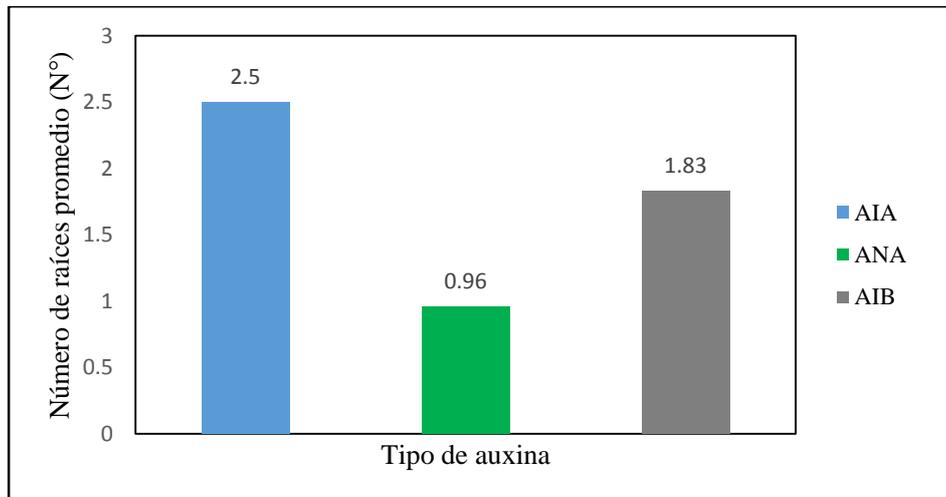


Figura 57: Número de raíces por tipo de auxina

Se observa que el AIB tiene un mayor efecto sobre el número de raíces que las otras auxinas. Datos similares fueron presentados por Minchala *et al.* (2014) quienes obtuvieron en promedio mayor cantidad de raíces con AIB.

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el factor principal concentración de auxina no presentó diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de 0,5 mg/L y 1,0 mg/L

(Anexo 15); el número de raíces fue de 2,08 y 1,44; respectivamente. Siendo AIB el que presentó un mayor número de raíces (Figura 58).

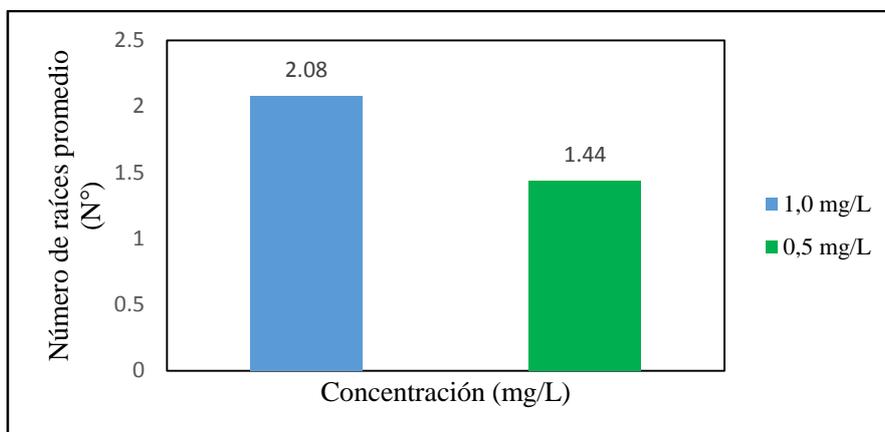


Figura 58: Número de raíces por concentración de auxinas

Se observa que una concentración de 0,5 mg/L tiene un mayor efecto en el número de raíces. Este dato difiere a lo presentado por Minchala *et al.* (2014) quienes obtienen mayor número de raíces con una concentración de 1,0 mg/L de auxinas. Esto probablemente a que hubo una diferencia en el medio de cultivo empleado, ya que se trabajó con WPM mientras que los autores trabajaron con medio MS.

5. FASE DE ACLIMATACIÓN

5.1. PORCENTAJE DE ACLIMATACIÓN

El análisis de varianza para el porcentaje de aclimatación no mostró diferencias estadísticamente significativas para el tipo de sustrato empleado. (Anexo 17).

Se observa que las plántulas en el sustrato premix presentaron un porcentaje de aclimatación del 100 por ciento mientras las plántulas en el sustrato jiffys presentaron un porcentaje de 93,33 por ciento (Figura 59).

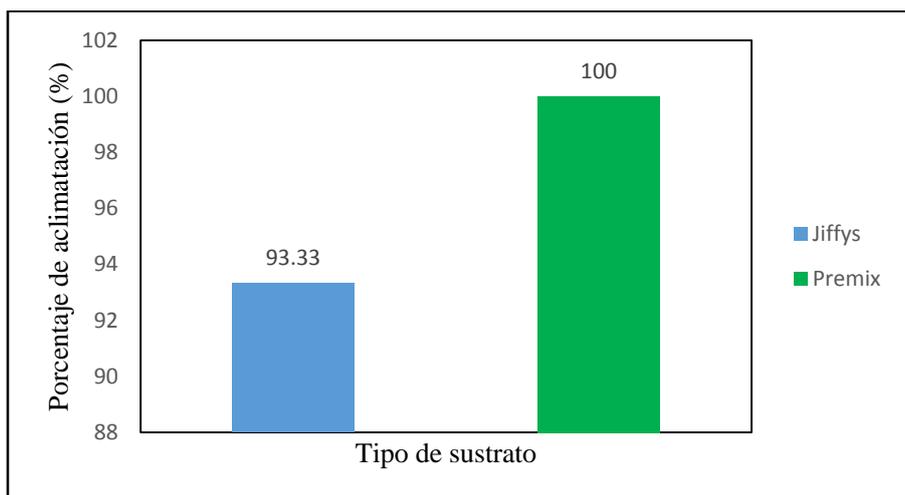


Figura 59: Porcentaje de aclimatación por tipo de sustrato

El sustrato premix #8 presenta en su composición musgo y vermiculita (Anexo 18), mientras que las pastillas jiffys #30 están compuestas de musgo en mayor porcentaje (Anexo 19). 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 por ciento de turba como se presenta en el presente trabajo.



Figura 60: Plántulas de *Prosopis pallida* provenientes del cultivo *in vitro*

V. CONCLUSIONES

- 1) Es factible la propagación *in vitro* de *Prosopis pallida* a partir de yemas apicales.
- 2) Se concluye que el protocolo adecuado para la propagación *in vitro* de *Prosopis pallida* fue el siguiente: previa a la siembra, la inmersión de semillas en agua caliente a 80°C durante 10 minutos, luego la desinfección superficial de semillas aplicando 1,2 por ciento de hipoclorito de sodio durante 15 minutos; para la multiplicación, la siembra de yemas apicales con cotiledones en WPM sin adición de citoquininas; para el enraizamiento, la siembra de las microestacas en WPM + 0,5 mg/L AIB y para la aclimatación, el sustrato Premix #8.
- 3) Las semillas sumergidas en t1 (1,2 por ciento de hipoclorito de sodio durante 15 minutos) presentaron el mayor valor para la variable porcentaje de establecimiento y el menor valor para la variable porcentaje de contaminación.
- 4) El explante más adecuado son yemas apicales con sus dos cotiledones en medio de cultivo WPM empleando tapas de algodón.
- 5) Las yemas apicales del t1 (WPM sin citoquininas) en la fase de multiplicación, reportaron mejores resultados para las variables número de nudos, altura de plántulas y número de brotes.
- 6) La auxina más efectiva para el enraizamiento *in vitro* de microestacas fue el AIB.
- 7) Las microestacas del t4 (WPM + 0,5 mg/L AIB) presentaron el valor más alto para la variable porcentaje de enraizamiento, longitud de raíz y número de raíces.
- 8) El sustrato premix #8 fue el que presentó mayor porcentaje de aclimatación
- 9) Para lograr un alto porcentaje de plántulas germinadas el tratamiento pregerminativo que presentó mejores resultados fue la inmersión de las semillas en agua caliente a 80 °C durante 10 minutos.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros tipos de explantes diferentes para comparar la tasa de multiplicación para la propagación de *Prosopis pallida*.
- Se recomienda adecuar las condiciones microclimáticas del recipiente que se emplea para la propagación pudiendo afectar al correcto desarrollo de los explantes.
- Se recomienda investigar el efecto de la interacción de un medio de cultivo adicionado tanto con citoquininas como con auxinas para la fase de multiplicación.
- Se recomienda realizar investigaciones empleando el medio de cultivo WPM a la mitad de la concentración para la fase de enraizamiento.
- Se recomienda realizar investigaciones evaluando menores concentraciones de la auxina AIB.
- Se recomienda evaluar la técnica de embriogénesis somática como una posible vía de propagación *in vitro* de *Prosopis pallida* para comparar los resultados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abobkar, I; Saad, M; Ahmed, E. 2012. Plant Tissue Culture Media (en línea). In Leiva, A; Laura, M. eds. Recent Advances in Plant in vitro Culture. InTech. Consultado 19 jul. 17. Disponible <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>.
- Acosta, M; Saavedra, S; Bruno, C; M, P. 2012. Aplicación de la regresión logística en un estudio de emergencia de plántulas de algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb.) en vivero, bajo diferentes concentraciones salinas. Quebracho 20 (2): 78-84.
- Adema, M. 2015. ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivos *in vitro*. In Sharry, S; Adema, M; Abedini, W. eds. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Buenos Aires, AR. EDULP. p. 81-92.
- Aguilera, R. 2014. Algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) recurso biológico estratégico para la sostenibilidad del bosque tropical seco caso: comunas provincia de Santa Elena – Ecuador. DELOS 20 (7): 1- 10.
- Albán, L; Matorel, M; Trías, J; Vera, J. 2003. Reforestación extensiva con algarrobo (*Prosopis pallida*) en la región desértica de Piura, Perú. Zonas áridas no.7: 244-252.
- Arévalo, J. 1998. Tratamientos para mejorar la germinación de semillas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y algarrobo (*Prosopis spp.*). Tesis Ing. Agrónomo. Zamorano, HN, Universidad Zamorano. 43p.
- Azcón, J; Talón, M. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal. 2 ed. Madrid, ES, McGraw-Hill. 665p.
- Bairu, M; Stirk, W; Van Staden, J. 2009. Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell Tiss Organ Cult no.98: 239-248.
- Bairu, M; Kane, M. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. Plant Growth Regul no.63: 101-103.

- Barrueto, L. 2005. El cultivo de tejidos. In Prieto, H; Jordan, M; Barrueto, L; Cordeiro, M; Durzan, D. eds. Biotecnología vegetal. Santiago, CL, INIA. p. 31-54.
- Bravo, M; Rodríguez, M. 2003. Detección de cambios en los bosques secos del norte del Perú: Un análisis temporal entre los años 1991 y 2000 en “Malinguitas”. Zonas áridas no.7: 244-252.
- Bidwell, R. 1979. Fisiología vegetal. México D.F, MX, AGT. 804p.
- Briones, M. 2015. Micropropagación: La técnica de “fotocopiado” de plantas. In Sharry, S; Adema, M; Abedini, W.eds. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Buenos Aires, AR, EDULP. p. 112-120.
- Boeri, P. 2015. ¿Cómo se nutren las plantas de probeta? In Sharry, S; Adema, M; Abedini, W.eds. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Buenos Aires, AR, EDULP. p. 46-72.
- Borges, M; Estrada, E; Pérez, I; Meneses, S. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología 11(2): 127-135.
- 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 no.43: 260-266.
- _____.2017. Micropropagación del género *Prosopis* (correo electrónico). Estado de México. MX. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Cairati, E. 2013. Historia cultural de algarrobo, desde la cuenca del Mediterráneo hasta la costa norte del Perú. Rivista di studi letterari e culturali no.10: 186 – 204.
- Cañal, M; Rodríguez, R; Fernández, B; Sánchez-Tames, R; Majada, P. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. Biotecnología vegetal no.1: 3-9.
- Caro, L; Polci, P; Lindström, L; Echenique, C; Hernández, L. 2002. Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. Biocell 26(1): 25-33.
- Celestino, C; Hernández, I; Carneros, E; López-Vela; D; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales 14(3): 345-357.

- Correia, D; Cortezzi, M. 1995. In vitro propagation of black wattle (*Acacia meamsii* De Wild). IPEF no. 48-49: 117-125.
- Cuba, M; Acuña, D; Cordero, C; Klagges, M. 2014. Optimización de parámetros para la propagación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Gayana Bot. 71(1): 58-67.
- Cuentas, M. 2015a. Estudio y análisis de la biodiversidad, distribución y conservación de los bosques secos en Lambayeque. Tesis Lic. Lima, PE, Pontificia Universidad Católica del Perú. 185p.
- _____. 2015b. El uso del espacio natural para el desarrollo del territorio: los bosques secos de algarrobo para las comunidades rurales en Lambayeque, 1985-2015. Investiga Territorios no.2: 105-118.
- Díaz, F. 2013. Determinación de la deforestación en los Bosques Secos del Santuario Histórico de Pómac (en línea). Anais XVI Simposio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Consultado 19 Jul. 17, Disponible en <http://www.dsr.inpe.br/sbsr2013/files/p1704.pdf>
- Dostert, N; Roque, J; Cano, A; La Torre, M; Weigend, M. 2012. Hoja botánica: Algarrobo. Proyecto Perú Diverso. Cooperación Alemana al Desarrollo. Perú.
- Fenning, T; Gershenzon, J. 2002. Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology. Trends in biotechnology 20(7): 291-296.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, IT). 2016. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015. 2 ed. Roma, IT. 54p
- Flor, E. 2013. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K. Tesis Ing. Agrónomo. Quito, EC, Universidad Central de Ecuador. 91p.
- _____. 2016. Micropropagación de *Prosopis pallida* (Correo electrónico). Quito. Ecuador. SENAGUA.
- Galera, F. 2000. Los algarrobos: Las especies del género *Prosopis* de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Consultado 8 ago. 2016, Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/AD314S/AD314S00.htm#TOC>.

- George, E; Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. London, UK, Exegetics Limited.
- Häggman, H. 1991. Application of biotechnology to forest tree breeding. *Silva fenn* 25(4): 270-279.
- Harris, P. 1992. Vegetative propagation of *Prosopis*. In Dutton, R (eds.). *Prosopis species: aspects of their value, research and development*. Reino Unido, University of Durham.
- Huang, F; Al-Khayri, J; Gbur, E. 1994. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In vitro Cell. Dev. Biol* no.30: 70-74.
- 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>
- Jordan, M; Pedraza, J; Goreux, A. 1985. *In vitro* propagation studies of three *Prosopis* species (*P. alba*, *P. chilensis* and *P. tamarugo*) through shoot – tip culture. *Gartenbauwissenschaft* 50(6): 265- 267.
- _____. 2005. Establecimiento del cultivo de tejidos. In Prieto, H; Jordan, M; Barrueto, L; Cordeiro, M; Durzan, D.eds. *Biotecnología vegetal*. Santiago, CL, INIA. p. 55-72.
- _____; Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. In Squeo, F; Cardemil, L.eds. *Fisiología vegetal*. Universidad de La Serena. Consultado 01 Set. 2017. Disponible en: <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Lindsey, K; Jones, M. 1989. *Plant biotechnology in agriculture*. Open University Press. 256pp
- Llerena, C; Silvestre, E; Yalle, S. 2014. Los bosques y el cambio climático en el Perú: situación y perspectivas. Lima, PE, 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 no.52: 882-883
- Martínez, R; Azpiroz, H; Rodríguez, J; Cetina, V; Gutiérrez, M. 2010. La biotecnología y su aplicación a los recursos forestales. In Rodríguez, J; Martínez, M; Azpiroz, H; Rojo, G; Ramírez, B. eds. Biotecnología aplicada a los recursos forestales. MX, Universidad Autónoma Chapingo. p. 1-36. Serie Forestal
- Martínez, Y; Rodríguez, M; Colinas, M; Villegas, O; Castillo, A; Alia, I. 2015. Efectos de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). Rev. Fiotec. Mex 38(4): 369-374.
- 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 Aridas 2(1): 53-59.
- Mesen, F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación. Turrialba, CR, CATIE. 36p.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura, PE). 2010. Estado situacional de las plantaciones forestales en los bosques secos de la costa norte del Perú. Lima, PE. Boletín Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre. Consultado 17 Jul. 17. Disponible en <http://www.serfor.gob.pe/portal/pdf/publicaciones/bosquessecos.PDF>
- MINAM (Ministerio del Ambiente, PE). 2011. El Perú de los bosques. Lima, PE, Programa Nacional de Conservación de Bosques para la Mitigación del cambio climático. 73p.
- 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.
- Monteuuis, O. 2016. Micropropagation and production of forest trees. In Vegetative propagation of forest trees. National Institute of forest science (NIFoS). KR. 33-55
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiology Plantarium no. 15:473-497.

- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Micropropagación. In Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E; Mroginski, L. eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Buenos Aires, AR, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). p. 353-362.
- Otovo, J. 2015. Aportes para un manejo sostenible del ecosistema bosque tropical seco de Piura. Piura, PE, Asociación para la investigación y desarrollo integral (AIDER). 66p.
- Paico, J. 2014. Piura tiene el 72% de los bosques secos, un patrimonio fundamental para su desarrollo (en línea). Piura, PE, Udep hoy. Consultado 14 ago. 2017. Disponible en <http://udep.edu.pe/hoy/2014/piura-tiene-el-72-de-los-bosques-secos-un-patrimonio-fundamental-para-su-desarrollo/>
- Passera, C. 2000. Fisiología de *Prosopis* spp. MULTEQUINA 9(2): 53-80.
- Pedroza, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología 11(1): 17-32.
- Prokopiuk, D; Chifa, C. 2000. Comparación de tratamientos pre germinativos en semillas de algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb.). Comunicaciones científicas y tecnológicas 2000: 4p.
- Raj, R. 2010. Biology and multiplication of *Prosopis* species grown in the Thar desert. In Ramawat, K. eds. Deser Plants: Biology and Biotechnology. Springer. p. 371-401.
- Ramírez, M; Urdaneta, A; León de Sierralta, S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Revista de la Facultad de Agronomía 19(1): 1-8.
- Ramos, J. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Especialización en biotecnología agraria. Bogotá, CO, Universidad Nacional Abierta y A Distancia. 83p.
- Remache, L. 2011. Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Tesis Ing. Forestal. EC, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 69p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CO, CIAT. 970p.

- Rojas, S; García, J; Alarcón, M. 2004. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Consultado 24 set 2016. Disponible: <https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf>
- Sarmento, T. 2012. Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas. Tesis Dr. Madrid, ES, Universidad Autónoma de Madrid. 298p.
- SERFOR (Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, PE). 2017. Comuneros de Catacaos protegen más de 10 mil árboles que emergieron por las lluvias de El Niño Costero (en línea). SERFOR, Lima, PE. Consultado 17 Jul. 17. Disponible en <http://www.serfor.gob.pe/noticias/comuneros-de-catacaos-protegen-mas-de-10-mil-arboles-que-emergieron-por-las-lluvias-de-el-nino-costero>
- Skolmen, R. 2000. *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) H.B.K. In Francis, J; Lowe, C. eds. Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales. Rio Piedras, PR, Instituto Internacional de Dasonomía Tropical. p. 428-431.
- 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, US, Zea Books. p. 83-95.
- 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.
- Tous, J. 1984. Cultivo de Algarrobo (en línea). Hojas Divulgadoras 10. ES, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Consultado 22 oct. 2017. Disponible en <http://www.biblioteca.org.ar/libros/327003.pdf>
- Troncoso de Arce, A; Cantos, M; Liñan, J; Troncoso, J; García, M. 2010. Conservación de plantas de interés forestal. Investigación y Ciencia 61: 60-69

- Villareal, B. 2015. ¿Cómo se forman las nuevas plantas in vitro? In Sharry, S; Adema, M; Abedini, W. eds. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Buenos Aires, AR. EDULP. p. 81-92.
- Wust, W. 2015. “Si en Piura se continúa talando algarrobos como hasta ahora, en 5 años no quedará ni uno” (en línea). Lima, PE, Sociedad Peruana de Derecho Ambiental. Consultado 19 Jul. 17. Disponible en <http://www.actualidadambiental.pe/?p=28349>
- Yao, D; Batchelor, C; Koechler, J; Harris, P. 1989. In vitro regeneration of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). Annals des Sciences Forests no. 46: 110-112.
- Zapata, R. 2015. Piura: reforestan bosque seco con mil plantones de algarrobo (en línea). , Lima, PE, El Comercio. Consultado 17 Jul. 17. Disponible en: <http://elcomercio.pe/peru/piura/piura-reforestan-bosque-seco-mil-plantones-algarrobo-258225>
- Zegarra, K. 2014. Establecimiento *in vitro* de yemas y efecto de reguladores de crecimiento ANA y BAP en la Micropropagación de *Polylepis rugulosa* (Queñua) de Zonas Altoandinas de Arequipa. Tesis Ing. Biotecnólogo. Arequipa, PE. Universidad Católica de Santa María. 116p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS (MURASHIGE AND SKOOG, 1962)

Componente	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
Nitrato de amonio ((NH ₄) ₂ NO ₃)	1650
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	170
Micronutrientes	
Sulfato de manganeso tetrahidratado (MnSO ₄ .4H ₂ O)	22,3
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
Yoduro de potasio (KI)	0,83
Molibdato sódico hidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,25
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025
Dicloruro de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,025
Fuente de hierro	
Sulfato de hierro heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8
Etilendiamino tetra acético de sodio (Na ₂ EDTA)	37,3
Vitaminas	
Mio - inositol	100
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Glicina	2
Tiamina. HCl	0,1

FUENTE: Sigma (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/murashige-skoog.html>)

ANEXO 2

COMPOSICIÓN DEL WPM (LLOYD AND MCCOWN, 1981)

Componente	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
Nitrato de amonio ((NH ₄) ₂ NO ₃)	400
Sulfato de potasio (K ₂ SO ₄)	990
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	96
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	370
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	170
Nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	556
Micronutrientes	
Sulfato de manganeso hidratado (MnSO ₄ .H ₂ O)	29,43
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
Molibdato sódico hidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,25
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,25
Fuente de hierro	
Sulfato de hierro heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8
Etilendiamino tetra acético de sodio (Na ₂ EDTA)	37,3

FUENTE: Caisson (<http://www.caissonlabs.com/formpdf.php?product=846>)

ANEXO 3

**TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS AL ENSAYO DE TRATAMIENTOS
PREGERMINATIVOS**

Ubicación del ensayo	Tratamiento pre germinativo	22-07-16	25-07-16	27-07-16	01-08-16	03-08-16	05-08-16	08-08-16	10-08-16	12-08-16	15-08-16	17-08-16	Total
A1	Testigo	4	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
A2	Testigo	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	18
A3	Testigo	3	4	5	7	7	7	7	7	7	7	7	
B1	Acetona 100%	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
B2	Acetona 100%	2	6	8	8	8	8	8	9	9	9	9	20
B3	Acetona 100%	1	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
C1	Ácido sulfúrico 72%	1	6	7	7	8	8	8	8	8	8	8	
C2	Ácido sulfúrico 72%	1	4	5	5	5	6	6	6	6	6	6	19
C3	Ácido sulfúrico 72%	0	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	
D1	Agua caliente*	1	1	4	4	5	5	5	7	7	7	7	
D2	Agua caliente*	0	2	5	8	8	8	8	8	8	8	8	22
D3	Agua caliente*	0	1	1	4	5	5	5	6	7	7	7	

*Agua caliente a 80 °C

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 4

TABLAS DE EVALUACIONES REALIZADAS PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN

Tratamiento	Tratamiento		Número de plántulas establecidas		
	Concentración (%)	Tiempo (min)	R1	R2	R3
t1	20	15	4	6	5
t2	20	20	3	4	4
t3	20	25	5	2	4
t4	25	15	3	6	4
t5	25	20	2	4	6
t6	25	25	2	6	2
t7	30	15	4	2	1
t8	30	20	5	4	3
t9	30	25	5	0	2

FUENTE: Elaboración propia

Tratamiento	Tratamiento		Número de tubos contaminados		
	Concentración (%)	Tiempo (min)	R1	R2	R3
t1	20	15	1	0	0
t2	20	20	1	1	2
t3	20	25	0	2	0
t4	25	15	1	0	1
t5	25	20	0	2	0
t6	25	25	1	0	1
t7	30	15	1	0	1
t8	30	20	1	0	0
t9	30	25	0	1	0

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de contaminación	27	0,19	0	118,38

Análisis de varianza - Porcentaje de contaminación					
Fuentes de variación	SC	Gl	CM	F	p-valor
Concentración (%)	51,85	2	25,93	0,47	0,634 ^{ns}
Tiempo (min)	29,63	2	14,81	0,27	0,769 ^{ns}
Concentración * Tiempo (%)	148,15	4	37,04	0,67	0,623 ^{ns}
Error	1000	18	55,56		
Total	1229,63	26			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de plántulas establecidas	27	0,27	0	45,92

Análisis de varianza - Porcentaje de plántulas establecidas					
Fuentes de variación	SC	Gl	CM	F	p-valor
Concentración (%)	763	2	381,5	1,37	0,279 ^{ns}
Tiempo (min)	363	2	181,5	0,65	0,532 ^{ns}
Concentración (%) * Tiempo (min)	703,7	4	175,9	0,63	0,645 ^{ns}
Error	5000	18	277,8		
Total	6829,6	26			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de la concentración en la desinfección superficial de semillas de *Prosopis pallida*

Concentración (%)	Variables a evaluar	
	Porcentaje de contaminación (%)	Porcentaje de plántulas establecidas (%)
3,0	4,44 a	28,89 a
1,5	6,67 a	38,89 a
1,2	7,78 a	41,11 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto del tiempo de inmersión en la desinfección superficial de semillas de *Prosopis pallida*

Tiempo de inmersión (min)	Variables evaluadas	
	Porcentaje de contaminación (%)	Porcentaje de plántulas establecidas (%)
15	5,56 a	38,89 a
25	5,56 a	31,11 a
20	7,78 a	38,89 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de los tratamientos en la desinfección superficial de semillas de *Prosopis pallida*

Tratamientos	Variables	
	Porcentaje de contaminación (%)	Porcentaje de plántulas establecidas (%)
t2	13,33 a	36,7 a
t6	6,67 a	33,3 a
t5	6,67 a	40,0 a
t3	6,67 a	36,7 a
t4	6,67 a	43,3 a
t7	6,67 a	23,3 a
t1	3,33 a	50,0 a
t8	3,33 a	40,0 a
t9	3,33 a	23,3 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 6

CANTIDAD DE EXPLANTES POR NIVEL DE CALLOSIDAD EN ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN

Tratamiento	Nivel de Callosidad														
	Nivel 0			Nivel I			Nivel II			Nivel III			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
t1	3	5	7	4	0	1	2	1	0	0	0	0	1	4	2
t2	1	2	0	0	0	0	6	5	4	3	3	4	0	0	2
t3	0	1	2	0	0	0	5	3	2	2	3	3	3	3	2
t4	1	1	0	0	1	0	0	4	0	0	3	9	9	1	2
t5	1	6	4	0	0	4	5	0	0	0	0	0	4	4	2
t6	1	1	1	0	1	1	1	2	3	1	3	2	7	0	3
t7	0	0	0	0	0	0	4	3	2	4	4	5	2	3	3
t8	0	0	0	0	0	0	3	0	2	6	5	5	1	5	3
t9	0	4	3	0	0	3	3	0	2	2	0	2	5	6	1
t10	0	4	0	0	0	0	3	2	2	6	0	5	1	2	3
t11	0	5	0	0	1	0	1	0	2	4	0	5	5	4	3
t12	2	7	0	0	1	0	1	0	1	5	0	3	2	3	5
t13	0	9	3	0	0	2	2	0	0	5	0	0	4	1	0
t14	0	1	0	0	0	0	2	2	2	4	2	5	4	5	3
t15	0	0	0	0	0	0	2	1	1	6	4	5	2	3	4
t16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	5	5	3	4	5

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 7

PORCENTAJE DE EXPLANTES POR NIVEL DE CALLOSIDAD

Tratamiento	Nivel de Callo (%)				Necrosis (%)
	Nivel 0	Nivel I	Nivel II	Nivel III	
t1	50,0	16,67	10,0	0,0	23,33
t2	10,0	0,00	50,0	33,3	6,67
t3	10,0	0,00	33,3	26,7	26,67
t4	6,7	3,33	13,3	40,0	40,00
t5	36,7	13,33	16,7	0,0	33,33
t6	10,0	6,67	20,0	20,0	33,33
t7	0,0	0,00	30,0	43,3	26,67
t8	0,0	0,00	16,7	53,3	30,00
t9	23,3	10,00	16,7	13,3	40,00
t10	13,3	0,00	23,3	36,7	20,00
t11	16,7	3,33	10,0	30,0	40,00
t12	30,0	3,33	6,7	26,7	33,33
t13	40,0	6,67	6,7	16,7	16,67
t14	3,3	0,00	20,0	36,7	40,00
t15	0,0	0,00	13,3	50,0	30,00
t16	0,0	0,00	0,0	56,7	40,00

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 8

DATOS DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON COTILEDONES

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t1	1	2	2	1	1	1	2
	2	2	1	1	2	2	2
	3	2	1	1	2	1	0
	4	2	2	2	1	2	1
	5	2	1	1	4	0	2
	6	2	1	3	4	1	0
	7	2	2	2	1	1	0
	8	1	2	1	0	0	1
	9	1	2	2	3	2	1
	10	3	1	1	4	2	2
Promedio		1,9	1,5	1,5	2,2	1,2	1,1
t2	1	2	1	1	2	1	2
	2	1	1	1	3	0	0
	3	1	2	2	3	1	1
	4	1	1	1	2	3	2
	5	1	1	2	0	2	1
	6	1	1	1	1	0	2
	7	1	2	1	2	1	0
	8	1	1	1	3	2	0
	9	1	1	1	0	2	1
	10	1	1	1	2	2	2
Promedio		1,1	1,2	1,2	1,8	1,4	1,1
t3	1	1	2	2	0	2	1
	2	1	1	1	0	1	1
	3	1	1	1	0	1	2
	4	1	1	1	0	2	2
	5	1	1	1	3	1	2
	6	1	1	1	0	1	2
	7	3	2	1	1	2	1
	8	1	1	1	0	1	1
	9	1	1	1	0	1	1
	10	1	1	1	1	2	2
Promedio		1,2	1,2	1,1	0,5	1,4	1,5

Continuación

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t4	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	1	1	0	1	1
	3	2	1	1	1	3	1
	4	1	1	1	2	1	1
	5	1	1	1	2	2	0
	6	1	1	1	2	1	1
	7	1	1	1	2	1	2
	8	2	1	1	0	1	0
	9	1	1	1	3	1	0
	10	1	1	1	0	2	2
Promedio		1,2	1	1,1	1,4	1,5	1
t5	1	1	1	2	3	1	4
	2	2	1	1	3	2	2
	3	2	1	2	2	2	0
	4	1	1	2	2	2	2
	5	2	2	3	2	1	1
	6	2	2	1	3	1	2
	7	3	1	1	4	1	2
	8	1	1	1	2	1	0
	9	1	2	1	2	2	3
	10	1	1	1	0	1	0
Promedio		1,6	1,3	1,5	2,3	1,4	1,6
t6	1	1	1	1	2	1	2
	2	2	1	1	1	2	2
	3	1	1	2	0	1	2
	4	2	1	1	3	2	2
	5	1	1	1	0	2	2
	6	1	1	1	2	2	2
	7	2	1	1	0	1	0
	8	2	1	1	2	1	0
	9	2	1	1	2	1	1
	10	1	1	2	0	2	1
Promedio		1,5	1	1,2	1,2	1,5	1,4

Continuación

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t7	1	1	1	1	2	1	1
	2	1	1	1	2	1	1
	3	1	1	1	0	1	0
	4	1	1	1	0	0	2
	5	1	1	1	0	2	1
	6	1	1	1	2	1	0
	7	1	1	1	2	1	0
	8	1	1	1	0	1	0
	9	1	1	1	0	0	1
	10	1	1	1	2	3	0
Promedio		1	1	1	1	1,1	0,6
t8	1	1	1	1	0	1	1
	2	1	1	1	0	2	0
	3	1	1	1	1	2	1
	4	1	1	1	0	2	1
	5	1	1	1	2	2	2
	6	1	1	1	0	1	0
	7	1	1	1	0	0	1
	8	1	1	1	0	0	1
	9	1	1	1	1	1	1
	10	1	1	1	2	1	0
Promedio		1	1	1	0,6	1,2	0,8
t9	1	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	1	2	1	1
	3	3	2	1	1	2	2
	4	2	2	2	1	0	1
	5	3	2	2	1	1	2
	6	2	1	2	1	0	1
	7	2	1	2	2	1	2
	8	3	1	2	2	1	1
	9	1	1	1	0	1	0
	10	2	1	1	1	0	3
Promedio		2,1	1,5	1,6	1,3	0,9	1,5

Continuación

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t10	1	2	1	1	1	2	2
	2	1	1	1	0	1	1
	3	1	1	1	0	1	0
	4	2	1	1	1	0	1
	5	1	1	1	0	0	1
	6	1	1	1	0	2	2
	7	1	1	1	2	1	2
	8	2	1	1	1	1	2
	9	2	2	2	1	1	1
	10	2	2	2	1	2	0
Promedio		1,5	1,2	1,2	0,7	1,1	1,2
t11	1	2	2	1	2	3	0
	2	2	1	1	2	3	0
	3	2	1	2	3	0	1
	4	2	1	1	2	2	2
	5	1	2	1	3	2	2
	6	1	1	1	1	2	2
	7	2	1	1	1	2	2
	8	2	1	2	1	2	2
	9	1	1	1	1	2	2
	10	1	1	2	2	2	2
Promedio		1,6	1,2	1,3	1,8	2	1,5
t12	1	2	1	2	2	2	0
	2	1	1	1	2	2	2
	3	2	1	2	0	3	1
	4	1	1	1	0	3	2
	5	1	1	2	0	2	0
	6	1	2	2	1	2	1
	7	1	1	2	1	3	1
	8	2	1	3	0	0	2
	9	2	1	2	0	3	1
	10	1	1	1	0	2	1
Promedio		1,4	1,1	1,8	0,6	2,2	1,1

Continuación

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t13	1	1	1	2	1	1	4
	2	2	2	2	1	1	1
	3	1	1	1	1	2	1
	4	1	2	1	0	1	0
	5	2	2	1	2	2	2
	6	1	2	2	0	1	1
	7	1	1	2	0	1	2
	8	2	2	2	0	2	1
	9	2	1	1	2	0	1
	10	1	2	1	0	1	1
Promedio		1,4	1,6	1,5	0,7	1,2	1,4
t14	1	2	1	2	0	3	3
	2	2	1	2	2	1	2
	3	1	1	1	0	1	0
	4	1	1	1	0	1	0
	5	1	1	1	0	1	2
	6	1	1	1	2	0	2
	7	1	1	1	1	2	1
	8	1	2	1	2	2	3
	9	1	2	1	2	2	1
	10	1	2	1	1	2	1
Promedio		1,2	1,3	1,2	1	1,5	1,5
t15	1	1	1	1	0	3	0
	2	1	1	2	0	2	1
	3	2	1	2	1	1	2
	4	2	1	1	2	1	0
	5	1	1	1	0	2	2
	6	1	2	2	1	1	1
	7	1	2	2	0	2	2
	8	1	1	1	1	1	1
	9	1	3	1	2	0	3
	10	1	1	1	2	2	2
Promedio		1,2	1,4	1,4	0,9	1,5	1,4

Continuación

Tratamiento	Nº	Número de nudos			Número de brotes		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t16	1	1	1	1	1	3	1
	2	1	2	2	0	2	1
	3	1	1	1	2	2	0
	4	2	1	1	1	1	2
	5	1	1	2	3	0	1
	6	1	2	1	0	0	3
	7	2	1	1	2	1	0
	8	1	1	2	2	1	2
	9	2	1	1	2	2	2
	10	2	1	2	2	0	1
Promedio		1,4	1,2	1,4	1,5	1,2	1,3

FUENTE: *Elaboración propia*

ANEXO 9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON COTILEDONES

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de nudos	48	0,66	0,51	13,42

Análisis de varianza - Número de nudos						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	1,9592	15	0	4,208	0,0003*	
Medio	0,4033	1	0	12,993	0,0010*	
Hormona	0,12	1	0	3,866	0,0580 ^{ns}	
Concentración	1,1758	3	0	12,626	<0,0001*	
Medio*Hormona	0,0008	1	0	0,027	0,8709 ^{ns}	
Medio*Concentración	0,17	3	0	1,826	0,1624 ^{ns}	
Hormona*Concentración	0,06	3	0	0,644	0,5922 ^{ns}	
Medio*Hormona*Concentración	0,0292	3	0	0,313	0,8157 ^{ns}	
Error	0,9933	32	0			
Total	2,9525	47				

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de brotes	48	0,38	0,08	30,78

Análisis de varianza - Número de brotes						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	3,023	15	0	1,282	0,269 ^{ns}	
Medio	0,001	1	0	0,007	0,934 ^{ns}	
Hormona	0,104	1	0	0,659	0,423 ^{ns}	
Concentración	0,256	3	0	0,543	0,657 ^{ns}	
Medio*Hormona	0,007	1	0	0,043	0,837 ^{ns}	
Medio*Concentración	1,715	3	1	3,636	0,023*	
Hormona*Concentración	0,484	3	0	1,027	0,394 ^{ns}	
Medio*Hormona*Concentración	0,456	3	0	0,967	0,420 ^{ns}	
Error	5,031	32	0			
Total	8,054	47				

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Efectos de los medios de cultivo MS 1/2 y WPM en la formación de nudos y brotes en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Medio de cultivo	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Brotes (N°)
MS/2	1,22 ± 0,10 a	1,28 ± 0,19 a
WPM	1,40 ± 0,09 b	1,29 ± 0,17 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Efectos de las hormonas BAP y ZEA en la formación de nudos y brotes en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Hormona	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Brotes(N°)
ZEA	1,26 a	1,24 a
BAP	1,36 a	1,33 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de la concentración de las hormonas BAP y ZEA en la formación de nudos y brotes en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Concentración (mg/L)	Variables a evaluar	
	Nudos (N°)	Brotes (N°)
1,5	1,22 a	1,20 a
1	1,22 a	1,27 a
0,5	1,23 a	1,28 a
0	1,58 b	1,40 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de los tratamientos en la formación de nudos y brotes en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Tratamiento	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Brotes (N°)
t1	1,63 b c	1,50 a
t2	1,17 a b	1,43 a
t3	1,17 a b	1,13 a
t4	1,10 a b	1,30 a
t5	1,47 a b c	1,77 a
t6	1,23 a b c	1,37 a
t7	1,00 a	0,90 a
t8	1,00 a	0,87 a
t9	1,73 c	1,24 a
t10	1,30 a b c	1,00 a
t11	1,37 a b c	1,77 a
t12	1,43 a b c	1,30 a
t13	1,50 a b c	1,10 a
t14	1,23 a b c	1,33 a
t15	1,33 a b c	1,27 a
t16	1,33 a b c	1,33 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 10

**DATOS DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON
COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN – PRIMER
SUBCULTIVO**

<i>Tratamiento</i>	<i>Unidad</i>	<i>Número de nudos</i>			<i>Altura (cm)</i>		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t1	1	2	5	1	2,5	9	1
	2	2	4	5	2,5	4,9	10
	3	3	5	1	4	9,5	1,5
	4	4	5	7	4,5	8,9	11
	5	4	5	6	4,4	7,5	9,6
	6	4	3	1	4	4	1
	7	4	4	3	7,8	6,5	4
	8	3	4	7	3,2	5,9	10
	9	4	2	1	3,9	2	1,5
	10	3	2	3	3	3	3,6
Promedio		3,3	3,9	3,5	4,0	6,1	5,3
t2	1	2	2	2	3,3	3,4	3
	2	2	2	3	2,8	2,5	3,3
	3	2	1	1	2,8	1,4	1,5
	4	5	1	1	6,8	2	1,5
	5	5	1	1	6,1	2	2
	6	2	1	3	3	1,5	4
	7	2	4	6	2,9	4,1	7,5
	8	2	2	3	3,2	2,5	3,4
	9	2	2	1	3,2	2,2	1
	10	2	3	5	3	3,4	5,5
Promedio		2,7	1,9	2,6	3,7	2,5	3,3
t3	1	2	2	1	1,6	1,5	1,8
	2	3	3	2	3,6	3,4	2
	3	3	3	1	2,9	3,9	1,5
	4	2	2	2	2,3	2,6	2,4
	5	2	2	1	1,9	2,5	2
	6	2	2	2	2	2,2	1,8
	7	3	2	1	3,7	2,5	1,5
	8	3	2	3	3,5	2,1	3,2
	9	2	1	3	2,3	1	2,7
	10	3	3	2	3	3,4	2,5
Promedio		2,5	2,2	1,8	2,7	2,5	2,1

Continuación

Tratamiento	Unidad	Número de nudos			Altura (cm)		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t4	1	1	2	1	1	2,3	1,8
	2	2	2	1	2	2	3,4
	3	2	1	2	2,2	1	3,2
	4	4	1	2	3,5	1,4	2,5
	5	3	1	3	3	0,9	3,3
	6	3	1	2	3,2	1,5	2
	7	3	2	1	3,1	2	1
	8	3	3	2	2,8	4	2,3
	9	3	1	2	3,3	1,3	2
	10	4	1	2	3,8	1,8	3,5
Promedio		2,8	1,5	1,8	2,8	1,8	2,5
t5	1	1	2	3	1,2	2	3
	2	4	3	2	5	4	2
	3	3	2	1	3,8	1,9	1
	4	1	2	1	1	2,5	1,6
	5	2	2	2	1,8	2,9	1,5
	6	2	3	3	2,6	3,2	3
	7	2	3	3	2,8	4	4,5
	8	3	2	4	3,1	2,8	5,1
	9	4	2	3	4,8	2	3,3
	10	3	5	2	3	5,2	2,8
Promedio		2,5	2,6	2,4	2,9	3,1	2,8
t6	1	4	3	2	4,6	4	2,8
	2	2	1	1	2,6	2,4	2,6
	3	3	2	2	4	2,8	2
	4	3	1	4	4,3	2,7	5,8
	5	2	1	1	1,6	1,3	1,7
	6	3	4	4	4	4,5	5,4
	7	2	2	2	2,6	2,6	3,2
	8	3	2	2	3,8	1,6	2,8
	9	4	1	2	4,6	1	2,7
	10	2	2	2	2,9	3	4
Promedio		2,8	1,9	2,2	3,5	2,6	3,3

Continuación

Tratamiento	Unidad	Número de nudos			Altura (cm)		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
t7	1	3	2	4	3,8	2,4	4,3
	2	1	3	1	2	4	2,8
	3	2	1	4	2,3	2,2	6,3
	4	2	2	2	2,3	2,5	2,9
	5	1	3	1	2	3,6	1,5
	6	2	1	1	3	0,1	2
	7	2	3	2	2	3,7	5
	8	2	2	2	2,5	3,8	3,4
	9	4	2	2	4,3	3,5	2
	10	2	3	2	3	3,5	4
Promedio		2,1	2,2	2,1	2,7	2,9	3,4

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 11

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN – PRIMER SUBCULTIVO

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
Número de nudos	18	0,19	0	18,1

<i>Análisis de varianza – Número de nudos</i>					
<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	0,46	5	0,093	0,557	0,731 ^{ns}
Hormona	0,06	1	0,056	0,333	0,574 ^{ns}
Concentración	0,41	2	0,204	1,223	0,328 ^{ns}
Hormona*Concentración	0	2	0,001	0,003	0,997 ^{ns}
Error	2	12	0,167		
Total	2,46	17			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
Altura	18	0,46	0,23	14,91

<i>Análisis de varianza - Altura</i>					
<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	1,81	5	0,362	2,021	0,148 ^{ns}
Hormona	0,6	1	0,598	3,335	0,093 ^{ns}
Concentración	0,37	2	0,186	1,039	0,384 ^{ns}
Hormona*Concentración	0,84	2	0,421	2,347	0,138 ^{ns}
Error	2,15	12	0,179		
Total	3,96	17			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Efectos de las hormonas BAP y ZEA en la formación de nudos y altura de *vitro* plántulas en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Hormona	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Altura (cm)
BAP	2,20 a	2,66 a
ZEA	2,31 a	3,02 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de la concentración de las hormonas BAP y ZEA en la formación de nudos y altura de *vitro* plántulas en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Concentración	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Altura (cm)
1,5	2,08 a	2,70 a
1	2,23 a	2,79 a
0,5	2,45 a	3,04 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

Análisis de varianza para todos los tratamientos empleados

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Nudos	21	0,69	0,56	16,18

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,88	6	0,81	5,21	0,0052*
Tratamiento	4,88	6	0,81	5,21	0,0052*
Error	2,19	14	0,16		
Total	7,07	20			

* = Significativo ($p < 0,05$) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Altura	21	0,77	0,68	17,87

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,41	6	2,57	8,01	0,0007*
Tratamientos	15,41	6	2,57	8,01	0,0007*
Error	4,49	14	0,32		
Total	19,9	20			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: *Elaboración propia*

Efecto de los tratamientos en la formación de nudos y altura de las *vitro* plántulas en la introducción de yemas apicales de *Prosopis pallida*

Tratamiento	Variables evaluadas	
	Nudos (N°)	Altura (cm)
t1	3,57 b	5,14 b
t2	2,40 a	3,16 a
t3	2,17 a	2,44 a
t4	2,03 a	2,37 a
t5	2,50 a b	2,91 a
t6	2,30 a	3,13 a
t7	2,13 a	3,02 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: *Elaboración propia*

ANEXO 12

DATOS DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON
COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN – SEGUNDO
SUBCULTIVO

Tratamiento	Unidad	Número de brotes			Tratamiento	Unidad	Número de brotes		
		R1	R2	R3			R1	R2	R3
t1	1	2	3	1	t4	1	0	1	1
	2	2	6	5		2	2	1	1
	3	2	1	1		3	1	1	1
	4	2	6	4		4	3	1	1
	5	1	1	3		5	0	0	1
	6	3	3	0		6	0	1	1
	7	2	2	2		7	0	1	1
	8	3	1	3		8	1	2	1
	9	5	1	1		9	3	0	0
	10	3	2	1		10	3	0	1
Promedio		2,5	2,6	2,1	Promedio		1,3	0,8	0,9
t2	1	1	1	1	t5	1	0	1	1
	2	2	1	2		2	1	1	1
	3	1	1	1		3	3	2	0
	4	1	0	1		4	1	1	0
	5	5	1	1		5	2	0	0
	6	2	1	1		6	2	1	1
	7	1	1	1		7	1	1	1
	8	2	1	1		8	1	1	1
	9	1	1	1		9	2	1	1
	10	0	1	1		10	0	0	1
Promedio		1,6	0,9	1,1	Promedio		1,3	0,9	0,7
t3	1	1	0	1	t6	1	1	1	1
	2	0	3	1		2	1	1	1
	3	0	1	1		3	2	1	0
	4	2	0	1		4	0	0	1
	5	0	1	1		5	2	1	0
	6	2	1	0		6	1	1	1
	7	2	1	0		7	3	2	0
	8	2	0	1		8	2	0	1
	9	2	0	0		9	3	0	2
	10	2	0	0		10	0	0	1
Promedio		1,3	0,7	0,6	Promedio		1,5	0,7	0,8

Continuación

Tratamiento	Unidad	Número de brotes		
		R1	R2	R3
t7	1	1	0	1
	2	1	2	1
	3	1	0	1
	4	2	1	2
	5	0	1	0
	6	1	0	1
	7	1	1	0
	8	1	0	0
	9	0	0	2
	10	1	0	1
Promedio		0,9	0,5	0,9

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 13

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS APICALES CON COTILEDONES EMPLEANDO TAPAS DE ALGODÓN – SEGUNDO SUBCULTIVO

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
Número de brotes	18	0,19	0	34,83

<i>Análisis de varianza - Número de brotes</i>					
<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	0,32	5	0,064	0,565	0,726 ^{ns}
Hormona	0,06	1	0,056	0,49	0,497 ^{ns}
Concentración	0,13	2	0,065	0,574	0,578 ^{ns}
Hormona*Concentración	0,13	2	0,067	0,593	0,568 ^{ns}
Error	1,36	12	0,113		
Total	1,68	17			

* = Significativo ($p < 0,05$) ns = no significativo

FUENTE: *Elaboración propia*

Efectos de las hormonas BAP y ZEA en la formación de brotes en el subcultivo yemas apicales y axilares de *Prosopis pallida*

<i>Hormona</i>	<i>Variable evaluada</i>
	Brotes (N°)
ZEA	0,91 a
BAP	1,02 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: *Elaboración propia*

Efecto de la concentración de las hormonas BAP y ZEA en la formación de brotes en el subcultivo yemas apicales y axilares de *Prosopis pallida*

Concentración	Variable evaluada
	Brotos (N°)
1,5	0,88 a
1	0,93 a
0,5	1,08 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey (p<0,05)

FUENTE: Elaboración propia

Análisis de varianza para todos los tratamientos

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Número de brotes	21	0,79	0,7	27,94

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,6	6	0,93	8,72	0,0004*
Tratamientos	5,6	6	0,93	8,72	0,0004*
Error	1,5	14	0,11		
Total	7,1	20			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

**Efecto de los tratamientos en la formación de brotes en el subcultivo de yemas apicales
y/o axilares de *Prosopis pallida***

Tratamiento	Variable evaluada
	Brotes (N°)
t1	2,40 b
t2	1,20 a
t3	0,87 a
t4	1,00 a
t5	0,97 a
t6	1,00 a
t7	0,77 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 14

DATOS DEL ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO DE MICROESTACAS

<i>Tratamiento</i>	<i>Porcentaje de enraizamiento (%)</i>			<i>Longitud de raíces (cm)</i>			<i>Número de raíces</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0	0	0	0	0	0
T2				0	0	1	0	0	1
				0	0	1,5	0	0	5
	0	0	40	0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0	0	0,5	0	0	1,2
T3				0	0	1,3	0	0	2
				0	0	1	0	0	3
	0	0	80	0	0	0,7	0	0	4
				0	0	1,5	0	0	2
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0	0	0,9	0	0	2,2
T4				3,5	1,1	4	6	1	1
				3,5	1	3	3	3	3
	60	40	60	3	0	3	2	0	3
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				2,0	0,4	2,0	2,2	0,8	1,4
T5				0,5	0,7	0	2	1	0
				0	0	0	0	0	0
	20	20	0	0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0,1	0,175	0	0,4	0,2	0

Continuación

Tratamiento	Porcentaje de enraizamiento (%)			Longitud de raíces (cm)			Número de raíces		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
				0	0	0,8	0	0	2
T6	0	0	40	0	0	2,5	0	0	2
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0	0	0,66	0	0	0,8
				3	1	5	6	1	6
T7	20	20	20	0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0
Promedio				0,6	0,2	1	1,2	0,2	1,2

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 15

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ENRAIZAMIENTO DE MICROESTACAS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de enraizamiento	18	0,35	0,07	103,02

Análisis de varianza - Porcentaje de enraizamiento					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3666,67	5	733,33	1,27	0,3385 ^{ns}
Hormona	933,33	2	466,67	0,81	0,4687 ^{ns}
Concentración	200	1	200	0,35	0,5672 ^{ns}
Hormona*Concentración	2533,33	2	1266,67	2,19	0,1543 ^{ns}
Error	6933,33	12	577,78		
Total	10600	17			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: *Elaboración propia*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud de raíces	18	0,63	0,48	95,28

Análisis de la Varianza - Longitud de raíces					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24,85	5	4,97	4,14	0,020
Hormona	8,57	2	4,28	3,57	0,061 ^{ns}
Concentración	0,22	1	0,22	0,18	0,679 ^{ns}
Hormona*Concentración	16,06	2	8,03	6,7	0,011 [*]
Error	14,39	12	1,2		
Total	39,24	17			

* = Significativo (p< 0,05) ns = no significativo

FUENTE: *Elaboración propia*

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Número de raíces	18	0,48	0,27	95,34

Análisis de Varianza - Número de raíces					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,52	5	6,3	2,23	0,119 ^{ns}
Hormona	7,17	2	3,59	1,27	0,317 ^{ns}
Concentracion	1,84	1	1,84	0,65	0,436 ^{ns}
Hormona*Concentracion	22,51	2	11,25	3,98	0,047 ^{ns}
Error	33,94	12	2,83		
Total	65,46	17			

FUENTE: Elaboración propia

Efectos de las hormonas AIA, ANA y AIB en el enraizamiento de microestacas de *Prosopis pallida*

Hormona	Variables evaluadas		
	Porcentaje de enraizamiento (%)	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces (cm)
AIA	16,7 a	1,78 a	2,50 a
ANA	20,0 a	0,19 a	0,96 a
AIB	33,3 a	1,49 a	1,83 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

Efectos de la concentración de hormonas AIA, ANA y AIB en el enraizamiento de microestacas de *Prosopis pallida*

Concentración (mg/L)	Variables evaluadas		
	Porcentaje de enraizamiento (%)	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces (cm)
1,0	20,00 a	1,26 a	2,08 a
0,5	26,67 a	1,04 a	1,44 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

Efecto de los tratamientos en el enraizamiento de microestacas de *Prosopis pallida*

Tratamiento	Variables evaluadas					
	Porcentaje de enraizamiento (%)		Longitud de raíces (cm)		Número de raíces (cm)	
t1	0,0	a	0,00	a	0,00	a
t2	13,3	a	0,17	a b	0,40	a
t3	26,7	a	0,30	a b	0,73	a
t4	53,3	a	1,47	b	1,47	a
t5	13,3	a	0,08	a	0,20	a
t6	13,3	a	0,22	a b	0,27	a
t7	20,0	a	0,60	a b	0,87	a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 16

DATOS DEL ENSAYO DE ACLIMATACIÓN

Tipo de sustrato	Número de plántulas aclimatadas		
	R1	R2	R3
Jiffys	9	9	10
Premix	10	10	10

FUENTE: Elaboración propia

Tipo de sustrato	Porcentaje de plántulas aclimatadas		
	R1	R2	R3
Jiffys	90	90	100
Premix	100	100	100

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 17

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE ACLIMATACIÓN

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
Porcentaje de aclimatación	6	0,5	0,38	4,22

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	66,67	1	66,67	4	0,1161 ^{ns}
Sustrato	66,67	1	66,67	4	0,1161 ^{ns}
Error	66,67	4	16,67		
Total	133,33	5			

* = Significativo ($p < 0,05$) ns = no significativo

FUENTE: Elaboración propia

Efecto del tipo de sustrato en la aclimatación de plántulas de *Prosopis pallida*

<i>Sustrato</i>	<i>Porcentaje de aclimatación</i>
Jiffys	93,33 a
Premix	100 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos aplicando la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 18

FICHA TÉCNICA SUSTRATO PREMIX #8



FICHA TECNICA

1.0 NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO:

Producto final: SUSTRATO PREMIX #8

1.1. Identificación del fabricante:

Nombre: SUNGRO HORTICULTURE INC.

Dirección: 15831 N.E. 8TH Street, Bellevue, WA 98008

1.2. Identificación de la empresa importadora:

Nombre: MARUPLAST INTERNACIONAL EIRL

Dirección: Av. Primavera 120 Of. B -404 Surco, Lima - Perú

2.0 INFORMACIÓN SOBRE EL PRINCIPAL COMPONENTE DEL PRODUCTO

Ingredientes:	
Fine Canadian Sphagnum peat moss	
Fine Vermiculite and Perlite	
Dolomite	
Gypsum	
Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients	
Proprietary wetting agent	

Typical Extractable Nutrient Range *	
pH	5.0 - 5.5
Ec (mmhos)/cm	0.3 - .75
Nitrate Nitrogen, NO ₃ -N (ppm)	5 - 40
Ammonium Nitrogen, NH ₄ - N (ppm)	2 - 20
Phosphorus, P (ppm)	5 - 25
Potassium, K (ppm)	25 - 100
Calcium, Ca (ppm)	50 - 190
Magnesium, Mg (ppm)	30 - 100
Sulfur, S (ppm)	40 - 180
Manganese, Mn (ppm)	.3 - 1.5
Iron, Fe (ppm)	0.1 - 1.0
Copper, Cu (ppm)	.005 - .15
Boron, B (ppm)	.05 - 0.3
Zinc, Zn (ppm)	.03 - .5
Molybdenum, Mo (ppm)	.005 - .15

* Saturated extract procedure (two weeks after production)

Physical Properties

Tests	Standard
Bulk Density	7 - 10 lbs./M ³
Moisture Percentage	45 - 55 %
Water-holding capacity	50 - 70% by volume
Air Capacity	8 - 20% by volume

Uses:
Bedding Plants
Vegetables
Tobacco

Available:
Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet
60 cu ft. totes and bulk
Compressed - 3.8 cu.ft. bales, 30/pallet
55.5 cu ft. bales, 2 per pallet

Average Yield:
Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively
Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively

Average Shipping Weight
3.8 cu ft. - 48-80 lbs.
55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs
2.8 cu ft. = 25-40 lbs
60 cu ft. = 500-600 lbs

Testing Method
A.S.T.M.D 2978-90
Percent based on weight to weight basis
Values at container (8 1/2" square pot) capacity of media
Values at container (5 1/2" square pot) capacity of media

Maruplast Internacional EIRL.

FUENTE: Maruplast (www.maruplast.com)

ANEXO 19

FICHA TÉCNICA PASTILLAS JIFFYS #30



FICHA TECNICA

1.0 NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO:

Producto final: JIFFY-7 FORESTRY PEAT PELLET - CERTIFICATE OF ANALYSIS

1.1. Identificación del fabricante:

Nombre: JIFFY PRODUCTS (N. B.) LTD.

Dirección: 125 INDUSTRIAL PARK, PO BOX 2004 SHIPPAGAN, NB E8S 3H1 CANADA

1.2. Identificación de la empresa importadora:

Nombre: MARUPLAST INTERNACIONAL EIRL

Dirección: Av. Primavera 120 Of. B - 404 Surco, Lima - Perú

2.0 INFORMACIÓN Y CARACTERÍSTICA DEL PRODUCTO

Raw Materials Used

1. Canadian Sphagnum Peat Moss Approx. 97%
The Sphagnum peat moss is sun & wind dried on the field and vacuum harvested. The average humidity is about 50% at this point.
All peat suppliers have their field inspected by the Canadian Food Inspection Agency. It is further processed in a flash drier at high temperature above 110 C at the factory immediately before making the pellets. The process takes place in about 2 to 3 minutes depending on the conditions of the peat. The humidity at this point is dropped to about 18%.
2. Dolomite Lime Up to 2 %
pH 4.9 +/- 0.5
3. Nutrient Charge From Fertilizer
Conductivity (EC) 0.5 +/- 0.3 mhos
N: 0.12%
P: 0.06%
K: 0.06%
Plus trace of microelements
Methodology for pH and Ec
1. Expand pellets fully and allow total saturation.
2. Let stand for 24 hours.
3. Squeeze liquid (water) out
4. Measure pH and Ec
4. Net (LDPE) Approx. 1 %
Organic Content 94 to 98 %
Water Retention Capacity 500 – 700 % of dry weight
Maximum Humidity Level 15 – 23%
Bulk Density Approx. 0.15 gram/cc (Compressed and dried based)
Or 150 kg/m³

ATENCIÓN: Esta información se suministra de buena fe, es precisa y confiable según nuestro mejor conocimiento, pero debe considerarse sólo como una guía en la selección del producto y no como garantía de funcionalidad. MARUPLAST INTERNACIONAL E.I.R.L. - declara toda responsabilidad por resultados obtenidos mediante el uso de esta información.

Maruplast Internacional EIRL

FUENTE: Maruplast (www.maruplast.com)