

EFFECTO DEL ÁCIDO INDOLACÉTICO Y BENCILADENINA EN ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *PROSOPIS PALLIDA* KUNTH

Reynán CÓNDOR ALARCÓN¹,
Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA¹,
Paula GARCÍA GODO ALCÁZAR¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas.
Área de investigación de biotecnología y recursos genéticos
Línea de investigación de biotecnología agrícola y de alimentos
Reynan.condor@unsch.edu.pe

RESUMEN

El algarrobo es una especie importante para los ecosistemas y la actividad humana, por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar la mejor combinación de tres concentraciones de ácido indolacético y benciladenina para inducir organogénesis y embriogénesis somática, que permitan la regeneración *in vitro* de *Prosopis pallida* Kunth. Las semillas de algarrobo presentan un poder germinativo de 79 a 83% en condiciones *in vitro*. Los medios de cultivo MS suplementados con AIA y BAP inducen la formación de callos friables de color marrón y blanco. Los callos inducidos permitieron el desarrollo de brotes adventicios, raíces y embriones somáticos. Se concluye que las semillas son adecuadas para el establecimiento *in vitro* por presentar una cascara resistente al tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 2.5% y alcohol etílico al 70%. El porcentaje de germinación logrado es mayor al 78%, las plántulas desarrolladas en MS son vigorosas. Los callos inhiben el desarrollo de brotes de tejido nodal con meristemo axilar. Luego del desarrollo de callos, en los tratamientos T2 y T3 se originaron tres brotes adventicios en promedio. Se identificó regiones de callos embriogénicos con desarrollo embriones somáticos. El enraizamiento de plántulas fue del 63.3% en medio MS.

Palabras clave: Prosopis, organogénesis, embriogénesis.

ABSTRACT

Algarrobo is an important species for ecosystems and human activity; therefore, the objective of the research was to determine the best combination of three concentrations of indolacetic acid and benzyladenine to induce organogenesis and somatic embryogenesis, which allow *in vitro* regeneration of *Prosopis pallida* Kunth. Algarrobo seeds show a germination power of 79 to 83% under *in vitro* conditions. MS culture media supplemented with AIA and BAP induced the formation of friable brown and white callus. The induced callus allowed the development of adventitious shoots, roots and somatic embryos. It is concluded that the seeds are suitable for *in vitro* establishment because they have a shell resistant to disinfection treatment with 2.5% sodium hypochlorite and 70% ethyl alcohol. The germination percentage achieved is greater than 78%, the seedlings developed in MS are vigorous. Callus inhibits the development of nodal tissue shoots with axillary meristem. After callus development, an average of three adventitious shoots originated in treatments T2 and T3. Embryogenic callus regions with somatic embryo development were identified. Seedling rooting was 63.3% in MS medium.

Keywords: Prosopis, organogenesis, embryogenesis.

I. INTRODUCCIÓN

Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth “algarrobo” es una especie arbórea que pertenece a la familia Fabacea. Esta especie tiene importancia económica y forestal, se caracteriza por su alta tolerancia a la sequía, rápido crecimiento con producción significativa de biomasa, y sustenta una intensiva crianza de ganados, así como una industria artesanal de la algarrobina y la harina de algarrobo. Es así que, en la actualidad los bosques naturales de algarrobo están desapareciendo por la deforestación, haciendo que estos algarrobales se agrupen en

pequeños bosques-relictos (Minchala-Patiño et al., 2014). Tal es así que esta especie ha sido categorizada en peligro (EN) de acuerdo a la Resolución Ministerial N° 0505-2016-MINAGRI. En consecuencia, es importante que se realicen proyectos de reforestación de zonas desérticas con esta especie, con el objetivo de conservar los algarrobales en esta región.

En los programas de reforestación con algarrobo se emplean semillas, pero la variación genética producida por la meiosis, no puede mantener genotipos con características sobresalientes; lo que ha genera-

do la necesidad de realizar la propagación vegetativa para clonar plantas élites; para ello, se enraízan estacas de algarrobo, pero se ha considerado que nos es viable si se requiere propagar plantas a gran escala y no permiten satisfacer las demandas de los programas de reforestación; por ello, es imperativo emplear métodos biotecnológicos como es el cultivo de tejidos vegetales, para regenerar plántulas *in vitro* de algarrobo, libres de microorganismos patógenos, a gran escala y en espacios reducidos.

El cultivo *in vitro* se aplica en la clonación, conservación y manipulación de tejido vegetal (Pérez et al., 1999). Permitiendo reducir las dificultades en la propagación de plantas por métodos tradicionales (Marinucci et al., 2004). Uno de los métodos empleados para cumplir estos objetivos es la morfogénesis, la cual permite obtener plántulas completas a partir de tejido vegetal que se desarrolla en un medio de cultivo en condiciones *in vitro*. Para que un tejido vegetal origine plántulas debe pasar por un proceso de calogénesis, y luego por organogénesis o embriogénesis somática (Marinucci et al., 2004).

La fitohormona es un compuesto producido por la planta, estos compuestos ejercen su actividad a bajas concentraciones. A nivel celular ejercen cambios en el desarrollo de tejidos vegetales permitiendo su control. Las bases del concepto de hormonas vegetales como sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en pequeñas concentraciones se establecieron a finales del siglo XIX (Darwin y Darwin, 1880; von Sachs, 1887). En la actualidad, se definen como sustancias naturales que tienen actividad a bajas concentraciones, y generalmente son capaces de translocarse dentro de la planta y se unen a una proteína receptora (Frébort et al., 2011; Steven et al., 2019).

Actualmente no se conocen los efectos de diferentes concentraciones de fitohormonas como el ácido indolacético “AIA” (auxina) y la benciladenina “BA” (citocinina), en la organogénesis y embriogénesis somática de tejido somático para el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Prosopis pallida* (Humb.& Bonpl. ex Willd.) Kunth “algarrobo”.

La organogénesis consiste en la formación de novo de órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes cultivados *in vitro* (Pérez et al., 1999; Rivera, 2018a). Por lo tanto, por medio de la organogénesis se obtienen grandes cantidades de plantas. Lo cual constituye en una alternativa para programas de mejoramiento genético, por proveer de material genético selecto. Además, se producen brotes adventicios adecuados que son empleados en programas de criopreservación (Bustamante et al., 2022).

La embriogénesis somática se define como la capacidad de algunas células somáticas vegetales para originar embriones somáticos, los embriones somáticos presentan la capacidad de germinar y luego originar individuos con el fenotipo de la planta madre del cual se obtuvo la célula inicial (Pérez et al., 1999).

Por lo mencionado, el objetivo de este trabajo consistió en determinar la mejor combinación de tres concentraciones de ácido indolacético y benciladenina para inducir organogénesis y embriogénesis somática, que permitan la regeneración *in vitro* de *Prosopis pallida*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron semillas de árboles de *Prosopis pallida* con mejores características agronómicas, en la localidad de Compañía del distrito de Pacaycasa, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Las semillas fueron empaquetadas en bolsas de papel adecuadamente rotulados, y fueron transportados al laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se realizó este trabajo.

Desinfección y germinación *in vitro*

Un total de 300 semillas de algarrobo fueron lavadas con agua y jabón por un periodo de 10 minutos, luego se enjuagó con agua destilada estéril y fueron trasladados a la cámara de flujo laminar. Las semillas se incorporaron en frascos conteniendo concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio (2.5, 3.0 y 3.5 %), los cuales permanecieron por un periodo de 10 minutos con agitación (cada 2 min), luego las semillas fueron trasladadas a frascos estériles para ser enjuagadas 3 veces con agua destilada. Finalizado el proceso de enjuague, las semillas se sumergieron en alcohol al 70% por un periodo de 20 segundos, para luego proceder a enjuagar con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron sembradas en frascos conteniendo medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) y fueron trasladados al cuarto de crecimiento, con un fotoperiodo de 16 horas y una temperatura de 25 +/- 2 °C. Transcurrido diez días se evaluaron los porcentajes de contaminación y germinación.

Tabla 1.

Conformación de tratamientos para desinfección y germinación de semillas de algarrobo.

Tratamiento	Hipoclorito de sodio	OH (%)
Td1	2.5% x 10 min	70 x 20 s
Td2	3.0% x 10 min	70 x 20 s
Td3	3.5% x 10 min	70 x 20 s

min: minutos
s: segundos

Inducción de callos

Para la inducción de callos se probaron tres tipos de explantes procedentes de plántulas *in vitro*. Estos explantes fueron segmentos de tallos, cotiledones y folíolos. Los cuales fueron sembrados en placas de Petri de 70 mm de diámetro conteniendo 15 ml de medio basal MS con 3% de sacarosa, 0,65% de agar, suplementado con combinaciones de ácido indolacético y benciladenina (tabla 2). El pH se ajustó a 6 con hidróxido de sodio 1N y ácido clorhídrico 1N, y los medios de cultivo fueron esterilizados. Las condiciones de cultivo fueron 25 +/- 2 °C y 16 horas de luz (Marinucci et al., 2004). A los 45 días de iniciado el cultivo, los explantes con callos fueron subcultivados al medio basal MS sin reguladores de crecimiento y en las mismas condiciones ambienta-

les de la etapa anterior, se evaluaron la regeneración de brotes adventicios y formación de embriones somáticos. Cada siete días, se evaluó el porcentaje de supervivencia de los explantes y las diferentes respuestas morfogénicas (formación de callo, raíces, brotes adventicios y embriones somáticos). A los 60 días de cultivo se evaluaron el área de los callos, el porcentaje de explantes con raíz, con brotes adventicios y la formación de embriones somáticos por callo.

Para determinar la mejor combinación de concentraciones de ácido indolacético y benciladenina para la organogénesis y embriogénesis somática de explantes, se empleó el Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con arreglo factorial 3². En el diseño experimental se emplearon como factores el ácido indolacético y la benciladenina, cada una con dos concentraciones diferentes. La combinación de los niveles de los factores permitió establecer nueve tratamientos, y se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Durante el desarrollo del experimento se obtuvieron datos de las variables dependientes de naturaleza cuantitativa como: diámetro de tallos (mm), área de los callos (mm²), número de los brotes adventicios por callos (mm) y formación de raíces en callos y explantes. En este estudio se realizaron dos experimentos y los tratamientos se conformaron tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Conformación de los tratamientos con tres concentraciones de AIA y BAP.

Experimento A				Experimento B			
Factor A	Factor B	Tratamientos	Repeticiones	Factor A	Factor B	Tratamientos	Repeticiones
AIA (ppm)	BAP (ppm)			AIA (ppm)	BAP (ppm)		
0	0	Ta1	X3	2	0.5	T1	X3
0	1	Ta2	X3	2	1	T2	X3
0	1.5	Ta3	X3	2	1.5	T3	X3
2	0	Ta4	X3	2.5	0.5	T4	X3
2	1	Ta5	X3	2.5	1	T5	X3
2	1.5	Ta6	X3	2.5	1.5	T6	X3
3	0	Ta7	X3	3	0.5	T7	X3
3	1	Ta8	X3	3	1	T8	X3
3	1.5	Ta9	X3	3	1.5	T9	X3

Análisis de los datos

Para analizar la variación de los datos generados en este estudio se empleó el análisis de varianza (ANVA) con arreglo factorial 3^2 y las comparaciones múltiples de promedios se realizaron con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El modelo lineal empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde

μ : la media general.

α_i : Efecto del ácido indolacético en el i-ésimo nivel.

β_j : Efecto de la benciladenina en el j-ésimo nivel.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto de la interacción en el i-ésimo nivel y j-ésimo nivel.

ε_{ijk} : Error experimental.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El establecimiento *in vitro* de algarrobo se logró empleando semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio y alcohol etílico (ver tabla 1), en los tres tratamientos evaluados no se registró semillas contaminadas. Por lo tanto, se recomienda el tratamiento con menor concentración de hipoclorito de sodio (2.5%). Las semillas de algarrobo poseen fuertes cubiertas seminales que permitieron sumergirlos en soluciones de hipoclorito de sodio con concentraciones de 2.5 a 3.5% por un periodo de 10 minutos, lo cual permitió la desinfección de todas las semillas que fueron sembradas en medios de cultivo conteniendo sales de MS. Rivera (2018b) evaluó la desinfección de semillas, empleando tratamientos con concentraciones de hipoclorito de sodio entre 1.2 a 1.8%, con tiempos de inmersión de 15 a 25 minutos; finalmente reportaron contaminación de 3.3 a 13.3%, y no evidenciaron diferencia significativa entre los tratamientos de desinfección. Es necesario precisar que en el presente trabajo se empleó mayores concentraciones de hipoclorito de sodio (2.5, 3.0 y 3.5 %) con menor tiempo de inmersión (10 minutos).

Tabla 3.

Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth.

Tratamiento	N° semillas por frasco	Repeticiones	% germinación ($\bar{x}$)
Td1	20	5	79 ^a
Td2	20	5	83 ^a
Td3	20	5	77 ^a

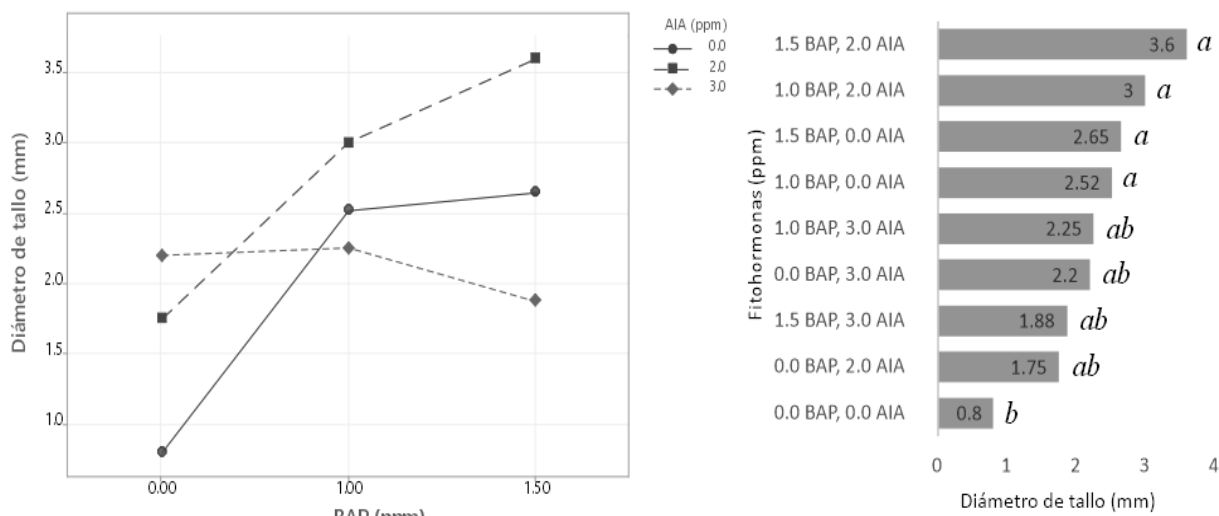
Prueba Tukey ($\alpha=0.05$), letras iguales no difieren significativamente.

En la tabla 3 se observa el porcentaje de germinación de semillas desinfectadas y sembradas en medio MS. En los tratamientos Td1, Td2 y Td3 los porcentajes de germinación fueron 79%, 83% y 77% respectivamente, los cuales no difieren significativamente. Rivera (2018b) obtuvo porcentajes de germinación y establecimiento de plántulas en condiciones *in vitro* de 23.3 % a 50 %, y afirma que a mayor concentración de hipoclorito de sodio menor contaminación de semillas, pero al estar más tiempo sumergidos con mayores concentraciones de hipoclorito de sodio el porcentaje de germinación y el establecimiento disminuye. En comparación, en el presente trabajo se emplearon mayores concentra-

ciones de hipoclorito de sodio, pero el tiempo de inmersión de las semillas fue menor (10 minutos), lo cual permitió obtener mayores porcentajes de germinación. También se debe considerar el genotipo y tiempo de almacenamiento de las semillas, porque estos factores influyen en el poder germinativo. En otra investigación realizada por Minchala Patiño et al. (2013) mencionan que han logrado avances significativos en germinación de semillas sembradas en medio MS con diferentes concentraciones de ácido giberélico, reportando la germinación del 100% de semillas luego de la escarificación a temperaturas de 50 a 70 °C o usando HCl 36% por 5 minutos.

Figura 1.

Efecto de la interacción entre niveles de AIA y BAP en el diámetro de tallo en contacto con el medido de cultivo con diferentes concentraciones de fitohormonas.



Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras iguales no difieren significativamente.

En la figura 1 se muestra los resultados del experimento A, y se evidencia que el efecto de la interacción fue significativo, por lo tanto, se puede afirmar que en el tratamiento sin fitohormonas Ta1 (0.0 BAP y 0.0 AIA) el diámetro de tallo expuesto al medio de cultivo durante 7 días presentó en promedio de 0.8 mm, siendo significativamente menor a los tallos expuestos a medios de cultivo con los tratamientos Ta2 (1.0 BAP, 0.0 AIA), Ta3 (1.5 BAP, 0.0 AIA), Ta5 (1.0 BAP, 2.0 AIA) y Ta6 (1.5 BAP, 2.0 AIA). Es importante puntualizar que los tallos expuestos al medio sin fitohormonas no presentan evidencias de formación de callos. Sin embargo, los tallos expuestos a medios que presentaban al menos una concentración de fitohormonas desarrollaron callos en diferentes grados, pero no se encontró diferencia significativa entre diámetros de tallos con tejidos callosos. En la figura 2A se observa que un explante nodal conteniendo un meristemo axilar en medio MS sin fitohormonas logra desarrollar un brote con dos entrenudos, sin embargo, en la figura 2B el explante nodal a pesar de tener un meristemo axilar, no desarrolla brote, debido al efecto del AIA en el medio, lo que produce la formación de callo, y por lo tanto la dediferenciación del tejido vegetal alrededor de la región meristemática. No solo la

incorporación de fitohormonas (AIA y BAP) induce el desarrollo de tejido callosos. Stambouli et al. (2012) reportaron que en un medio de cultivo con altas concentraciones de calcio y sodio se logra reducir el desarrollo de brotes y foliolos en *Prosopis farcta*. Minchala-Patiño et al. (2014b) obtuvo ápices con mayor elongación al emplear KIN 0.2 mg/L y las combinaciones ANA 0.2 con KIN 0.2 mg/L y AIA 0.02 con AG3 0.02 mg/L.

Figura 2.

Desarrollo del brote a partir de meristemo axilar de explante nodal (tallo) en medio MS sin fitohormonas (A) y en el medio MS con 3.0 AIA y 0.0 BAP (Ta7) (B).

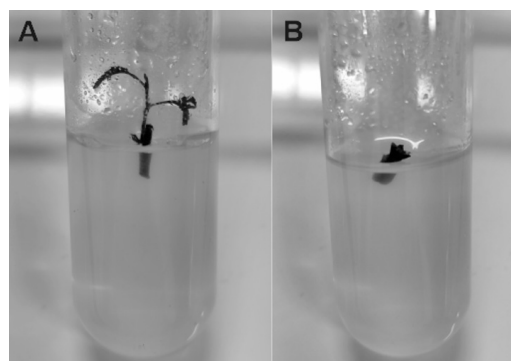
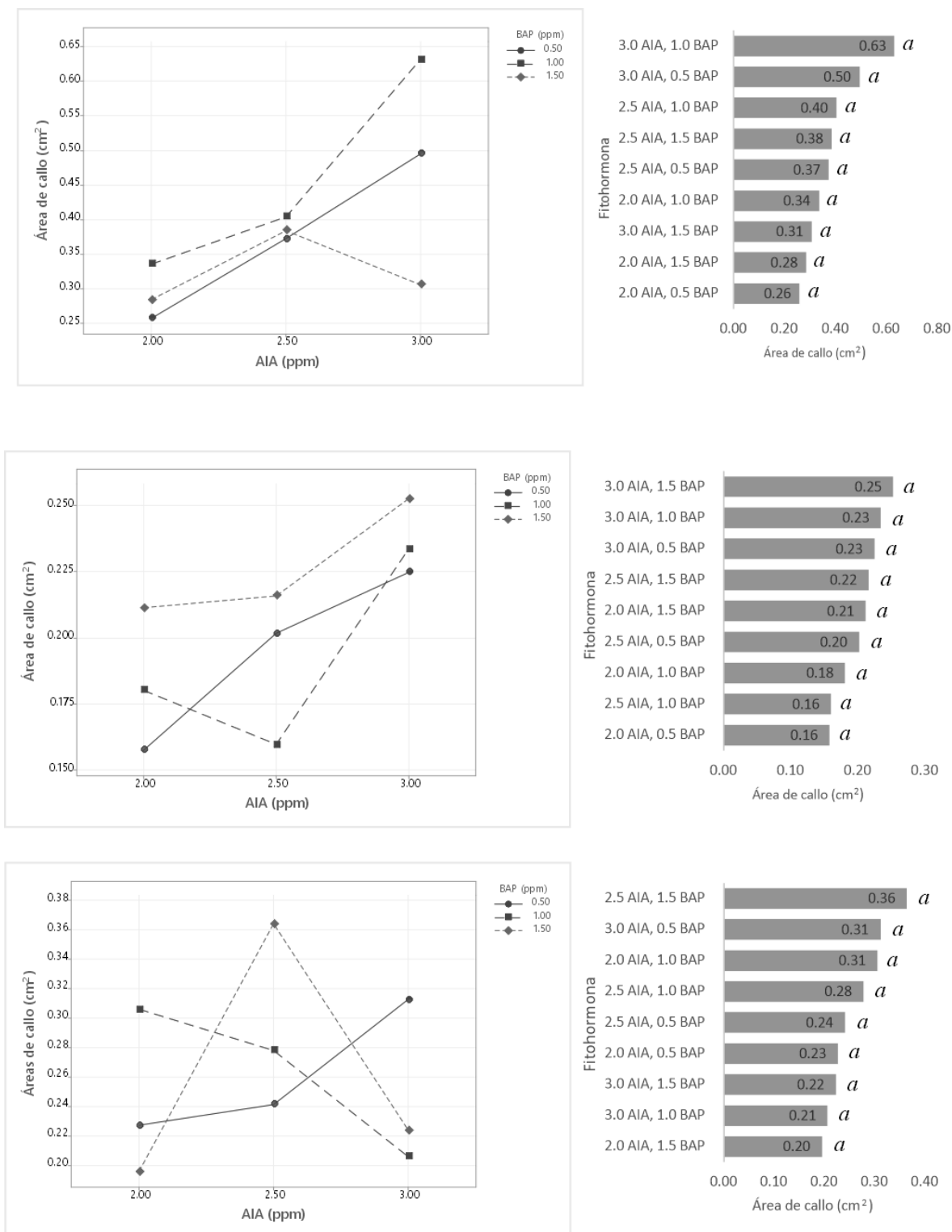


Figura 3.

Gráfica de interacciones entre los niveles de AIA y BAP para el desarrollo de callos a partir de cotiledones (A), folíolos (B) y tallos (C).



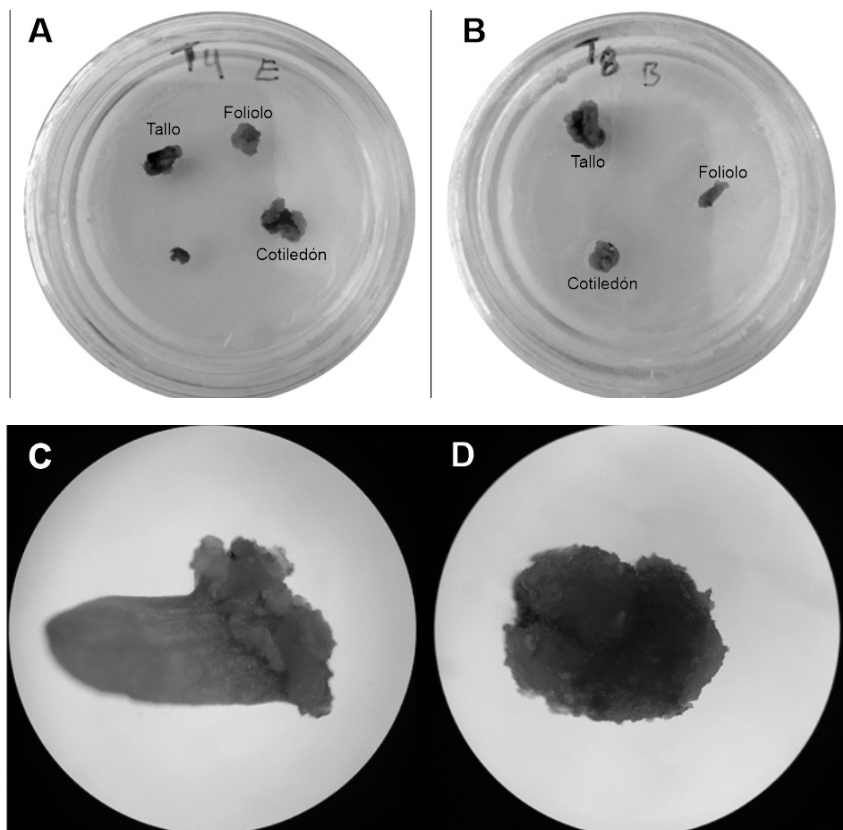
Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras iguales no difieren significativamente.

Como resultado del análisis de varianza, se puede evidenciar que la interacción entre las fitohormonas AIA y AIB en el experimento B no fueron significativa tanto para el desarrollo de callos a partir de explantes procedentes de cotiledones, folíolos y ta-

llos (figura 3). Es decir que el efecto de los diferentes tratamientos constituidos por las combinaciones de las concentraciones de AIA y BAP no difieren significativamente con respecto al área de los callos desarrolladas por cada explante.

Figura 4.

Callos obtenidos a partir de tallos, cotiledones y folíolos (a y b). Desarrollo de callos a partir de folíolo (c) y tallo (d) (60X).

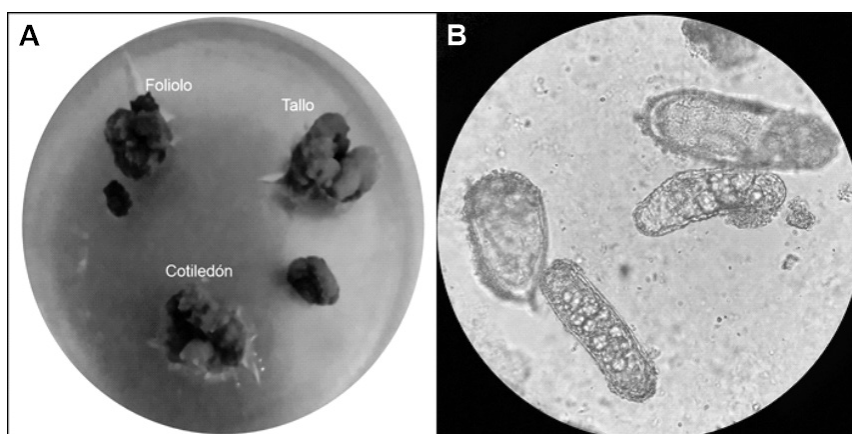


En la figura 4, en A y B se muestra el desarrollo de callos a partir de tallos, cotiledones y folíolos. En C se aprecia el desarrollo de callo en el lugar de corte de un folíolo. En D se observa el desarrollo de callo a partir de un fragmento de tallo. Resultados similares fueron reportados por López-Ibarra (2019b), quien logró inducir callos *in vitro* a partir de explantes de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.) procedentes de cotiledones juntamente con el eje embrionario,

que fueron cultivados en medio MS con 6.79 μM 2,4D y 6.66 μM BAP, siendo este tratamiento en el que se logró una cantidad significativamente de callos. En comparación a nuestros resultados, se observó que los explantes de cotiledones desarrollaron callos *in vitro*, evidenciado la proliferación celular alrededor del tejido de cotiledón; transcurrido 30 días, el tejido calloso mostró células blanquecinas a marrones con ausencia de clorofila.

Figura 5.

En A se observa callos de 40 días, en medio MS con 3 ppm de AIA y 1.5 ppm de BAP (50X). En B se observa células con inclusiones (100X).



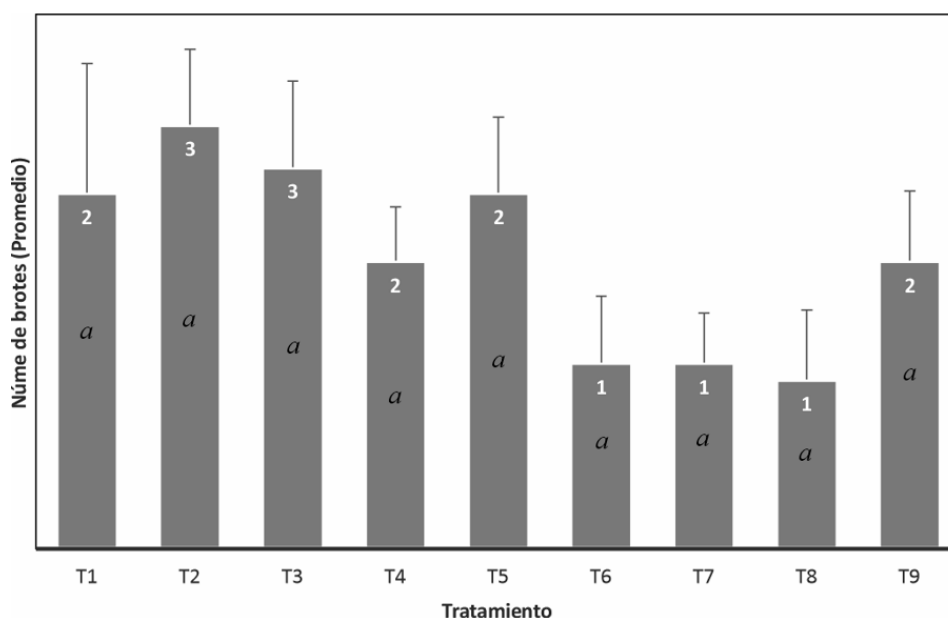
En la figura 5A se observa el desarrollo de callos de explantes procedentes de cotiledones, tallos y folíolos de plántulas establecidas *in vitro*. En el medio MS con 3 ppm de AIA y 1.5 ppm de BAP se logró que todo los explantes desarrollen tejido calloso en diferentes grados. Transcurrido 40 días, la mayoría de los callos estuvieron conformados por células que carecen de clorofila, por lo tanto, la coloración que adquirieron es marrón y blanquecino. También se evidencia que los callos suelen tener regiones compactas y friables. Las células de las regiones friables se logran separar fácilmente y tienen una coloración blanquecina. Con respecto a los callos de color marrón fueron reportados por Adreina et al. (2018) al inducir callos en explantes de *Solanum lycopersicum* L., logrando callos que tenían una coloración marrón claro y con una apariencia com-

pacta en la base. En la figura 5B, se observa células procedentes de tejido calloso friable, en ella se puede identificar células alargadas con inclusiones citoplasmáticas, además se observa que las células están en proceso de división celular.

Stambouli et al. (2012) desarrollaron medios a partir del medio Gamborg, con diferentes concentraciones de iones Na^+ y Ca^{++} . Lograron el desarrollo *in vitro* de plantas de *Prosopis farcta* induciendo el desarrollo de yemas adventicias, ramificaciones y callos, lo cual permite multiplicar a gran escala esta especie. Demostraron que la adición de Na^+ (0.1, 50 y 50 mM) y/o Ca^{++} (0.1, 10, 20 y 50) mM en el medio de cultivo *in vitro*, permite la formación de callos y yemas adventicias. Lo que permite reducir el uso de hormonas de crecimiento.

Figura 6.

Número de brotes adventicios de acuerdo a la combinación de ácido indolacético y benciladenina (tratamientos) en explantes de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth.



Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras iguales no difieren significativamente.

En la figura 6 se muestra el número de brotes adventicios desarrollados a partir de callos que se produjeron en los tratamientos que fueron conformados por la combinación de 2.0, 2.5 y 3.0 ppm de AIA y 0.5, 1.0 y 1.5 ppm de BAP (experimento B). En los tratamientos T2 (2 AIA y 1.0 BAP) y T3 (2 AIA y 1.5 BAP) se reporta en promedio tres brotes adventicios, seguido por los tratamientos T1, T4, T5

y T9 con dos brotes adventicios, finalmente en los tratamientos T6, T7 y T8 se produjeron un brote en promedio. En la figura 7: A. se muestra un explante nodal con desarrollo de callo en las regiones de corte. B, se observa el desarrollo de brotes adventicios originados a partir de callos. En C y D, se evidencia que los brotes se originan de tejido calloso.

Figura 7.

Formación de brotes adventicios a partir de callos. En A se observa la formación de callos en medio MS con 2.5 AIA y 0.5 BAP (T4) (20X). B. Formación de brotes adventicios. C y D. Brotes adventicios originados a partir de callos.

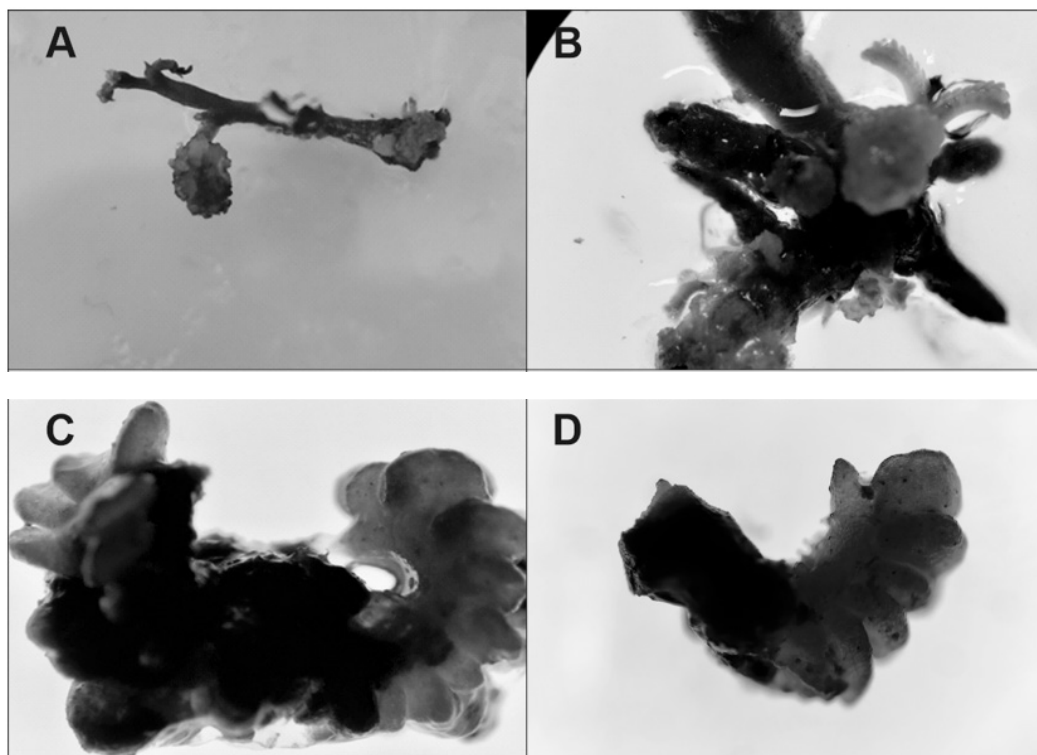
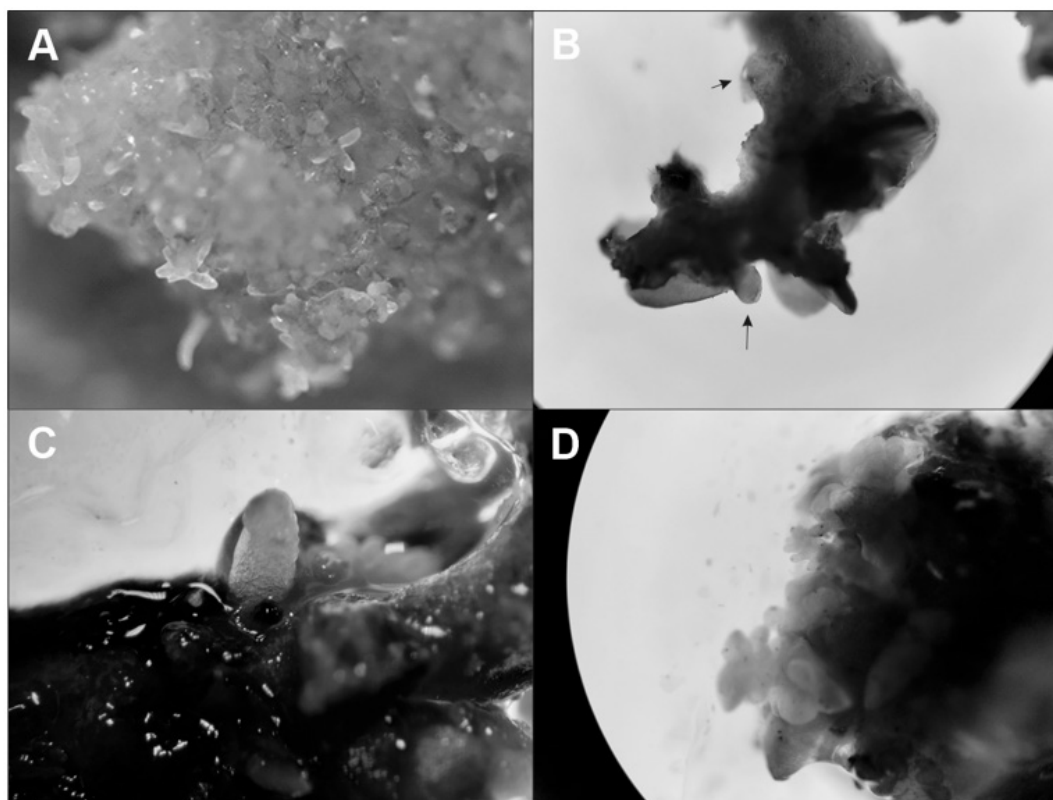


Figura 8.

Se observa el desarrollo de embriones somáticos en el medio MS con 3.0 AIA y 0.5 BAP (T7) en callos de *Prosopis pallida* Kunth en condiciones *in vitro*.



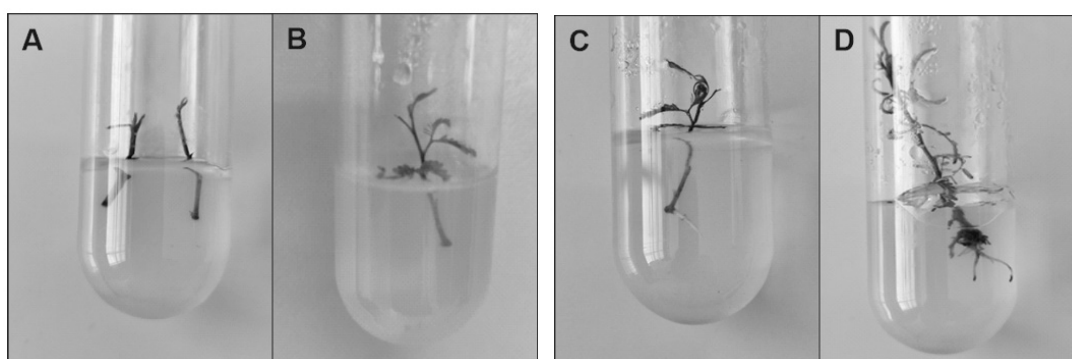
En la Figura 8, se muestra el desarrollo de embriones somáticos de callos de *Prosopis pallida* obtenidos a partir del cultivo de explantes nodales en medio MS con 3.0 AIA y 0.5 BAP (T7). La presencia de embriones somáticos es abundante, por lo que no fue posible su conteo. Los embriones somáticos se caracterizan por ser de color blanco. Cabe precisar que se puede visualizar estos embriones en casi el 60% de callos producidos al transcurrir aproximadamente 90 días, los callos que originaron embriones somáticos se caracterizan por ser friables, de color blanco y marrón. Estos embriones se desprenden fácilmente del tejido calloso friable. En la Figura 8A se observa una región de callo embriogénico, se caracteriza por ser friable y de color blanquecino, en ella se desarrolla la etapa globular del embrión somático. 8B se aprecia el desarrollo del embrión en la

etapa corazón de color verde claro. 11C el embrión alcanza la etapa de torpedo de color verde. Mientras que en la figura 11D ya es posible distinguir la etapa de desarrollo cotiledonar.

Para evaluar el enraizamiento de plántulas *in vitro* de algarrobo, los explantes fueron sembrados en medio MS con agar, y se observó un enraizamiento del 63.3 % de los explantes (ver figura 9). Se desarrollaron callos pequeños (aproximadamente de 3 mm) en aproximadamente 40 días, pero no afecta el desarrollo de raíces. Las plántulas que no logran enraizar tienden a perder hojas y son de lento desarrollo en comparación a las plántulas enraizadas. Cabe recalcar que en medios que contienen AIA y BA no se observó enraizamiento de los explantes, debido al desarrollo de callos.

Figura 9.

Desarrollo de raíces a partir de explantes con meristemo axilar en medio base MS.

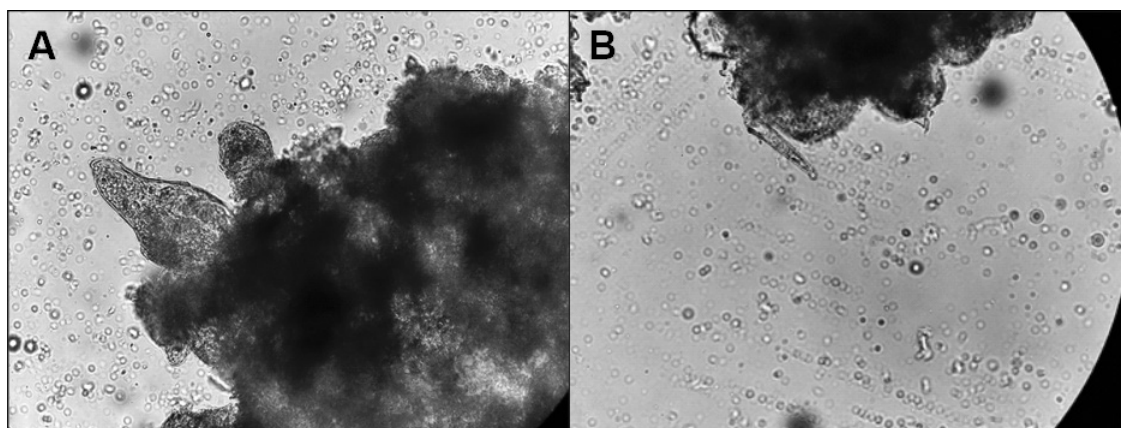


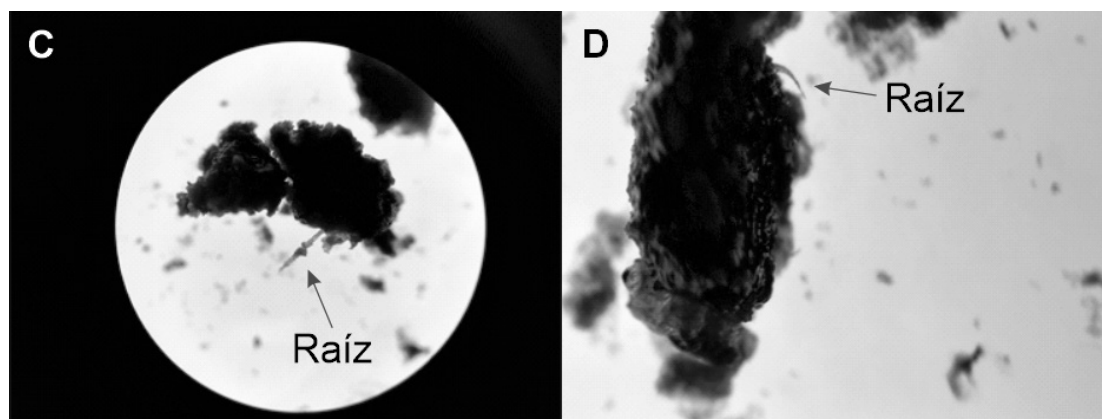
En los callos se observaron raíces adventicias, tal como se puede apreciar en la figura 10. En las figuras 10A y 10B se observa el desarrollo de cúmulos celulares al estar en contacto con el medio base MS,

en estos callos un grupo de células se diferencian en raicillas de color blanco tal como se aprecia en las figuras 10C y 10D.

Figura 10.

Formación de raíces en callos de algarrobo subcultivados en medio MS (A:60X, B50:X, C y D :40X).





Las conclusiones del trabajo de investigación son las siguientes:

- Se logró desinfectar la totalidad de semillas empleando 2.5% de hipoclorito de sodio por un periodo de 10 minutos y 70% de alcohol etílico por 20 segundos.
- Se logró un rango de germinación entre 79 a 83%, con desarrollo vigoroso de plántulas en condiciones *in vitro*.
- Los segmentos nodales de tallo con un meristemo axilar cultivados en medio base MS sin fitohormonas desarrollan brotes, sin formación de callos. El desarrollo de callos de segmentos de tallos se originó en los medios que presentaban al menos una concentración de fitohormona (AIA y/o BAP). La totalidad de callos presentaron regiones de callos friables de color marrón y blanco. Los explantes con desarrollo de callo inhiben el desarrollo de los meristemas axilares.
- A partir del desarrollo de los callos se originaron brotes adventicios en las zonas próximas a los meristemas axilares. En los tratamientos T2 y T3 se lograron obtener 3 brotes adventicios en promedio. No se evidenció diferencia significativa entre los tratamientos para producir brotes adventicios.
- Luego del sub cultivo de los callos en medio MS, se logró observar el desarrollo de múltiples embriones somáticos, sobre todo en las regiones de callos embriogénicos de color marrón y blanco. Estos embriones se caracterizan por ser verdes claros y se desprenden fácilmente del tejido calloso.
- Los explantes nodales cultivados en medio base MS presentaron un porcentaje de enraizamiento del 63.3 %.

IV. AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por brindarnos su infraestructura y equipamiento.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreina, Y., Vargas, T., & Blanco, H. (2018). Estudio de la micropropagación de *Solanum lycopersicum* L considerando el análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos [Universidad Central de Venezuela]. In *saber.ucv.ve*. <http://saber.ucv.ve/handle/10872/19670>
- Bustamante, K., Rocha, S. P., Sharry, S. E., Guerra, M. P., & Niella, F. O. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 121(Especial 2), 102–102. <https://doi.org/10.24215/16699513E102>
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERR004>
- López-Ibarra, A. (2019). *Embriogénesis somática e inducción de callo in vitro en especies fabáceas nativas del estado de Nuevo León*. [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN]. <http://eprints.uanl.mx/18340/>
- Marinucci, L., Ruscitti, M., & Abedini, W. (2004). Morfogénesis in vitro de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 105(2), 27–36.

- Minchala-Patiño, J., Poma-Angamarca, R., Muñoz-Chamba, L., Yaguana-Arévalo, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán, V., Rojas-Idrogo, C., & Delgado-Paredes, G. (2014). Propagación in vitro de *Prosopis limensis* Benth. in Hook.(Fabaceae-Mimosoideae). *Quebracho (Santiago Del Estero)*, 22(1851–3026).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497.
- Pérez, E. M., Ramírez, R., Núñez, H. G., & Ochoa, N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales* (U. A. de A. Calientes, Ed.; Universida).
- R CoreTeam. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rivera, J. (2018a). *Micropropagación de Prosopis pallida* (Humb. & Bompl. Ex Wild.) Kunth a partir de yemas apicales. UNALM.
- Rivera, J. (2018b). *Micropropagación de Prosopis pallida* (Humb. & Bompl. Ex Wild.) Kunth a partir de yemas apicales [UNALM]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3515>
- Steven, J., Cortes, A., Godoy Jovanna, A., Cortés, A., David, J., Mora, S., & Melida, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109–129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>