

## Propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados

Jenny E Núñez<sup>1,2</sup>, Elisa Quiala<sup>3</sup>, Manuel de Feria<sup>2</sup>, Saúl Mestanza<sup>3</sup>, Silvana Teanga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana sur km 11/2. Riobamba. Chimborazo. Ecuador. CP 060155. e-mail: jenuñez@esPOCH.edu.ec, jennyelizabethn@yahoo.com

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Av Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas. Quito. Pichincha. Ecuador. CP 170517.

### RESUMEN

El guarango o tara [*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz] es un árbol originario de los Andes, con gran importancia económica para los programas de reforestación. El objetivo de este trabajo fue propagar *in vitro* esta especie a partir de yemas axilares obtenidas de árboles plus seleccionados por sus características morfo-agronómicas superiores. En el establecimiento *in vitro*, se estudió el efecto del hipoclorito de sodio (3.0%) con diferentes tiempos de desinfección (5, 10, 15 min), así como el efecto del 6-BAP en la respuesta *in vitro* de las yemas. Para la multiplicación se combinaron diferentes concentraciones de 6-BAP con 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA. Los brotes fueron enraizados en un medio de cultivo de similar composición al de la fase de multiplicación pero sin reguladores del crecimiento. El tratamiento con 3.0% de hipoclorito de sodio por 10 minutos y un medio de cultivo con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP fue el mejor para el establecimiento *in vitro*, con el cual se alcanzaron un 90% de brotes establecidos *in vitro*, con una longitud de 6.71 cm. La mayor tasa de multiplicación de brotes (2.88 por explante) se obtuvo con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA después de 60 días de cultivo. El 55% de estos brotes enraizaron en un medio de cultivo con la mitad de las sales MS, sin reguladores del crecimiento.

Palabras clave: biodiversidad, conservación, cultivo de tejidos, guarango, planta forestal

### *In vitro* propagation of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz from axillary buds of selected trees

#### ABSTRACT

Guarango or tara [*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz] is a tree native to the Andes, with great economic importance and for reforestation programs. The aim of this work was to *in vitro* propagate this specie from axillary buds of selected trees. During *in vitro* establishment, the effect of sodium hypochlorite (3.0%) with different times of disinfection (5.0, 10, 15 min), as well as the effect of 6-BAP on the *in vitro* response of buds were studied. For multiplication, different combination of 6-BAP with 0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA were tested. A free-growth regulator culture medium was used for rooting. The best results for *in vitro* establishment were achieved with a disinfection treatment with sodium hypochlorite 3.0% for 10 minutes and cultivation in a culture medium with 0.25 mg l<sup>-1</sup> 6-BAP, which 90% of buds *in vitro* established, with a length of 6.71 cm. The highest multiplication rate of shoot (2.88 per explant) was obtained with 1.0 mg l<sup>-1</sup> 6-BAP and 0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA, after 60 days of culture. The 55% of these shoots developed roots in a half-strength basal salts MS culture medium free of regulators of growth.

Keywords: biodiversity, conservation, forest plant, guarango, tissue culture

#### INTRODUCCIÓN

*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz (Guarango) es un árbol originario de los Andes, produce frutos que después del secado, contienen por lo menos dos subproductos con demanda en el mercado

internacional, los taninos y las gomas (Rojas *et al.*, 2007). La vaina separada de la semilla se muele y es un importante rubro exportable como materia prima para la obtención de ácidos tánico y gálico muy usados en las industrias peleteras, farmacéutica, química y de pinturas, entre otras. Además, de las

semillas se obtiene una goma de uso alimenticio mediante un proceso térmico-mecánico. Perú es el primer exportador mundial de harina de guarango, pero solo cubre aproximadamente el 20% de la demanda mundial, por lo que existe una demanda insatisfecha de alrededor del 80% (Narváez *et al.*, 2009).

En Ecuador el guarango se encuentra especialmente en los valles bajos de la sierra, en provincias como: Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja. Por ello se podría afirmar que el país cuenta con una diversidad de regiones donde el guarango podría tener un buen potencial productivo. El Consorcio Nacional de Productores de Guarango (CONAPROG), se ha fijado como meta sembrar al menos 5 000 hectáreas de esta especie con el fin de agrupar a los productores para acopiar, procesar y exportar los subproductos antes mencionados (Narváez *et al.*, 2009).

Para cumplir con la demanda internacional los productores prefieren poblaciones o individuos con una alta concentración en taninos. A partir de investigaciones realizadas en el 2009, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) se identificaron árboles plus seleccionados por sus buenas características morfo-agronómicas con rendimientos superiores a 40 kg de vainas por árbol y elevada producción de taninos. Estas poblaciones silvestres, han sido el resultado tanto de procesos de autofecundación como de fecundación cruzada no controlada por el hombre, por lo que se desconoce la procedencia de estos árboles con características superiores, lo que dificulta la producción de un individuo estable genéticamente. Por ello la propagación agámica sería la única vía posible para garantizar la clonación de estos individuos. En este sentido, la técnica de injerto ha sido factible para lograr estos objetivos (Flores y Chávayry, 2005), sin embargo el cultivo de tejidos constituye la vía más promisoría. Esta técnica permite incrementar la obtención de plantas para la reforestación, la producción de biomasa leñosa y la conservación de germoplasma de élite en un corto período de tiempo (Gantait *et al.*, 2016).

En los últimos años, el cultivo *in vitro* ha sido una herramienta efectiva para la propagación y la conservación de germoplasma de especies leguminosas arbóreas, entre las que se encuentran: *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne (Uddin *et al.*, 2005), *Psoralea corylifolia* L. (Baskarana y Jayabalan, 2009), *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth (Goyal *et al.*, 2012), especies del género *Acacia* (Gantait *et al.*, 2016), de *Pterocarpus* (Chisha-Kasumu *et al.*, 2007; Mojeremane y Lumbile, 2016), de *Prosopis* (Buendía-González *et al.*, 2007; Kumar y Singh, 2009; Minchala-Patiño *et al.*, 2014). Existen trabajos descritos en el género *Caesalpinia*, como es el caso de las especies *Caesalpinia pulcherrima* L. (Rahman *et al.*, 1993; Jahan *et al.*, 2014), *Caesalpinia echinata* (Werner *et al.*, 2010), *Caesalpinia bonduc* (Cheruvathur *et al.*, 2010; Santosh-Kumar *et al.*, 2012), y *Caesalpinia pyramidalis* (Silva *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no existen en la literatura internacional informes que refieran la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*.

El desarrollo de una metodología de propagación de *C. spinosa* mediante el empleo del cultivo *in vitro*, permitirá no solo la clonación de plantas seleccionadas por su mayor producción de frutos y concentración en taninos, sino que permitirá que los productores dispongan de una mayor cantidad de material vegetal para el establecimiento de plantaciones con fines comerciales.

Teniendo en cuenta la problemática descrita anteriormente se propuso como objetivo de este trabajo propagar *in vitro* *C. spinosa* a partir de yemas axilares obtenidas de árboles plus seleccionados por sus características morfo-agronómicas superiores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Recursos Naturales, Centro Bioforesta, localizado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

### *Material vegetal y condiciones generales de cultivo*

Como material vegetal inicial se utilizaron yemas axilares obtenidas de plantas

donantes de *C. spinosa* con 16 meses de edad, las cuales fueron mantenidas en casa de cultivo. Estas plantas fueron revigorizadas mediante injertos, a partir de árboles adultos previamente seleccionados por su alta producción de frutos y contenido de taninos.

El medio de cultivo basal para las fases del proceso estuvo compuesto por sales inorgánicas MS propuestas por Murashige y Skoog (1962), reducidas en un 50%, 500 mg l<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada, 50 mg l<sup>-1</sup> de Polivinilpirrolidona (PVP), 2.0 g l<sup>-1</sup> de carbón activado, 3.0% de sacarosa, 7.0 g l<sup>-1</sup> de agar y pH ajustado a 5.7 previo a la esterilización en autoclave a 121 kg cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos.

Los cultivos en las diferentes fases del proceso se ubicaron en un cuarto de crecimiento a 25±2°C. El fotoperiodo utilizado fue de ocho horas de luz y 16 horas de oscuridad con una intensidad luminosa de 2000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, emitida por lámparas de neón de luz blanca.

### **Establecimiento *in vitro***

Las yemas axilares con una longitud aproximada de 3.0 cm fueron lavadas durante 10 minutos con agua y detergente líquido comercial (5.0 ml l<sup>-1</sup>, v/v). Transcurrido ese tiempo se realizaron dos enjuagues con agua común. Seguidamente, las yemas se sumergieron en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos. Se retiró el etanol mediante un enjuague con agua desionizada estéril y se procedió a sumergir las yemas en una solución de hipoclorito de sodio al 3.0% con 1.0 ml de Tween-80 durante tres tiempos de inmersión (5.0, 10 y 15 min) para un total de tres tratamientos. Transcurrido este tiempo se retiró el NaClO mediante el lavado con agua desionizada estéril.

Cada yema se colocó individualmente en un tubo de ensayo que contenía 10 ml del medio de cultivo basal con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de Benciloaminopurina (6-BAP). Se utilizaron 20 explantes por cada tratamiento y el experimento fue repetido tres veces (n=60). A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles, el número de explantes vivos, el número de explantes brotados y el número de explantes fenolizados. Los datos fueron expresados en porcentaje.

### **Multiplicación *in vitro***

#### *Efecto del 6-BAP en la respuesta in vitro de las yemas axilares*

Se estudió el efecto del 6-BAP en la respuesta *in vitro* de las yemas. Cada explante se colocó por separado en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio de cultivo de similar composición al descrito en el experimento anterior, pero con diferentes concentraciones de 6-BAP (0.25, 0.5 y 1.0 mg l<sup>-1</sup>) y un control sin reguladores del crecimiento. Se utilizaron 20 explantes por cada tratamiento y el experimento fue repetido tres veces (n=60). A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de explantes brotados, el número de brotes por explante y se midió la longitud (cm) de los brotes.

#### *Efecto del 6-BAP y el ANA en la multiplicación de brotes*

Para la multiplicación *in vitro* se determinó el efecto de cuatro concentraciones de 6-BAP (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg l<sup>-1</sup>) solo y combinado con 0.1 mg l<sup>-1</sup> de Ácido Naftalenacético (ANA) y un control sin reguladores del crecimiento, para un total de nueve tratamientos. Se utilizaron explantes establecidos y multiplicados con el mejor tratamiento de los experimentos anteriores. Los explantes fueron individualizados y se distribuyeron a razón de tres por frasco con 30 ml de medio cultivo para un total de 51 explantes por tratamiento. El experimento fue repetido tres veces. A los 60 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por explante, el número de explantes hiperhídricos y se midió la longitud (cm) de los brotes.

### **Enraizamiento *in vitro***

En este proceso se utilizaron brotes mayores de 3.0 cm, provenientes del mejor tratamiento de multiplicación del experimento anterior. El medio de cultivo utilizado tuvo igual composición que el medio de cultivo para la fase de multiplicación, pero sin reguladores del crecimiento. Se cultivaron cinco explantes por frasco con un total de 30 explantes en cada repetición (tres repeticiones). A las seis semanas se cuantificó el número de plantas con raíces.

### Procesamiento estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22.0, a los datos se le aplicaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. En los casos en que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, los datos fueron transformados de acuerdo con  $x' = (x+0.5)/0.5$  y se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple. Para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento *in vitro*

El establecimiento de un banco de plantas donadoras en casa de cultivo mediante injerto del material vegetal adulto (Figura 1A), permitió disponer de yemas axilares que sirvieron de explantes para el cultivo *in vitro* (Figura 1B).

El mejor tratamiento para la desinfección de los explantes se logró al combinar 3.0% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos, con un 90% de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (Figura 2). Mientras que, el mayor porcentaje de explantes brotados (96.7%) se obtuvo en el medio de cultivo con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Un tiempo de desinfección superior a 10 minutos, no incrementó significativamente el número de explantes libres de contaminantes, ni el número de explantes brotados. Es válido destacar que aunque el incremento del tiempo de desinfección favoreció la oxidación fenólica, el porcentaje fue solo de un 5.0% en el tratamiento con 10 minutos (Figura 1C).

El hipoclorito de sodio fue efectivo para la desinfección de los brotes durante el establecimiento *in vitro* de *C. spinosa*. En esta fase del cultivo *in vitro* se pueden utilizar diferentes compuestos para la desinfección del material vegetal, siendo las soluciones de hipoclorito de sodio y el alcohol a diferentes porcentajes, de los productos más comunes (Azofeifa, 2009).

Los resultados sobre el uso efectivo del hipoclorito de sodio en la desinfección de los brotes de *C. spinosa*, están en

correspondencia con los obtenidos para otras especies caesalpináceas. En el caso de *C. bonduc* el uso de una solución al 2.0% de hipoclorito de sodio durante 20 min fue efectiva para desinfectar el 90% de las semillas (Cheruvathur *et al.*, 2010). El tratamiento de las semillas de *C. pyramidalis* con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 minutos fue efectiva para el establecimiento *in vitro* (Silva *et al.*, 2014).

La oxidación fenólica constituye una problemática que se presenta en la propagación *in vitro* principalmente en las especies leñosas (Teixeira, 2001) y se ha descrito como un serio problema para el establecimiento *in vitro* de otras caesalpináceas, como *C. echinata* (Werner *et al.*, 2009) y *C. bonduc* (Cheruvathur *et al.*, 2010; Santosh-Kumar *et al.*, 2012). Sin embargo, en este estudio, se logró establecer *in vitro* los explantes de *C. spinosa* con una frecuencia de incidencia de la oxidación fenólica de solo el 5.0% de los explantes. Estos resultados son satisfactorios, teniendo en cuenta que *C. spinosa* es una especie leñosa cuya principal característica en condiciones naturales es la producción de taninos. La inclusión de compuestos antioxidantes como cisteína, polivinilpirrolidona y carbón activado en el medio de cultivo, así como el uso del ácido cítrico en la solución de enjuague, fueron estrategias utilizadas que probablemente ayudaron a contrarrestar la oxidación fenólica.

### Multiplicación *in vitro*

#### *Efecto del 6-BAP en la respuesta in vitro de las yemas axilares*

La concentración de 6-BAP no influyó significativamente en el número de explantes brotados con respecto al tratamiento control. Sin embargo, la adición de 0.25 y 0.50 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP favorecieron significativamente el número de brotes que se obtuvieron de un explante inicial (Tabla 1). Se seleccionó como mejor tratamiento para esta fase del proceso la concentración más baja de 6-BAP (0.25 mg l<sup>-1</sup>), con la cual se obtuvo un 96.6% de brotación y en 30 días de cultivo se logró un explante establecido, vigoroso, con un promedio de 2.07 yemas brotadas con 6.71 cm de longitud (Figura 1C).

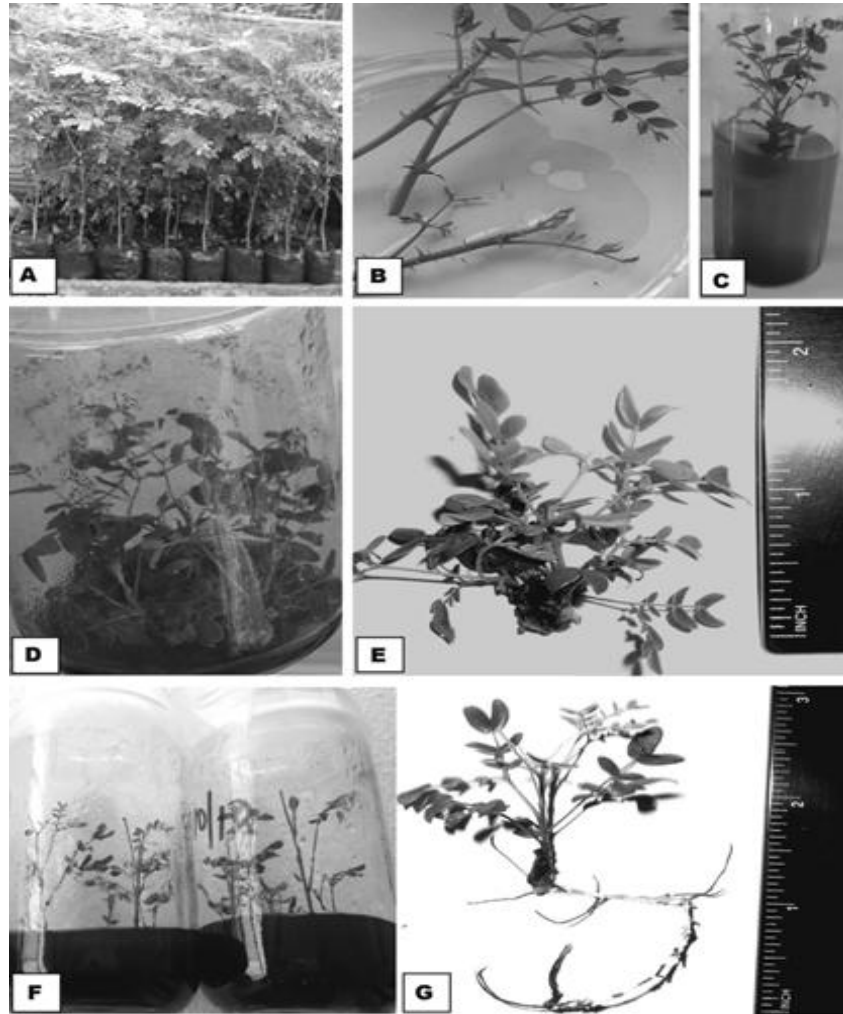


Figura 1. Propagación *in vitro* de *C. spinosa*. (A) Banco de plantas donantes establecido en casa de cultivo de 16 meses de edad, obtenidas mediante injerto. (B) Ramas obtenidas a partir de las plantas donantes, utilizadas para la extracción de yemas axilares para el cultivo *in vitro*. (C) Explante establecido *in vitro* en un medio de cultivo MS con las sales inorgánicas reducidas al 50%, con  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP, a los 30 días de cultivo. (D) Recipiente de cultivo con brotes en fase de multiplicación. (E) Brote obtenido en medio de cultivo de multiplicación con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA, a los 60 días de cultivo. (F) Recipiente de cultivo con brotes en fase de enraizamiento. (G) Brote enraizado en medio de cultivo MS con las sales inorgánicas reducidas al 50%, sin reguladores del crecimiento.

Los resultados están en correspondencia con los descritos por diferentes autores durante la propagación *in vitro* de otras especies arbóreas como *Tectona grandis* L., *Pithecellobium dulce* (Roxb.) y *Acacia mangium* Willd. Los autores refieren que con el empleo de un medio de cultivo compuesto por las sales MS y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP obtienen un porcentaje de explantes brotados y establecidos *in vitro* de un 90% en *Tectona* (Jiménez-Tello, 2008), un 80% en *Pithecellobium* (Goyal *et al.*, 2012) y un 90% en acacia (Monteuuis *et al.*, 2013).

#### *Efecto del 6-BAP y el ANA en la multiplicación de brotes*

Los mejores resultados con respecto al efecto del 6-BAP y el ANA en la multiplicación de los brotes se alcanzaron en los tratamientos con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA y  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP solo o combinado con  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA (Tabla 2). Sin embargo, en el tratamiento con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA, los brotes alcanzaron mayor longitud, por lo que se

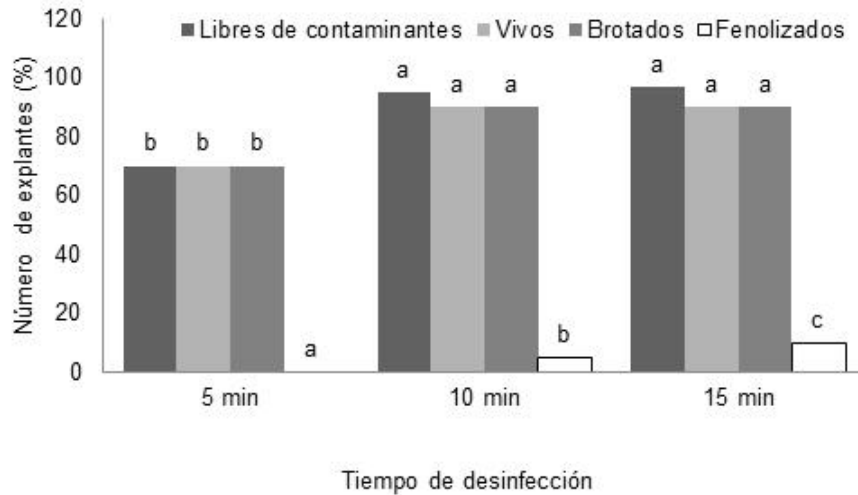


Figura 2. Efecto de diferentes tiempos de desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 3.0%, en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *C. spinosa*. Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA simple, Tukey  $p \leq 0.05$ ). Para el tratamiento estadístico los datos expresados en porcentaje fueron transformados de acuerdo con  $x' = (x+0.5)/0.5$ . Los datos que se presentan en el gráfico son no transformados, (n=60).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la respuesta *in vitro* de yemas axilares de *C. spinosa* después de 30 días de cultivo.

6-BAP (mg l <sup>-1</sup> )	Brotación (%)	No. de brotes/exp	Longitud (cm)
0.00	96.66 a	1.40 bc	7.73 a
0.25	96.66 a	2.07 a	6.71 ab
0.50	93.33 a	1.63 ab	5.06 b
1.00	86.66 a	1.03c	6.88 ab
±EE	±4.40	±0.36	±0.88

Medias con letras distintas en una misma columna difieren significativamente (ANOVA simple, Tukey  $p \leq 0.05$ ). Para el tratamiento estadístico los datos expresados en porcentaje fueron transformados de acuerdo con  $x' = (x+0.5)/0.5$ . Los datos que se presentan en la tabla son no transformados (n=60)

seleccionó este como el mejor tratamiento para la multiplicación *in vitro* de *C. spinosa* (Figura 1D, Figura 1E). No se observó la presencia de brotes hiperhídricos en los tratamientos estudiados.

En correspondencia con los resultados de este trabajo diferentes autores refieren el efecto positivo del 6-BAP y el ANA para la multiplicación *in vitro* de otras especies leguminosas arbóreas. Tal es el caso de Rahman *et al.* (1993), los cuales durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *C. pulcherrima*, informaron de un coeficiente de multiplicación de 5.8 nuevos brotes/explante con un medio de cultivo MS

combinado con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP + 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA. Los resultados para *C. spinosa* coinciden con los descritos en *Prosopis alba* Griseb, en esta especie la combinación de 1.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP + 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA favoreció la elongación de los brotes y mejoró la multiplicación (Castillo de Meier y Bovo, 2000). Así mismo, Cheruvathur *et al.* (2010) señalaron que para la multiplicación de *C. bonduc*, el uso de 4.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP combinado con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA fue efectivo y permitió obtener 5.6 brotes/explante. Mientras, en *Acacia mangium* y *A. mangium* x *A. auriculiformis*, fue posible obtener entre tres y cinco nuevos brotes por explante con la adición de 0.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP combinado con 0.02 mg l<sup>-1</sup> de ANA (Monteuuis *et al.*, 2013).

Tabla 2. Efecto del 6-BAP y el ANA en la multiplicación de brotes de *C. spinosa*, después de 60 días de cultivo.

6-BAP (mg l <sup>-1</sup> )	ANA (mg l <sup>-1</sup> )	No. brotes/ explante	Longitud de brotes (cm)
0	0	1.03e	3.19b
0.25	0	1.25e	3.13b
0.50	0	2.32c	2.57c
0.50	0	2.32c	2.57c
1.00	0	2.68b	1.81d
1.00	0	2.68b	1.81d
2.00	0	2.77ab	1.56d
0.25	0.10	1.57d	3.93a
0.50	0.10	2.07c	3.96a
1.00	0.10	2.88ab	3.89a
2.00	0.10	2.99a	3.25b
±EE		±0.40	±0.66

Medias con letras distintas en una misma columna difieren significativamente (ANOVA simple, Tukey ( $p \leq 0.05$ )). Para el análisis estadístico los datos expresados en porcentaje fueron transformados de acuerdo con  $x' = (x+0.5)/0.5$

### Fase de enraizamiento *in vitro*

El 55% de los brotes mayores de 3.0 cm desarrollaron raíces *in vitro* en el medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS, sin reguladores del crecimiento. Aunque la mayoría de las especies leñosas emiten raíces en un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento, el porcentaje que se obtiene es bajo. Muchos autores coinciden que en las especies leñosas la reducción de las sales favorece el enraizamiento, pero es necesaria la adición de una auxina para favorecer el enraizamiento en estas especies. Por ejemplo, en especies del género *Prosopis*, como es el caso de *P. alba* se observó enraizamiento en brotes de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* y de plantas silvestres de cinco y veinte años de edad, en medio de cultivo MS con 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB o 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA, y puentes de papel de filtro (Castillo de Meier y Bovo, 2000). En *P. laevigata* se alcanzó hasta 44% de enraizamiento en medio de cultivo MS con las sales reducidas al 50%, con 3.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA y vermiculita (Buendía-González *et al.*, 2007). Así mismo, en brotes inducidos en segmentos nodales de *P. cineraria* el enraizamiento fue mejor en el medio de cultivo MS con las sales reducidas al 50%, con 3.0 y 5.0 mg l<sup>-1</sup> de AIB (Kumar y Singh, 2009).

Resultados similares se obtienen durante el enraizamiento de *Pithecellobium dulce* (Roxb.) y *C. pulcherrima*, el empleo de un medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS + 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIB + 2.0 g l<sup>-1</sup> de carbón activado permitió obtener un 80% de plantas enraizadas *in vitro* de *P. dulce* (Goyal *et al.*, 2012). Mientras, en *C. pulcherrima* se obtuvo igual porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* con un medio de cultivo que contenía el 50% de las sales MS y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol butírico (AIB) (Jahan *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta los resultados informados por otros autores en diferentes especies arbóreas, los resultados de este trabajo conducen a la necesidad de estudiar la adición de sustancias que mejoren el enraizamiento *in vitro* de las plantas de *C. spinosa*, por lo que en lo adelante será necesario definir, concentración y tipo de regulador del crecimiento, principalmente auxinas.

### CONCLUSIONES

Se logró propagar *in vitro* *C. spinosa* a partir de yemas axilares obtenidas de árboles plus seleccionados por sus características morfo-agronómicas superiores. El tratamiento con 3.0% de hipoclorito de sodio por 10 minutos y un medio de cultivo con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP fue el mejor para el establecimiento *in vitro* de los

brotos de *C. spinosa*, con el cual se alcanzó un 90% de brotes establecidos *in vitro* con dos yemas brotadas y una longitud de 6.71 cm. El tratamiento con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA fue el más adecuado para la multiplicación de los brotes, con el cual se obtuvo una tasa de multiplicación 2.88 brotes por explante, después de 60 días de cultivo. Sin embargo, aunque el 55% de estos brotes enraizaron en un medio de cultivo MS con las sales reducidas al 50% sin reguladores del crecimiento, es necesario realizar experimentos encaminados a mejorar la eficiencia de esta fase del proceso. Los resultados descritos constituyen el primer informe de la propagación *in vitro* vía organogénesis de esta especie, a partir de árboles plus seleccionados por sus características morfo-agronómicas superiores.

## REFERENCIAS

- Azofeifa A (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20 (1): 153-175
- Baskarana P, Jayabalan N (2009) *In vitro* regeneration of *Psoralea corylifolia* L. through callus cultures. *Plant Biotechnology* 26 (3): 333–336; doi: 10.5511/plantbiotechnology.26.333
- Buendía-González L, Orozco-Villafuerte J, Cruz-Sosa F, Chávez-Ávila VM, Vernon-Carter E J (2007) Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston) I via cotyledonary nodes. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 43 (3):260–266; doi: 10.1007/s11627-007-9027-8
- Castillo de Meier G, Bovo OA (2000) Plant regeneration from single-nodal-stem explants of legume tree *Prosopis alba* Griseb. *Biocell* 24 (2): 89-95
- Cheruvathur MK, Britto J, Thoma TD (2010) Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally important *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Iranian Journal of Biotechnology* 8 (4): 263-269
- Chisha-Kasumu E, Woodward S, Price A (2007) Comparison of the effects of mechanical scarification and gibberellic acid treatments on seed germination in *Pterocarpus angolensis*. *Southern Hemisphere For J* 69: 63-70; doi: 10.2989/SHFJ.2007.69.1.9.171
- Flores F, Chávayry L (2005) Edad óptima del patrón, época oportuna de injertado y producción masiva de injertos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze – Tara. Asociación Civil para la Investigación y el Desarrollo Forestal, Lima
- Goyal P, Kachhwaha S, Kothari SL (2012) Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. *Physiol Mol Biol Plants* 18 (2): 169–176; doi: 10.1007/s12298-012-0112-z
- Jahan N, Bin S, Javed B, Anis M (2014) *In vitro* regeneration from nodal explants in *Caesalpinia pulcherrima* L.- An anticancerous woody legume. *Agrotechnol* 2 (4): 288; doi: 0.4172/2168-9881.S1.008
- Jiménez-Tello MV (2008) Propagación *in vitro* de *Tectona grandis* L. a partir de ápices de brotes axilares de plantas de origen epicórmico. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología de Las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba
- Kumar S, Singh N (2009) Micropropagation of *Prosopis cineraria* (L.) Druce—A multipurpose desert tree. *Researcher* 1 (3): 28-32
- Minchala-Patiño J, Poma-Angamarca R, Muñóz-Chamba L, Yaguana-Arévalo M, González-Zaruma D, Eras-Guamán VH, Rojas-Idrogo C, Delgado-Paredes GE (2014) Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae-Mimosoideae) Quebracho- *Revista de Ciencias Forestales* 22 (1-2): 88-99
- Mojeremane W, Lumbile AU (2016) A Review of *Pterocarpus angolensis* DC. (Mukwa) an Important and threatened timber species of the miombo Woodlands. *Research Journal of Forestry* 10 (1): 8-14; doi: 10.3923/rjf.2016.8.14
- Monteuuis O, Galiana A, Goh D (2013) *In vitro* Propagation of *Acacia mangium* and *A. mangium* x *A. auriculiformis*. *Methods Mol Biol* 11013:199-211; doi: 10.1007/978-1-62703-074-8\_15
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15 (3): 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Narváez TA, Calvo A, Troya AM (2009) Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos a través de estudios moleculares y bioquímicos. Programa regional ECOBONA, Quito; ISBN: 9942996621
- Rahman S M, Hossain M, Biswas BK, Joarder OI, Islam R (1993) Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 363-365; doi: 10.1007/BF00042301



- Rojas O, Rojas N, Díaz P (2007) La tara y condiciones de reforestación en el Alto Jequetepeque, Microcuenca de San Juan-Cajamarca. *Industrial data* 10 (2): 38-46; doi: 10.15381/idata.v10i2.6358
- Santosh-Kumar SR, Krishna V, Venkatesh SH, Pradeepa K, Girish-Kumar K (2012) Direct and indirect method of plant regeneration from root explants of *Caesalpinia bonduc* Roxb. *Indian Journal of Experimental Biology* 50 (12): 910-917
- Silva TS, Nepomuceno CF, Borges BPS, Alvim BFM, Santana JRF (2014) Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). *Sitientibus série Ciências Biológicas* 13: 1-6; doi:10.13102/scb320
- Teixeira J (2001) Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília
- Uddin SM, Nasirujjaman K, Rahman MM, Reza MA (2005) Callus induction and indirect regeneration in *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne. *Journal of Biological Sciences* 5 (4): 486-489; doi: 10.3923/jbs.2005.486.489
- Werner ET, Cuzzuol GRF, Pessotti KV, Lopes FP, Roger JA (2009) Controle da calogênese do Pau-Brasil *in vitro*. *Revista Árvore* 33 (6): 987-996; doi: 10.1590/S0100-67622009000600001
- Werner ET, Milanez CRD, Mengarda LHG, Vendrame WA, Cuzzuol GRF (2010) Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio a regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta bot bras* 24 (4): 1046-1051; doi: 10.1590/S0102-33062010000400019

Recibido: 08-02-2017  
Aceptado: 20-02-2017