



Artículo

Descripción morfológica y germinación in vitro de añahuaya (*Adesmia miraflorensis* Remy) en dos medios de cultivo

Morphological description and in vitro germination of añahuaya (*Adesmia miraflorensis* Remy) in two culture media

Vania Virginia Chalco y Beatriz Mamani Sánchez

RESUMEN:

Adesmia miraflorensis Remy, más conocida como añahuaya, ayacaulli o añawi, que es una especie nativa que tiene una gran importancia biológica, pero con cada gestión agrícola se ven más reducidas las poblaciones debido a la expansión de la frontera agrícola. Hasta el momento no se tiene información referente a la propagación *in vitro* de esta especie. El presente estudio se determinó el porcentaje de germinación y la descripción morfológica del proceso de germinación hasta la formación de la plántula en condiciones *in vitro*. De esta forma facilitar información que puede ser utilizada en proyectos de propagación y conservación y revegetación de esta especie. Las semillas previamente desinfectadas fueron sembradas en dos diferentes medios de cultivo que son Chu *et al.* (1975) y MS (Musashige y Skoog, 1962), por cada medio de cultivo se tenía 250 repeticiones. Al cabo de 15 días de las semillas de *A. miraflorensis* Remy presentaron un alto porcentaje de germinación en ambos medios, en Chu *et al.* un 97% y en MS un 92% de germinación. De acuerdo a la descripción morfológica se caracterizó 4 etapas y se observó que muchos individuos no superan la etapa 3 (E-3) llegando a registrarse Chu *et al.* con un 23% y en MS 10%. En cuanto a las medidas morfométricas las semillas tenían un diámetro de 1.16 mm y de largo 3.35 mm.

PALABRAS CLAVE:

Adesmia miraflorensis, germinación *in vitro*, semillas, descripción morfológica.

ABSTRACT:

Adesmia miraflorensis Remy, better known as añahuaya, ayacaulli or añawi, which is a native species that is of great biological importance, but with each agricultural management the populations are reduced due to the expansion of the agricultural frontier. So far there is no information regarding the *in vitro* propagation of this species. The present study determined the germination percentage and the morphological description of the germination process until the formation of the seedling under *in vitro* conditions. In this way, provide information that can be used in propagation, conservation and revegetation projects for this species. The previously disinfected seeds were sown in two different culture media that are Chu *et al.* (1975) and MS (Musashige and Skoog, 1962), for each culture medium there were 250 repetitions. After 15 days, the seeds of *A. miraflorensis* Remy presented a high percentage of germination in both media, in Chu *et al.* 97% and in MS 92% germination. According to the morphological description, 4 stages were characterized and it was observed that many individuals do not exceed stage 3 (E-3), reaching Chu *et al.* with 23% and MS 10%. Regarding the morphometric measurements, the seeds had a diameter of 1.16 mm and a length of 3.35 mm.

KEYWORDS:

Adesmia miraflorensis, *in vitro*, germination, seeds, morphological description.

AUTORES:

Vania Virginia Chalco: Universidad Publica de El Alto, Bolivia. virginiachalcojm@yahoo.es

Beatriz Mamani Sánchez: Departamento de Investigación y Proyectos - Unidad de Académica Campesina Carmen Pampa, Universidad Católica Boliviana "San Pablo" Biotecnología Vegetal. beita.mamani@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9513-6941>

DOI: <https://doi.org/10.53287/rizf7164fk25v>

Recibido: 22/09/2022. Aprobado: 19/11/2022.



INTRODUCCIÓN

Adesmia miraflorensis Remy es una especie nativa con crecimiento arbustivo perennifolio, semileñoso que puede llegar a crecer 0.80-2 m altura, crece en laderas secas y pedregosas de los cerros, entre los 3 000 - 4 000 m. Se encuentra distribuido desde el Sur de Perú, Oeste de Bolivia y Norte de Argentina (Ulibarri y Burkart, 2000). Tiene ramas castaño grisáceas a cobrizas terminadas en espinas. Hojas pecioladas, compuestas-parinpinadas, glabrescentes o pilosas de 10 - 25 mm longitud; folíolos de 2 - 5 mm longitud x 1 – 2.5 mm ovado-elípticos de color verde intenso. Flores axilares de 10 - 14 mm longitud, solitarias pediceladas y pentámeras; cáliz gamosépalo, piloso; corola papilionácea de color amarillo a naranja, con líneas cafés; androceo de 10 estambres libres; gineceo con ovario supero, alargado, unicarpelar, unilocular, estilo corto y estigma simple. Fruto legumbre cubierta de pilosidad (Gutiérrez et al., 2013).

A. miraflorensis Remy es una especie leguminosa con gran importancia ecológica debido a su actividad simbiótica con microorganismos, protección del suelo contra erosión, cumple rol de albergue y alimento de enemigos naturales de plagas de cultivos, se resalta también los usos que tiene ya sea como combustible (leña), el uso ceremonial en preparación de ofrendas (Alcon et al., 2013), uso medicinal, lo más sobre saliente es el uso como forraje general, el cual es consumido por el ganado camélido, caprino, equino (burros), ovinos y bovinos los cuales consumen sobre todo los brotes tiernos, flores y muy poco la hojarasca (Beck, 2010; Bernabé, 2000). También es considerado como un excelente rompe vientos (cortinas vivas), en Perú los productores asocian con *Opuntia spp* y *Seneno espinassum* en cerco de espina esto por su buen macollaje formando matas (Alcalde et al., 1990).

Hasta el momento se tiene trabajos de identificación de uso forrajero nativo con cada gestión

agrícola se ve la reducción de las poblaciones de añahuaya, al igual que otras especies nativas (Torres et al., 1993). En estudios de germinación, sin escarificación es de 53% en *A. spinosissima* y con escarificación (hervidas las semillas en 1 min) es de 78%, pero de este tratamiento solo un 15.71% llegó a emerger (Condori y Martinez, 2020). Con relación a estudios de reproducción vegetativa en *A. miraflorensis* Remy obtuvo un 48.19% de prendimiento a partir de estacas con la aplicación de enraizadores durante 6 meses (Mamani, 2013). No se tiene información referente a su propagación y/o regeneración en condiciones *in vitro*. La Propagación mediante cultivo de tejidos vegetales es benéfica debido a que permite obtener mayor cantidad de plantas en espacios reducidos y no depende de las condiciones ambientales. Es en este sentido, el presente trabajo se realizó una caracterización y su descripción morfológica durante el proceso de germinación *in vitro* y así como determinar el porcentaje de germinación de *A. miraflorensis* Remy. Esta información será muy útil para conocer bases de su biología reproductiva y en base a ello se puedan plantear proyectos de propagación y conservación de la especie silvestre nativa, o en todo caso se pueda aplicar métodos agronómicos para su mejor aprovechamiento (como forraje con alto potencial en aporte de proteína) o con fines de restauración debido a que juega un papel importante en la protección de suelos en zonas áridas en contra la erosión.

MATERIALES Y MÉTODOS

En marzo y abril del 2014 se colectaron frutos de varios individuos de una población de *A. miraflorensis* Remy de la Sub cuenca Tambillo de la provincia Los Andes del departamento de La Paz. Los frutos fueron secados a temperatura ambiente, y una vez que se secaron los frutos, se sacaron las semillas y fueron almacenadas en sobres de papel para su posterior siembra, previamente se separó las impurezas.



Figura 1. Morfología de *A. miraflorensis* Remy. A) Planta, B) flores, C) Frutos y D) Semillas.

Para obtener el peso y medidas de largo y ancho de semillas se tomó una muestra de 100 semillas enteras. Las semillas se pesaron en una balanza analítica, para luego medirlas con un vernier digital ancho y alto de las mismas.

Germinación

El trabajo de laboratorio, se realizó en las instalaciones del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología dependiente de la Carrera de Biología de la Universidad Mayor de San Andrés. Las pruebas de

germinación se realizaron dos repeticiones con 250 semillas cada una de ellas. Las semillas se sembraron en tubos de ensayo con dos diferentes medios de cultivo a) MS (Murashige y Skoog, 1962) y b) Chu *et al* de 1975 (Tabla 1). Previa a la siembra las semillas fueron desinfectadas con NaClO al 1% por un tiempo de 40 min y dentro de la cámara de flujo laminar se procedió sembrar una semilla por cada tubo, posteriormente se selló con papel aluminio y parafilm con la identificación correspondiente. Tal y como se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Secuencia del proceso de siembra *in vitro* de *A. miraflorensis* Remy A) desinfección en NaClO al 1% B) siembra en cámara de flujo laminar C) incubación D) desarrollo de plántulas.

El material fue incubado en la cámara de crecimiento 25°C y fotoperiodo 16/8 horas luz y oscuridad. Se realizó un seguimiento minucioso para observar el proceso de germinación y los tiempos expresados en días, en un tiempo de 22 días.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo empleados.

Stock	Sales	Murashige y Skoog (1962) (mg/1)	Chu et al. (1975) (mg/1)
I	NH ₄ NO ₃	1650	
	KNO ₃	1900	1174,8
	(NH ₄) ₂ SO ₄		387,4
	KH ₂ PO ₄		400
II	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
	MnSO ₄ H ₂ O	16,9	2,98
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6	1,5
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025	
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,025	
	KH ₂ PO ₄	170	
	KI	0,83	0,8
	H ₃ BO ₃	6,2	1,6
	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,25	
III	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	166
IV	FeSO ₄ .7 H ₂ O	27,84	13,93
	Na ₂ EDTA	37,24	18,63
V	Tiamina HCl		1
	Piridoxina HCl		1
	Ácido nicotínico	0,5	1

Mioinositol	100	100
Biotina		0,01
Glicina	2	
Piridoxina	0,5	

Variables de respuesta

Datos morfometría de las semillas

El peso y medidas de largo y ancho de semillas, para ello se tomó una muestra de 100 semillas puras. Para el pesaje (g) se empleó una balanza analítica y seguidamente se procedió a medir con un vernier digital ancho y alto (mm) de las mismas. De los frutos colectados se tomaron cuatro muestras de 100 g para realizar la evaluación de pureza e impureza.

Proceso de desarrollo durante la germinación

Para realizar la descripción de estas fases se realizó un seguimiento minucioso diario desde la siembra y también se tomaron en cuenta cuatro etapas principales descritas según (Bilbao, 2010).

Porcentaje de germinación

Para este cálculo se empleó la siguiente formula, donde se contabilizó el número de semillas germinadas sobre el total sembradas.

% Germinacion = $\frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas sembradas}} \times 100\%$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfometría de las semillas

De 100 frutos, cada uno de estos tenía entre 3 a 8 semillas. Las semillas son de forma ovoide, tienen un color café claro, con pequeñas manchas de un color café a café oscuro. En la Tabla 2 se observa que tienen un 17,188% de pureza, en un gramo se tiene 134 semillas, el diámetro y ancho de las semillas 1.16 y 3.35 mm respectivamente.

Tabla 2. Descripción morfométrica de las semillas	
Peso total	100 g
peso total de impurezas	82.812 g
Peso total de semillas (pureza)	17.188 g
Peso de 100 semillas	0.70 g
Número de semillas por gramo	134 semillas
Ancho Promedio en mm de 100 semillas	1.16 mm
Largo Promedio en mm de 100 semillas	3.35 mm

En comparación con otra especie del mismo género, en *A. spinosissima* tiene 77.5% de pureza y un peso promedio de 5 729 (g) de 1000 semillas (Condori y Martinez, 2020) que es equivalente a 5.73 g por semillas, sin embargo, el peso de 100 semillas en *A. miraflorensis* Remy fue mucho menor de 0.70 g.

Germinación

Descripción del proceso de germinación

A continuación, se presenta las etapas por la cual las semillas de *A. miraflorensis* Remy pasan hasta la formación de la plantin (Figura 3).

	E-0	E-1	E-2		E-3	E-4
			A	B		
Etapas						
Días	0	3-7	5-15		15-22	23-30

Figura 3. Proceso de germinación *A. miraflorensis* Remy

- a) Etapa 0: Semilla en descanso: En esta etapa la semilla dura se encuentra en descanso, tienen una forma regularmente plana y no presentan brillo.
- b) Etapa 1: Activación: Imbibición de agua: La semilla seca absorbe agua por que comienza a hincharse la imbibición también puede ocurrir en semillas muertas la etapa termina la emergencia de la radícula.
- c) Etapa 2: Digestión y translocación: Los compuestos almacenados en los cotiledones pasan por procesos bioquímicos con lo se da lugar a sustancias más simples que son traslocadas a los puntos de crecimiento del eje embrionario y con la presencia de la radícula y la elongación que puede ser de color blanco a beige de la misma se da lugar a la germinación lo cual no ocurre con las semillas muertas.
- d) Etapa 3: Crecimiento de la plántula: En la tercera etapa, el desarrollo de la plántula resulta de la división celular continuada en puntos de crecimiento separados del eje embrionario,

seguido por la expansión de las estructuras de la plántula.

e) Etapa 4: Desarrollo: La última etapa considera es el desarrollo y con la activación misma de las hojas cotiledóneas tomando un color verde por la actividad fotosintética, las plántulas presentan hojas verdaderas y empiezan a ramificar y desarrollar nuevas yemas de apicales.

Descripción de las etapas de germinación en respuesta a los dos medios sembrados

Medio de cultivo Chu et al. (1975)

El proceso de germinación se evidencia que en los tres primeros días la mayoría de las semillas están etapa 0 (53%) y 1 (47%), a los 8 días hay un desplazamiento hasta la etapa 3 de un 33%. A los 15 días se evidencia que las semillas se encuentran en mayor proporción en la etapa 2, en un 70%. A los 22 días, la gran mayoría está en las etapas E2, E3 y E4 de 50, 23 y 23% respectivamente.

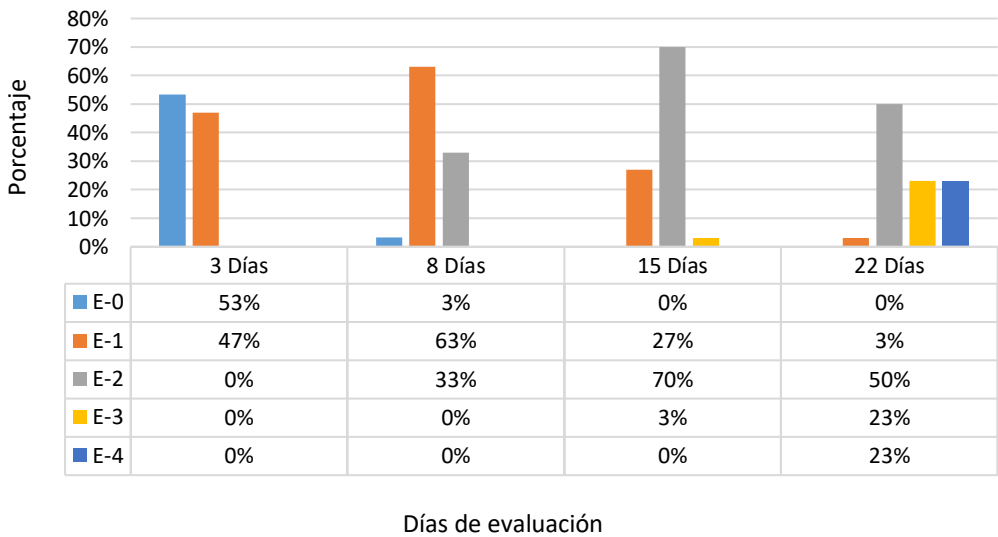


Figura 4. Proceso de germinación de *A. miraflorensis* Remy con relación a los días transcurridos, después de la siembra en medio de cultivo de Chu et al. (1975).

Medio de cultivo MS

El proceso de germinación se evidencia que en los tres primeros días la mayoría de las semillas están etapa 0 (63%) y 1 (37%), a los 8 días hay un

desplazamiento hasta la etapa 3 de un 58%. A los 15 días se evidencia que las semillas se encuentran en mayor proporción en la etapa 2, en un 49%. A los 22 días, la gran mayoría está en las etapas E2, E3 y E4 de 39, 43 y 10% respectivamente.

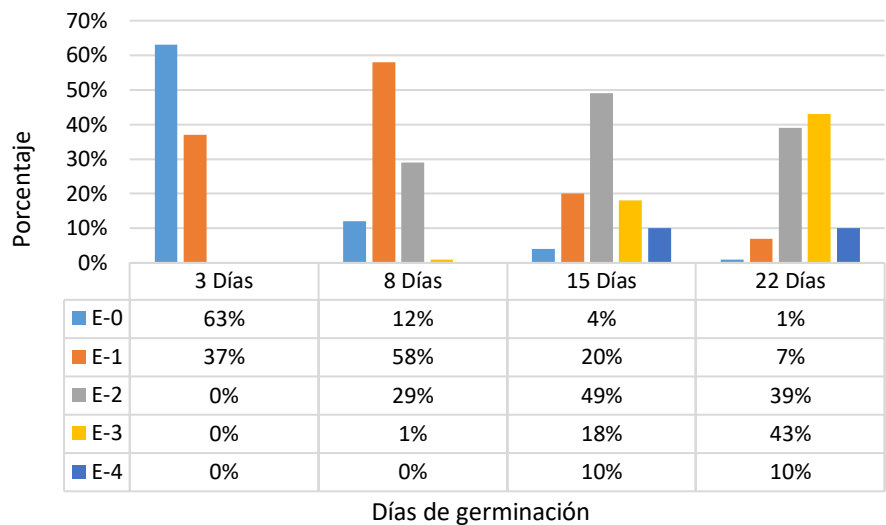


Figura 5. Proceso de germinación de *A. miraflorensis* Remy en relación a los días transcurridos, después de la siembra en medio de cultivo MS.

Entre ambos medios, se observa que el medio Chu *et al*, fue donde presentaron mayor proporción de individuos en fases más avanzadas de E2, E3 y E4 en relación al medio MS. Esta diferencia de resultados probablemente se deba a que esta especie que tiene característica herbácea a semileñosa y según algunos autores con especies forestales recomiendan emplear el medio Chu *et al* para su propagación (Vega-Krstulovic et al., 2007).

Porcentaje de germinación

Del total de las semillas se llegó a registrar para el caso del medio de cultivo Chu *et al*. (1975) un 97% de semillas germinadas que presentaban la radícula y el 3% que se quedó en la entre E-1, E-0. En el caso del medio de cultivo de MS el 92% de semillas germinaron, entretanto un 8% no germinadas (Figura 6).

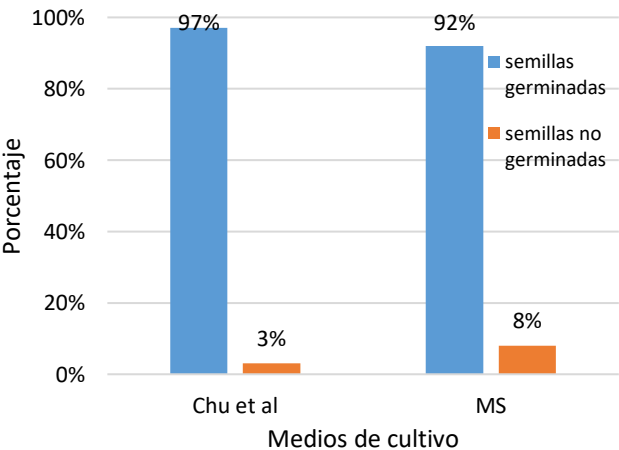


Figura 6. Porcentajes de germinación con relación a los medios de cultivo

Con relación *A. miraflorensis* para la propagación por vía sexual recomienda realizar escarificar las semillas para alcanzar entre 80% a 100% de germinación en 30 días (Borel y Mamani, 1993). En el presente trabajo se evidencia que los porcentajes de germinación son similares a lo esperado de 92 y 97% en ambos medios de cultivo a los 22 días. Sin embargo, en un trabajo realizado por (Condori y Martinez, 2020) menciona con tratamientos de escarificación con agua caliente en *Adesmia spinosissima* el porcentaje de germinación es de 53%. Este pretratamiento de germinación generalmente se realiza en semillas con testa gruesa y de consistencia dura, pero, *in vitro* la acción del hipoclorito de sodio es la que cumpliría este rol.



Figura 7. Vitroplanta de *A. miraflorensis* Remy

Las semillas *A. miraflorensis* fueron colectadas de Tambillo del Municipio de Laja y la de *A. spinosissima* del trabajo de (Condori y Martinez, 2020) fueron colectados de Patacamaya, ambas especies tienen distribución en el Altiplano Central y muestran su potencial de germinación diferenciado uno de la otra.

El tiempo de germinación en leguminosas en condiciones *in vitro* es ventajoso. En un estudio realizado por (Maiquetía et al., 2020) señalan que en 3 especies de leguminosas en el medio MS los porcentajes de germinación fueron 45%, 65% y 95% en un tiempo de 21 días. Sin embargo, también hay reportes que algunas especies de leguminosas pueden demorar 60 días en germinar, su porcentaje de germinación es variable en función a la especie, varía desde 36.66% en *Gleditsia amorphoides*, 73.33% en *Parkinsonia aculeata*; 76.66% en *Erythrina crista-galli*, 80.00% en *Sesbania punicea* y 90.00% en *Acacia caven* (Marinucci et al., 2004)

CONCLUSIONES

El 97% de semillas *A. miraflorensis* Remy germinadas se obtuvo en el medio de cultivo Chu *et al.*, y en el medio de cultivo MS se tiene 92% de semillas germinadas. Si bien el porcentaje de germinación es alta en ambos medios de cultivo, es muy bajo el porcentaje que llega a la pasar la E-3 y llega a E-4 (23% Chu *et al* y 10% MS) que es el desarrollo de la planta en 22 días de evaluación. Con la técnica de cultivo *in vitro* permitió conocer la morfología de germinación en 4 etapas hasta que llegan a desarrollar los plantines, con fines de revegetación en áreas degradadas es una alternativa con fines de propagación masiva.

Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo brindado a la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la UMSA, al igual al proyecto de investigación "Estudio de la sucesión vegetal y propagación masiva de especies nativas a través de métodos biotecnológicos y convencionales, destinados a la revegetación de taludes erosionados del tramo doble vía La Paz - Oruro (Senkata a Mantecani)" financiado con recursos IDH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalde, M., Chio, R., Macena, C., Rios, Z., & Rodrigues, M. (1990). Especies agrosilpastoriles para la zona andina. Perú.
- Alcon, M., Bonifacio, A., Ramos, P., & Condori, L. (2013). El rol multipropósito de las leguminosas en el sistema de producción de quinua. Congreso científico de la quinua, (págs. 239-250).
- Beck, S. (2010). El Parque Nacional Sajama y sus plantas. La Paz: Herbario Nacional de Bolivia. Obtenido de <https://isbn.cloud/9789990548013/el-parque-nacional-sajama-y-sus-plantas/>
- Bernabé, E. (2000). Inventariación de la flora forrajera de la subcuenca tambillo de la provincia Los Andes, La Paz, Bolivia.
- Bilbao, E. (2010). Estudio de tratamientos pregerminativos en semilla de *Fagussylvatica*. Universidad Pública de Navarra. Obtenido de <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/2269>
- Borel, R., & Mamani, F. (1993). Valor bromatológico de arbustos de importancia ganadera en el ámbito de ARBOLANDINO. pUNO, Perú: Pomata.
- Condori, A., & Martinez, Z. (2020). Tratamientos físicos y químicos en la germinación de semillas de especies nativas del Altiplano. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 46-57. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n2/v7n2_a07.pdf
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Chen, H., Yin, K. C., Chu, C. Y., & Bi, F. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Scientia Sinica 18: 659-668
- Gutiérrez, F., Gonzales, J., Ramírez, K., Mercado, M., & Arrazola, S. (2013). Guía ilustrada de especies nativas de la zona andina en Bolivia. Cochabamba. Obtenido de <https://isbn.cloud/9789995426545/guia-ilustrada-de-especies-forrajeras-nativas-de-la-zona-andina-en-bolivia/>
- Maiquetía, M., Vargas, T., Toro, M., & Carcia, E. (2020). Estudios en la germinación y propagación in vitro de tres especies de leguminosae: *Calopogonium* sp., *Stylosantes capitata* y *Cassia moschata*. Revista Científica ECOCIENCIA, 7(6),

- 1-25.
doi:<https://doi.org/10.21855/ecociencia.76.393>
- Mamani, A. (2013). Evaluación del efecto de tres enraizadores en la propagación vegetativa de la añahuaya (*Adesmia miraflorensis*), en Lucurmata Provincia Los Andes. Tesis de lic. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/4178/T-1825.pdf>
- Marinucci, L., Ruscitti, M., & Abendini, W. (2004). Morfogénesis in vitro de leguminosas forestales nativas de la República de Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 27-39.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 5: 473-497
- Torres, H., Borel, R., Bustamante, N., & Centeno, M. (1993). Usos tradicionales de arbustos nativos en el sur puno. Perú.
- Ulibarri, E. A., & Burkart, A. (2000). Sinopsis de las especies de *Adesmia* (leguminosaea adesmieae) de la Argentina. San Isidro.
- Vega-Krstulovic, C., Bermejo, J., Villegas, G., J., Q., Aguilar, M., & Conde, E. (2007). Propagación masiva de *Polylepis tomentella* Weddell ssp. nana mediante técnicas de cultivo in vitro. *zad-Portugal*, M. Aguil, 102-120. Obtenido de <http://www.scielo.org.bo/pdf/reb/v42n2/v42n2a03.pdf>