

Micropropagación de *hierba cesar* (*Gomphrena* sp.), una especie forrajera de los valles secos interandinos

Cecilia Ugarte Ballón¹; Julio Vargas Muñoz²; Alvaro Mamani Zeballos³

¹ Centro de Investigación en Forrajes "La Violeta" (CIF-UMSS);

² Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias - UMSS; ³ Vivero "La Biofábrica"

E mail: n.ugarte@umss.edu.bo

Resumen. Varias de las formaciones leñosas y semi leñosas, en los bosques secos interandinos, son una importante fuente de forraje para el ganado por el follaje palatable y la buena calidad nutritiva. La sobrecarga animal ha causado un considerable daño a esta vegetación, ya que se ha eliminado el estrato herbáceo de extensas zonas, provocando la erosión hídrica y eólica. El cultivo *in vitro*, es una herramienta biotecnológica, que permite en un corto plazo, poder generar cantidades considerables de plantines, por ello se pretende generar los protocolos de micropropagación de *Gomphrena* sp., para que en un futuro próximo se pueda reponer esta especie semi leñosa, que no logra regenerarse naturalmente por el sobrepastoreo. El protocolo de micropropagación de *Gomphrena* sp. fue validado en todas sus etapas. El empleo del medio de cultivo L&Q (1987), tanto para la desinfección (95%) como la multiplicación (tasa de multiplicación 1/25), es el más adecuado. La calidad de raíces formadas, libre de callos, se presenta en el medio 664 (85 % de enraizamiento), así, el número, tamaño de raíces y tiempo de enraizamiento, influyen directamente en el porcentaje de supervivencia de los explantes (86%). Un sustrato poroso por el contenido de perlita, favorece al desarrollo radicular y foliar, independiente del medio de enraizamiento, con un porcentaje de sobrevivencia de 95 %.

Palabras clave: Biotecnología; Cultivo *in vitro*; Reproducción asexual

Abstract: Micropropagation of *Gomphrena* sp., a forage species of the inter-Andean dry valleys. Several of the woody and semi-woody formations in the inter-Andean dry forests are an important source of forage for cattle due to their palatable foliage and good nutritional quality. The overload of animals has caused considerable damage to this vegetation, since the herbaceous stratum has been eliminated from extensive areas, causing water and wind erosion. *In vitro* culture is a biotechnological tool that allows, in a short term, to be able to generate considerable amounts of seedlings, for this reason it is intended to generate the micro propagation protocols of *Gomphrena* sp. woody, which fails to regenerate naturally due to overgrazing. The *Gomphrena* sp. it was validated in all its stages. The use of culture medium L&Q (1987), both for disinfection (95%) and multiplication (multiplication rate 1/25), is the most appropriate. The quality of roots formed, free of calluses, is presented in the medium 664 (85% rooting), thus, the number, size of roots and rooting time, directly influence the percentage of survival of the explants (86%). A porous substrate due to the perlite content favors root and leaf development, independent of the rooting medium, with a survival rate of 95 %.

Keywords: Biotechnology; *In vitro* culture; Asexual reproduction

Introducción

Las pasturas nativas en América Latina y el Caribe están en general, sujetas a rápidos y drásticos cambios, ampliando la frontera agrícola con pastos cultivados y sin realizar labores culturales necesarias para la mantención en el tiempo de estas praderas (Gibbs *et al.* 2010). Así, el proceso denominado agriculturización afecta a la zona subtropical de Bolivia, de donde se conoce altos índices de áreas deforestadas desde el 2001, siendo el pico más alto el 2008, año en que se destruyó 289.817 ha de bosques (ABT 2013). Citado por Quispe y Jimenez 2015.

El bosque seco interandino, abarca desde la región sur del departamento de Cochabamba, los valles de Chuquisaca, Potosí y Tarija; y región occidental de Santa Cruz (Samaipata, Comarapa, Moro Moro, Pampa Grande, Mairana, Trigal, Quirusillas y Vallegrande), y presenta una serie de mesetas, colinas y montañas, entre una altitud de 500 a 3300 msnm.

Varias de estas formaciones leñosas y semi leñosas, son una importante fuente de forraje para el ganado por el follaje palatable y la buena calidad nutritiva de numerosas especies. La sobrecarga animal ha causado un considerable daño a esta vegetación, ya que se ha eliminado el estrato herbáceo de extensas zonas, provocando la erosión hídrica y eólica. (OTCA 2013).

Gomphrena sp. es un arbusto de base leñosa y los tallos jóvenes herbáceos. Es una de las plantas dominantes del estrato arbustivo, frecuente en laderas secas y pedregosas de los valles secos interandinos de Bolivia entre 1600-2800 m de altitud, que florece al final de la época lluviosa y quedándose los frutos en la época seca. (Bustamante *et al.* 2016).

El cultivo *in vitro*, es una herramienta biotecnológica, que permite en un corto plazo, poder generar cantidades considerables de plantines, por lo que este trabajo pretende generar los protocolos de micropropagación de *Gomphrena* sp., por medio de la propagación clonal, para que, en un futuro próximo, se reponga esta especie semi leñosa, que no logra regenerarse naturalmente por el sobrepastoreo.

Materiales y métodos

La investigación se realizó, en el laboratorio de cultivo de células y tejidos, de la FCAyP-UMSS de Cochabamba. El material vegetal fue recolectado del municipio de Comarapa (Santa Cruz, Bolivia).

Se seleccionaron segmentos nodales con 3 a 5 yemas, considerando los brotes tiernos más vigorosos y sanos, para ser establecidos en condiciones *in vitro*.

En *fase de establecimiento*, se desinfectaron los segmentos nodales, siguiendo la metodología de Reeves *et al.* (1986), con formol al 37% (Figura 1); dependiendo del estado de lignificación de los segmentos nodales, el tiempo de exposición varió de 30 a 60 minutos. Se probaron dos medios de cultivo: L&Q (Quoirin & Lepoivre 1977) y M&S (Murashige y Skoog 1962), donde se evaluó: número de explantes vivos libres de contaminación (hongos /bacterias) y oxidación.

En *fase de multiplicación* se utilizó el medio de cultivo L&Q (Quoirin & Lepoivre 1977): sales minerales (L&Q), sacarosa 2%, 1 mg/l BAP y 0.1 mg/l AG3, gelificado con agar y el medio BO2: sales minerales (L&Q), sacarosa 2%, 0.1 mg/l AG3 y 2 mg/l BAP, gelificado con agar, enriquecido con carbón activado.

Las variables de respuesta fueron: número de brotes laterales, número de yemas y tasa de multiplicación.

Para la **fase de enraizamiento**, se utilizaron los medios de cultivo 664 (Druart 1987), sales minerales (L&Q), sacarosa 2%, 1 mg/l IBA, gelificado con agar y P6 (Ugarte *et al* 2004), sales minerales (L&Q)/2, sacarosa 3%, 3 mg/l IBA (Figura 2). Las variables de respuesta fueron: número de explantes enraizados y sobrevivencia.

Para la **fase de aclimatación**, una vez alcanzado un buen desarrollo y endurecidas las plántulas, estas se trasladaron al vivero municipal de Tiquipaya, las cuales se trasplantaron en bolsas. Se preparó tres clases de sustratos: (1) 40% de perlita y vermiculita 3:1, 40% de tierra preparada, 10% de tierra vegetal y 10% cascarilla de arroz. (2) 30 % de cascarilla de arroz, 40% de tierra preparada, 20 % tierra vegetal y 10 % de arena lavada. (3) 30% cascarilla de arroz, 40% tierra del lugar, 20% tierra vegetal y 10% arena lavada (Figura 3).

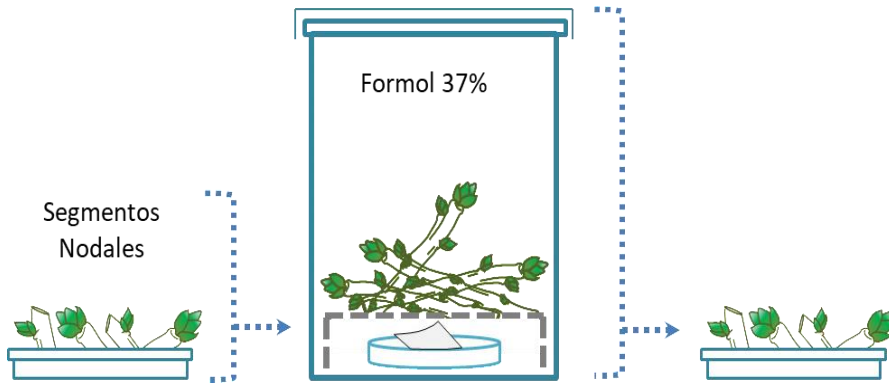


Figura 1. Esquema de desinfección con formol al 37%

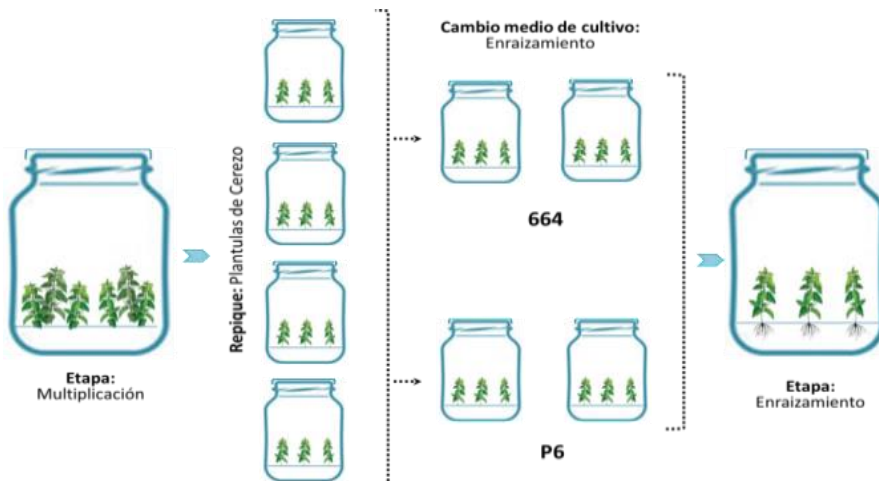


Figura 2. Esquema de enraizamiento de *hierba cesar*

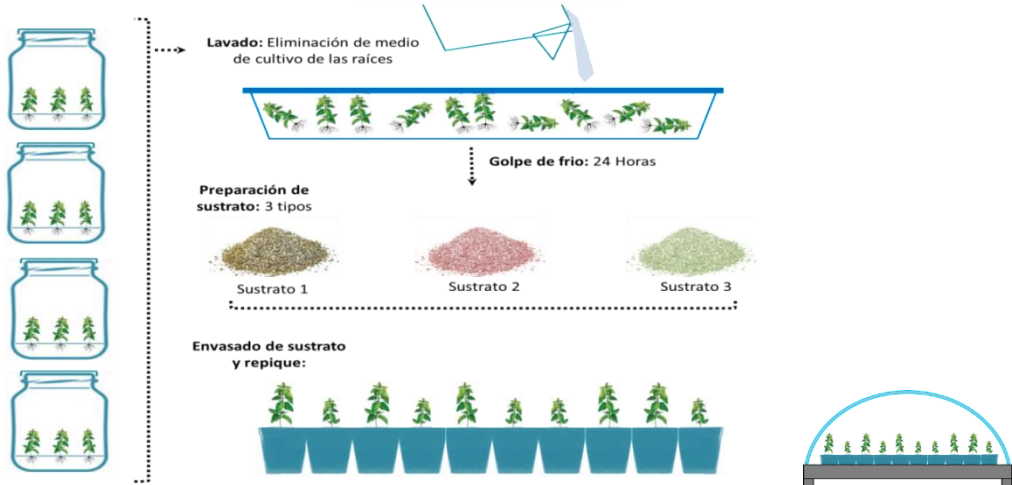


Figura 3. Esquema de aclimatación de *hierba cesar*

En esta etapa se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de los plantines, en los diferentes sustratos, asimismo el número de hojas y la altura de los plantines

Resultados y discusión

Gomphrena sp. (Figura 4) es una planta de la familia Amaranthaceae, considerada

una especie forrajera nativa preferida por el ganado bovino en ecosistemas de Bosque Seco.

Aún queda la tarea de concluir la identificación exacta de la misma, por ello en el presente estudio se mantiene como *Gomphrena* sp.



Figura 4. *Gomphrena* sp. proveniente de Comarapa (Santa Cruz, Bolivia)

Establecimiento del material vegetal

El uso de formol al 37% como agente desinfectante, resulta efectivo (95%) en segmentos nodales de *hierba cesar*, en ambos medios de establecimiento, con valores inferiores al 10% de contaminación. Sin embargo en el medio L&Q, el inicio de brotación es mayor que en el M&S, tal como se demuestra en la Figura 5, esto debido a que los componentes del medio L&Q, son más adecuados para favorecer el inicio de brotación en especies leñosas y semi leñosas (Druart 1987).



Figura 5. Explante de *hierba cesar* establecido *in vitro*

Multiplicación de explantes

El medio BO2 solamente produjo callos, por la cantidad elevada de BAP (Druart, 1987). Por tanto los resultados corresponden al medio L&Q, produciendo en promedio 10 brotes laterales por explante, con 5 yemas cada brote (hojas opuestas decusadas), como se observa en la Figura 6, llegando a un tasa de multiplicación de 1/25.

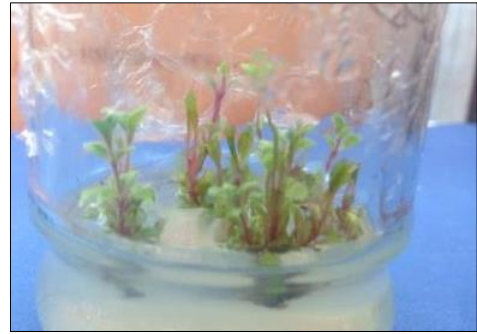


Figura 6. Explantes en fase de multiplicación de *Gomphrena* sp.

Enraizamiento de los explantes

El medio 664, induce a un 85% de enraizamiento, mientras que con el medio P6 se produce una mayor cantidad de callos, en desmedro de la calidad de la raíz, esto debido a la mayor cantidad de auxinas que inducen a la formación de callos, lo que fue reportado por Oporto 2014, en *Prunus avium*.

Los explantes enraizados en el medio 664, se muestran en la Figura 7, en los cuales se puede observar que las raíces no se generan a partir de callos, condición favorable para la posterior pre aclimatación, debido a que son raíces mejor

conformadas, a diferencia de las raíces que se forman a partir de callo, que tienden a desprenderse al momento de entrar en contacto con el sustrato de pre aclimatación.

En cuanto a la sobrevivencia se alcanza un mayor porcentaje (86%), con el medio 664 (Figura 8).

Aclimatación de los explantes enraizados

La *hierba cesar*, por su rusticidad, no requiere de pre aclimatación. El primer sustrato favorece el cambio a raíces activas, con un 95% de sobrevivencia con los explantes provenientes del medio 664 (Figura 9).



Figura 7. Explantes enraizados en el medio de cultivo 664

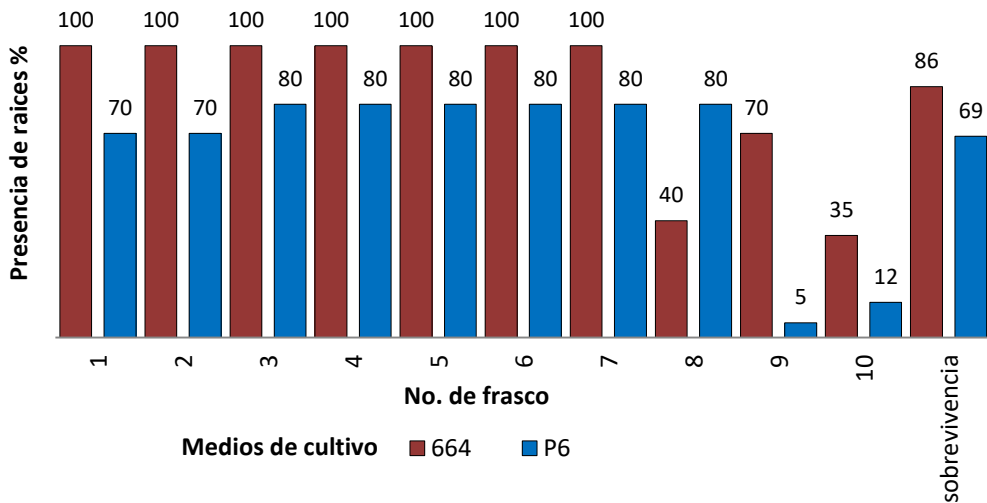


Figura 8. Presencia de raíces en explantes de *hierba cesar*

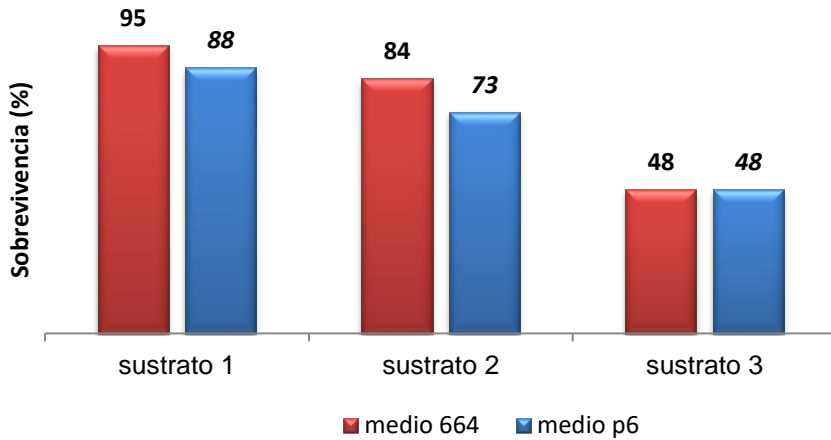


Figura 9. Sobrevivencia de explantes de *hierba cesar*

El sustrato más poroso, por su contenido de perlita, favorece el desarrollo la parte radicular y foliar (Figura 10). Este debe cumplir funciones muy importantes para el éxito del proceso: la humedad y permitir el intercambio de gases (Hartmann y Kester 1988, Botti 1999).

A pesar de la calidad del material vegetal obtenido en la etapa *in vitro*, se conoce que estas plantas presentan hojas con cutículas delgadas, poca funcionalidad estomática, células del mesófilo de empalizada desorganizadas y modificaciones en el sistema vascular, características que influyen directamente en la supervivencia en invernadero (Sánchez 2011, citado por Flores *et al.* 2015).

Debido a lo anterior, fue de vital importancia el control de la humedad relativa y la intensidad lumínica. Según Flores (2009) y Gilsanz (2007), citados por Nieto y Valdivieso (2013), recomiendan disminuir progresivamente la humedad e incrementar la luminosidad en temperaturas moderadas, evitando así, la transpiración excesiva con el fin de lograr mayores porcentajes de sobrevivencia.

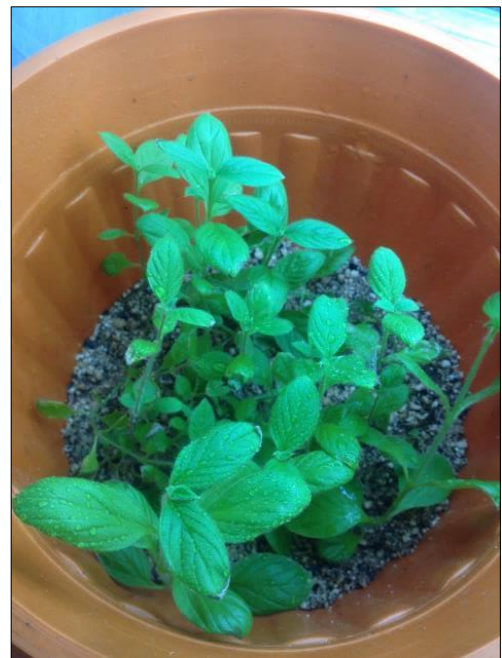


Figura 10. Explante en aclimatación en sustrato poroso

Conclusiones

- El protocolo de micropropagación de *Gomphrena sp.* (*hierba cesar*), fue validado en todas sus etapas. Con un porcentaje de desinfección del 95% en el medio L&Q (1987).

- El empleo del medio de cultivo L&Q (1987), tanto para la desinfección (95%) como la multiplicación masiva (tasa de multiplicación 1/25), es el más adecuado.
- La calidad de raíces formadas, libre de callos, se presenta en el medio 664 (85% de enraizamiento), así, el número, tamaño de raíces y tiempo de enraizamiento, influyen directamente en el porcentaje de supervivencia de los explantes (86%).
- Un sustrato poroso por el contenido de perlita (sustrato 1), favorece al desarrollo radicular y foliar, independiente del medio de enraizamiento, con un porcentaje de sobrevivencia del 95 %.

Referencias citadas

- Botti C. 1999. Principios de la propagación y técnicas de propagación por estacas. En manejo tecnificado de invernaderos y propagación de plantas. Departamento de producción agrícola. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. p. 72-82.
- Bustamante I., Landaeta K., De la Barra N. 2016. Guía ilustrada de la Serranía de San Pedro de Cochabamba. Cochabamba, Bolivia. 136 p.
- Dora M., Chacón R., Alvarado L., Schmidt A., Alvarado C. 2015. Enraizamiento de vitroplantas de membrillo (*Cydonia oblonga*) por medio de inmersión temporal automatizada y su aclimatación. Rev. Bras. Frutic. vol. 37 nro. 3. Jaboticabal. July/Sept. 2015. SP, Brasil. p. 739-747.
- Druart Ph. 1987. Contribution al'elaboration de techniques de production en masse *in vitro* d'especes ligneuses utilisables en culture fruitiere. Tesis, PhD. Doctor en Ciencias Agronómicas. Faculte des Sciences Agronomiques de L'etat Gembloux (Belgique). 168 p.
- Gibbs H., Ruesch A., Achard F., Clayton M., Holmgren P., Rama Gibbs N., Ruesch S., Achard F., Clayton M., Holmgren P., Ramankutty N., Foley J. 2010. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 16732–16737 September 21, 2010. Vol. 107 nro. 38. *En línea*. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/107/38/16732> Consultado en mayo de 2016.
- Hartmann H., Kester D. 1988. Propagación de plantas. Principios y prácticas. México. Compañía Editorial Continental. 760 p.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco. Tissue Culture. Physiol Plant. p. 473 - 497.
- Nieto V., Valdivieso L. 2013. Establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* para su conservación. Tesis. Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana. Sede Quito. Ecuador. p. 24.
- Oporto G. 2014. Aclimatación de cerezo (*Prunus avium* L.) y guinda (*Prunus cerasus* L.) provenientes de cultivo de tejidos. Pasantía Técnico Superior Forestal. Escuela de Ciencias Forestales. FCAPyF. UMSS. 41 p.

- OTCA. 2013. Memoria Técnica Mapa de Bosque 2013 (Clasificación por tipo de Bosque) Bolivia. Ministerio de Medio Ambiente y Aguas. Bolivia. 49 p.
- Quispe R., Jimenez M. 2015. Especies forrajeras nativas preferidas por el ganado bovino en ecosistemas de Bosque Seco del área protegida de la Serranía. Revista Agroecologica. Julio 2015. Sucre, Bolivia. 2(1): 257-273.
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977: Improved media for *in vitro* cultures of *Prunus* sp. Acta Hortic. 78: 437-442.
- Reeves D., Edwards J., Thompson J., Horton B. 1985. Influence of Ca concentration on micronutrient imbalances in *in vitro* propagated *Prunus* rootstock. Journal of Plant Nutrition. 8: 4, 289-302.
Doi: 10.1080/01904168509363344
- Ugarte C., Du Jardin P., Druart Ph. 2004. Etude et identification des facteurs qui interviennent dans l'induction de la floraison chez *Prunus* sp. Et leur influence sur la floraison *in vitro*. Metodologie de la recherche. Gembloux. Bélgica. p. 18.