

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LAS GIBERELINAS EN LA GERMINACION DE ALISO (*Alnus acuminata* Kunth) EN PRESENCIA DE ARSENATO DE SODIO.**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

**NATALY POVEDA DIAZ**

Tunja  
Septiembre, 2019



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LAS GIBERELINAS EN LA GERMINACION DE ALISO (*Alnus acuminata* Kunth) EN PRESENCIA DE ARSÉNICO.**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

**NATALY POVEDA DIAZ**

**PhD. CAROLINA RAMOS MONTAÑO**  
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia  
Grupo de ecología de organismos GEO UPTC

Tunja  
Septiembre, 2019



## CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Yo, **Carolina Ramos Montaña** PhD en Fisiología vegetal, docente titular de la escuela de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y Directora del grupo GEO (Grupo de ecología de organismos).

### CERTIFICO:

Que el trabajo de grado realizado bajo mi dirección por **NATALY POVEDA DIAZ** titulado “**EFFECTO DE LAS GIBERELINAS EN LA GERMINACION DE ALISO (*Alnus acuminata* Kunth) EN PRESENCIA DE ARSÉNICO**”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas otorgado por la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Tunja Boyacá, a los 30 días del mes de septiembre de 2019.



**CAROLINA RAMOS MONTAÑO.**

Director

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

Grupo de ecología de organismos GEO



## COMITÉ TUTORIAL



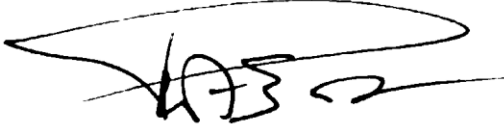
---

Carolina Ramos Montaña. PhD.  
Director



---

Mary Ruth García Conde. PhD.  
Jurado 1



---

Pedro José Almanza Merchán. PhD.  
Jurado 2



*A Dios por ser mi fortaleza; y a mi hija Laura Natalia mi motivación.*



## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de proyecto la Dra. Carolina Ramos por creer en mí por su paciencia y apoyo que fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo de grado.

A mis padres Myriam y Jaime, y mis hermanos Cristian y María José por su apoyo incondicional en cada paso que he dado.

A mi amiga María Antonia por su amistad, confianza, colaboración y acompañamiento en toda la maestría.

A Milena Cárdenas, Camilo Cárdenas, Johana Araque, Yecenia Hernández, María de los Ángeles Bohórquez, Paola López y Mary Pedraza; por su amistad; por los buenos momentos en estos últimos años.

A todas las personas que no he nombrado y que contribuyeron de una u otra forma para la culminación con éxito del presente proyecto. Sin ellos el balance de este periodo de formación no sería tan positivo como lo es.



## Tabla de Contenido

### Contenido

<b>CAPITULO 1.</b> ....	<b>9</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>1.2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>1.3. MARCO CONCEPTUAL</b> .....	11
<b>1.3.1. Arsénico</b> .....	11
<b>1.3.2. Fitorremediación</b> .....	12
<b>1.3.3. Giberelinas</b> .....	13
<b>1.3.4. El aliso (<i>Alnus acuminata</i>)</b> .....	14
<b>1.3.5. Minería en Colombia</b> .....	15
<b>1.4. ESTADO DEL ARTE</b> .....	16
<b>1.4.1. Efectos negativos del arsénico en plantas</b> .....	16
<b>1.4.2. Tolerancia al arsénico</b> .....	16
<b>1.4.3. Potencial de <i>Alnus</i> en recuperación de suelos degradados o contaminados</b> .....	18
<b>1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	19
<b>1.6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
<b>1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	20
<b>1.8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	21
<b>1.9. METODOLOGÍA</b> .....	21
<b>1.9.1. Adquisición de semillas</b> .....	21
<b>1.9.2. Prueba de Corte y vigor de semilla</b> .....	21
<b>1.9.3. Prueba de viabilidad (Test de tetrazolio)</b> .....	21
<b>1.9.4. tratamientos pregerminativos</b> .....	21
<b>1.9.5. Variables y parámetros germinativos</b> .....	25
<b>1.9.6. Análisis estadístico</b> .....	25
<b>1.10. BIBLIOGRAFIA</b> .....	26
<b>1.11. PRODUCTOS</b> .....	32
<b>1.12. IMPACTO</b> .....	32
<b>CAPITULO 2. ¿La giberelina aumenta la aclimatación de plántulas de <i>Alnus acuminata</i> al arsénico?</b> .....	<b>33</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Descripción general de la metodología .....	23
<b>Figura 2</b> Unidad experimental 0,5 gramos de semillas.....	24
<b>Figura 3</b> Cajas donde se depositaron las semillas de aliso .....	24
<b>Figura 4</b> Preparación de sustrato: Turba-arena 2:1 .....	24
<b>Figura 5</b> trasplante de plántulas de aliso .....	24

## Índice de anexos

<b>Anexo 1</b> Semillas viables de <i>A. acuminata</i> .....	34
<b>Anexo 2.</b> Plántulas de aliso de 30 días .....	34





## **CAPITULO 1.**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

El arsénico, es un metaloide que se distribuye ampliamente en el medio ambiente debido a procesos naturales como la meteorización de rocas, emisión volcánica y factores antropogénicos entre los cuales están la minería, la combustión, los plaguicidas y los herbicidas que aumentan la contaminación por arsénico en los suelos y las aguas subterráneas (Fitz & Wenzel, 2002). Este elemento es muy tóxico a bajas concentraciones en todos los organismos vivos. Los humanos pueden estar expuestos a la toxicidad del arsénico a través de vegetales contaminados, ingesta de agua contaminada y algunos productos de origen animal (Danh *et al.*, 2014).

Las concentraciones de As en suelos no contaminados suelen ser inferiores a 10 mg kg<sup>-1</sup>; las concentraciones elevadas de metales pesados esenciales y no esenciales en el suelo pueden provocar síntomas de toxicidad y la inhibición del crecimiento de la mayoría de las plantas (Hall, 2002; Neha *et al.*, 2018).

Los métodos convencionales para la remediación de suelos contaminados con metales incluyen técnicas físicas y químicas. Afectan las propiedades del suelo, destruyen la biodiversidad y pueden inutilizar el suelo como medio para el crecimiento de las plantas (Padmavathiamma & Li, 2007). Los tratamientos físicos implican la eliminación de sitios contaminados (excavación del suelo), enterramientos profundos (rellenos de tierra) y taponamiento (Danh *et al.*, 2014).

Actualmente se están desarrollando un conjunto de tecnologías que reducen la concentración de diversos compuestos a partir de procesos biológicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas conocido como fitorremediación (Delgadillo *et al.*, 2011; Aishah *et al.*, 2019).

Un paso importante hacia el desarrollo de la fitorremediación de suelos impactados por As es el reciente descubrimiento de helechos hiperacumulantes como *Pteris vittata* y *Pityrogramma calomelanos*. Ambas plantas producen gran biomasa y, por lo tanto, son candidatos prometedores para fines de fitoextracción (Ma *et al.*, 2001; Fitz & Wenzel, 2002). Algunos estudios previos han informado sobre el uso de diferentes plantas hiperacumulantes de metales y metaloides *Brassica napus*, (Ali *et al.*, 2013) *Holcus lanatus* (Meharg & Macnair, 1990) *Brassica juncea* (Rahman *et al.*, 2018), *Brassica rapa* (Tidwell & Ayers, 2011), *Hordeum distichon* (García *et al.*, 2010).



La tolerancia a metales pesados y metaloides en las especies herbáceas se ha investigado profundamente, ya que estas crecen rápidamente, son fáciles de propagar y capaces de acumular metales pesados, a pesar de esto, la mayoría de estas especies bioacumuladoras tienen un ciclo de vida corto (Kumar & Kumar, 2019), razón por la cual, se propone estudiar una planta leñosa que aunque con menor capacidad de bioacumulación podrían tener la ventaja de secuestrar por más tiempo los contaminantes (Mahar *et al.*, 2016; Aishah *et al.*, 2019). En las últimas décadas el género *Alnus* ha sido estudiado en depuración de metales pesados en suelos con exitosos resultados en cromo y plomo (Escobar & Dusán, 2016).

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Por ser *A. acuminata* un árbol representativo con potencial forestal y de recuperación de ecosistemas intervenidos en alta montaña surge la necesidad de definir si esta especie es válida para la recuperación de suelos post-mina, para ello, es importante conocer su comportamiento fisiológico, las cualidades germinativas que presentan las semillas, y su respuesta frente al ácido giberélico, para romper la latencia y determinar la dosis adecuada que propicie una rápida germinación y un mayor vigor en la plántulas. Adicionalmente, evaluar si este tratamiento hormonal proporciona a la planta una mejor adaptación durante su crecimiento primario bajo contaminantes como el arsénico, que frecuentemente está presente en suelos de minería de carbón.

Esta evaluación permitirá comprobar si es posible potenciar la tolerancia de esta especie a metales pesados, por otro lado, se pretende confirmar las informaciones recomendadas de germinación por las casas de venta de semillas o especificarlas mejor para el cultivo forestal de esa especie.

## 1.3. MARCO CONCEPTUAL

### 1.3.1. Arsénico

El arsénico es un metaloide presente de forma abundante en el medio ambiente y en los organismos vivos se considera tóxico, aún en bajas concentraciones; la exposición a largo plazo al arsénico, puede causar enfermedades de piel, vejiga, cánceres de pulmón, próstata, enfermedades cardiovasculares, así como problemas reproductivos, trastornos inmunológicos y neurológicos (Danh *et al.*, 2014).



Este elemento es un contaminante ambiental ya sea por actividades naturales como las emisiones volcánicas, la meteorización de rocas o actividades antropogénicas, como la minería, la combustión y por parte de los agricultores mediante el uso de plaguicidas y herbicidas; estos químicos aumentan la contaminación en suelos y aguas subterráneas, a los que a través del consumo de vegetales contaminados, por medio del suelo y el agua de riego o productos de origen animal, las personas pueden estar expuestos a este tipo de tóxicos. (Danh *et al.*, 2014; López *et al.*, 2016).

Los constituyentes del suelo (arcillas, carbonatos, materia orgánica y óxidos e hidróxidos), intervienen en la movilidad del arsénico (As) y determinan su variación espacial esta movilidad se deben en gran medida a su especiación y esta a su vez depende de diversos factores químicos, físicos y biológicos (Rodríguez *et al.*, 2016).

Los sitios más propensos para encontrar esta contaminación con metales y metaloides son las zonas industriales; si bien muchos fertilizantes originalmente contenían arsénico y plomo; estos sitios industriales contaminados a menudo son estériles, lo que aumenta el riesgo de contaminación a gran escala porque el suelo puede ser transportado fácilmente por el viento o la escorrentía (Tidwell & Ayers, 2011).

### 1.3.2. Fitorremediación

Actualmente para mitigar los efectos de estos metales en el suelo una tecnología que está en auge es la fitorremediación la cual se enfoca en utilizar plantas, bacterias o técnicas de carácter agronómico con el fin de reducir las concentraciones y los efectos tóxicos de los contaminantes en el suelo. Se están explorando nuevos hiperacumuladores de metales para ser usados en suelos de minería (Chaney *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2013; Escobar & Dussán 2016). Estas tecnologías se pueden aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos (Arthur *et al.*, 2005), entre las que se resaltan:

**Fitoextracción:** Esta técnica consiste en absorber contaminantes del suelo y acumularlos en diferentes partes de la planta como en raíces y hojas (Antosiewicz *et al.*, 2008; Tidwell & Ayers, 2011).



**Fitoestabilización:** es el uso de plantas para reducir los contaminantes en el entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio (Mueller, 1999).

**Fitoinmovilización:** es el uso de las raíces de las plantas para fijar los contaminantes que hay en el suelo. (Arthur *et al.*, 2005).

**Fitovolatilización:** uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio y del aire mediante su volatilización a través de sus folíolos (Henry, 2000).

**Fitodegradación:** uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos (Arthur *et al.*, 2005).

**Rizofiltración:** uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros efluentes acuosos (Carpena & Bernal, 2007).

Algunas plantas capaces de acumular concentraciones de metales pesados y metaloides son conocidas como hiperacumuladoras por esta razón las zonas altamente contaminadas no previstas para fines agrícolas puede cubrirse con vegetación capaz de soportar altas concentraciones de compuestos tóxicos en el suelo, lo que limita su lixiviación al agua subterránea (Antosiewicz *et al.*, 2008).

Sin embargo, el éxito de la fitorremediación se puede ver un poco limitado por factores propios de cada especie vegetal como lo es el tiempo de crecimiento, profundidad de raíz, desarrollo temprano; y factores medioambientales como el clima, la química del suelo y nivel de contaminación (Salido *et al.*, 2003).

### **1.3.3. Giberelinas**

Los fitorreguladores influyen el crecimiento y el desarrollo de las plantas, pudiendo promover, inhibir, o modificar los procesos fisiológicos y, así, controlar las actividades de los meristemos (Pedroso *et al.*, 2017). Las giberelinas son sintetizadas en muchas partes de la planta, pero más especialmente en áreas de crecimiento activo como los embriones o tejidos meristemáticos (Mandujano *et al.*, 2007). Además, poseen más de un sitio de acción en la estructura de la semilla y están estrechamente relacionadas con la terminación de la latencia embrionaria (Deaquiz & Burgos, 2013)

Esta hormona, juega un papel muy importante en la germinación, control y promoción de las semillas; ya que este es un proceso complejo, controlado tanto



por factores físicos como factores internos (Gupta & Chakrabarty, 2013). La germinación se inicia debido a que ella, produce una estimulación activandola síntesis de enzimas y las reservas almacenadas en el endospermo, provocando alargamiento celular e inicio de la germinación (Silva *et al.*, 2018, Miransaria & Smithc, 2014). Adicionalmente, estudios evidencian que este mecanismo altera la membrana celular incrementando, su permeabilidad (Abou-Quad, 2007, Deaquiz & Burgos, 2013) y por ende causando un debilitamiento en el endospermo (Voegelé *et al.*, 2011)

Asi mismo, cuando las giberelinas se utilizan de forma exógena pueden acelerar el crecimiento y desarrollo, pues actúan directamente en el estiramiento, la división celular, la permeabilidad de la membrana celular, en la actividad enzimática, en la variación en potencial osmótico y en la movilización de azúcares. Sin embargo, el efecto de bioestimulante además de ser dependiente de los factores ambientales como luz, temperatura y agua, depende también de la concentración que se utilice, del número de aplicaciones, de la época de aplicación y de la especie o cultivar (Hack *et al.*, 2018; Gupta & Chakrabarty, 2013).

#### **1.3.4. El aliso (*Alnus acuminata*)**

El aliso (*Alnus acuminata*) es un árbol nativo de América Central y América del Sur, se extiende desde México hasta Argentina (Araya *et al.*, 2000); en algunos casos pueden alcanzar una altura de 30 metros, las hojas son deciduas, simples y con una o dos hileras de dientes en los bordes, con gran biomasa (Stimm *et al.*, 2008). Las flores pequeñas se encuentran en amentos o grupos de una estructura con forma de cono. Las flores femeninas y masculinas están en amentos separados, pero ambos en la misma planta. Los frutos son pequeños y con forma de cono, con escamas y casi leñosos (Russo, 1990; Esperón & Barradas, 2014).

*Alnus acuminata* tiene la capacidad de dejar caer su follaje en tiempo seco para evitar el estrés hídrico. (Esperón & Barradas, 2014). Esta especie presenta nódulos que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y micorrizas que permiten el mejoramiento del suelo, su madera es de muy buen porte y por ello se considera una especie de valor económico que contribuye al progreso de las regiones en las cuales se cultiva y ayuda a la recuperación de los suelos (Tovar & Cogua, 1990).

En Colombia, la especie nativa está distribuida en la franja altitudinal comprendida entre los 2.000 y 3.000 msnm y ha ido adquiriendo importancia en la medida en



que se ha reconocido su valor como recurso forestal, por el aporte de nitrógeno al suelo y la posibilidad de emplearla en zonas que por efecto de la pendiente y uso irracional de suelos, presentan problemas de erosión (Niño *et al.*, 1987; Ospina *et al.*, 2005).

### 1.3.5. Minería en Colombia

La industria minera es una de las actividades económicas más importantes actualmente en Colombia, se caracteriza por la producción minera especialmente de carbón, níquel, esmeraldas, oro y materiales de construcción (Ministerio de minas y energía, 2016)

Cabe resaltar que la actividad minera en Colombia tiene varias escalas y estándares de producción y manejo ambiental. Por un lado, está la minería de pequeña escala, se trata de una actividad con bajo conocimiento de los recursos y las reservas, lo que impacta negativamente sus procesos de planificación, con elevados costos de producción y transacción y con limitado uso de tecnología en sus procesos. No obstante, esta minería, que reúne a los mineros de menores ingresos, cuenta con gran capacidad paragenerar empleo y en algunos casos, como las esmeraldas, el oro y el carbón metalúrgico, dar valor agregado al mineral explotado. Otro tipo de proyectos son los de mediana escala de producción: los hay en minerales como carbón en el interior del país, en esmeraldas en Cundinamarca y Boyacá, en cobre en Chocó, en metales preciosos en Antioquia y Caldas; y también de materiales de construcción, arcilla y caliza en varias zonas del país. Estos proyectos se caracterizan porque obtienen mayor conocimiento de los recursos y reservas, lo que fortalece su planeación minera, cumplen con las normas laborales y de seguridad e higiene minera, efectúan un buen aprovechamiento del mineral y manejan los impactos que se podrían generar en el medio ambiente y su entorno social. (Ministerio de minas y energía, 2016)

Una de las mayores preocupaciones actuales en el mundo con el uso del carbón es el impacto ambiental generado por algunos elementos traza que a pesar de encontrarse en muy bajas concentraciones, son muy nocivos, en particular, para la salud humana (Morales & Carmona, 2007)

En los departamentos de Boyacá y Cundinamarca la producción de carbón tiene antecedentes milenarios en la cultura muisca, para la elaboración de cerámicas. Sin embargo, tradicionalmente allí esta ha sido una actividad destinada a cubrir la demanda industrial doméstica, aun cuando se ha basado en una producción



artesanal de muy pequeña escala; durante el siglo veinte la producción de carbón en estos departamentos fue variable, aumentando y disminuyendo de acuerdo con el precio y la demanda de las principales plantas hidroeléctricas y térmicas de la región. La falta de desarrollo empresarial de la industria decarbón contrasta con las vastas reservas y su alta calidad. El carbón del norte de Cundinamarca y Boyacá es de la mejor calidad del país, dado que permite la obtención de coque, producto indispensable para la producción de hierro (Rudas, 2014).

## **1.4. ESTADO DEL ARTE**

### **1.4.1. Efectos negativos del arsénico en plantas**

El arsénico es un elemento tóxico no esencial para el crecimiento de las plantas y desarrollo (Singh *et al.*, 2016). Las plantas se hallan expuestas al As presente tanto en el agua de riego como en el suelo. Las formas inorgánicas son absorbidas a través de diferentes transportadores y son transformadas y movilizadas a otros tejidos de la planta. Varios estudios han reportado que el As afecta el crecimiento y la germinación de las plantas, causa estrés oxidativo, disminuye la absorción de fósforo, produce inhibición en la elongación radicular y una disminución tanto en la proliferación celular como en la producción de biomasa (Rodríguez *et al.*, 2016)

El arsénico interfiere en el metabolismo de la planta inhibiendo su crecimiento y también puede influir la absorción de nutrientes al competir directamente con los nutrientes y / o alterando procesos metabólicos (Farnese *et al.*, 2014)

Uno de los efectos más dañinos de los metales pesados y metaloides en las plantas es el estrés oxidativo mediado por el aumento en la producción de oxígeno reactivo intermedios (Alves *et al.*, 2014). La presencia de este metaloide en el desarrollo de las plantas reduce el crecimiento, interfiere con el proceso metabólico y disminuye la germinación de las semillas (Smith *et al.*, 2010). Consecuentemente, afecta la fotosíntesis, la fluorescencia de clorofila y resistencia estomática (Monni *et al.*, 2001).

### **1.4.2. Tolerancia al arsénico**

Las plantas han desarrollado estrategias para evitar la toxicidad con metales pesados al excluir o almacenar elementos minerales en sus partes vegetales; Sin embargo, varias especies de plantas con alta tolerancia interna a un elemento





mineral tóxico pueden acumular enormes cantidades de elemento, particularmente en los tejidos de los brotes. A estas plantas se les conoce con el nombre de 'hiperacumuladoras' (Watanabe *et al.*, 2014).

Ma *et al.*, en el 2001, reportaron la primera planta capaz de acumular arsénico, el helecho de freno chino, *Pteris vittata* L., que puede acumular grandes cantidades de arsénico en su biomasa aérea, esta investigación es muy importante para comprender los mecanismos de tolerancia y acumulación de arsénico en este helecho y proporciona conocimiento valioso para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con este metal.

De igual manera en el 2008 un estudio buscaba identificar y caracterizar especies de plantas tolerantes al arsénico en una mina de Polonia y evaluar su uso potencial en fitorremediación; para esto, tomaron partes de planta y del suelo y fueron analizados para las concentraciones de As y Mn acompañante, Fe, Mg, Ca, Al, Cu, Zn, Ba, Pb, Ni, Cs, V, Cr, Sr, Rb, Bi, Mo y U. La capacidad de las especies identificadas para modificar la cantidad de arsénico biodisponible en su rizosfera fue determinada por extracciones individuales de muestras de suelo y como resultado no encontraron plantas hiperacumuladoras de arsénico; sin embargo, la especie *Calamagrostis arundinaca* fue capaz de disminuir la concentración total de As dentro de la raíz en relación con el suelo de referencia (Antosiewicz *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2014) investigaron la aplicación foliar con arsénico para detectar plantas que acumulan metal, para ello evaluaron 34 herbáceas y 17 leñosas, encontrando que *Chelidonium majus* var. asiaticum es una herramienta útil en la fitoestabilización de As, ya que esta especie acumuló un nivel de As relativamente alto; también, sugieren que el método de aplicación foliar es una forma útil y de alto rendimiento para detectar plantas disponibles para la fitoextracción (Zhang *et al.*, 2014)

En cuanto a la germinación de las semillas del genero *Alnus* se destaca varias investigaciones, una de ellas fue realizada para determinar la latencia y germinación de semillas del aliso común (*Alnus glutinosa* L.) desarrollados por Gosling, McCartan, y Peace 2009 donde resaltan el potencial de esta especie para adaptarse al cambio climático; los autores encontraron que las temperaturas óptimas para una germinación significativa (casi 100%.) dentro de los 14 días a temperaturas constantes son 20, 25 y 30 °C.



En el 2007 en un estudio en Nuevo León, México se propuso una especie de Asteraceae que presentó efectos positivos en la restauración postmina esta especie *Brickellia veronicifolia* de la fue la que mayor área restaurada esta especie mostró una alta tolerancia a la presencia de metales pesados, y se sugiere ser utilizada en la restauración de zonas sometidas a la explotación minera (Marroquín *et al.*, 2017).

En el 2005 y 2007 De Atrip y colaboradores (De Atrip *et al.*, 2007) evaluaron el contenido de humedad de la semillas de *Alnus glutinosa* y *Betulus pubescens* la respuesta de las semillas en la germinación. Las semillas de dos lotes de cada especie fueron sometidas a combinaciones de tratamientos de enfriamiento; después del tratamiento, se indujo que las semillas germinaran durante 56 días a temperaturas constantes de 7.5, 10, 15, 20, 25 o 30 °C. La respuesta a la temperatura y el pretratamiento difirió entre las especies de *Alnus glutinosa* y *Betulus pubescens*. En aliso, las semillas germinaron bien en todo el rango de temperaturas, mientras que hubo una temperatura óptima (22 a 23°C) para semillas, y para las semillas de *Betulus* el rango de temperatura óptimo se consideró entre 7.5 y 30°C (De Atrip & O'Reilly, 2007; De Atrip *et al.*, 2007).

(Rahman *et al.*, 2018) realizaron un estudio donde concluyeron que *B. juncea* puede utilizarse para la fitoacumulación de arsénico manteniendo las prácticas agronómicas habituales. donde la absorción de arsénico fue de hasta 1% de la biomasa total de la planta.

#### **1.4.3. Potencial de *Alnus* en recuperación de suelos degradados o contaminados.**

El aliso es una especie importante en cuanto a la recuperación de suelos ya que desarrollo endosimbiosis en sus raíces con el actinomicete *Frankia*, formando nódulos. El hongo obtiene el carbono y las fuentes de energía que precisa, aportando a cambio la fijación del nitrógeno atmosférico en forma asimilable por la planta y en cantidad suficiente para sostener su desarrollo normal y enriquecer el ecosistema con este elemento (Muñoz & Cobos, 1986).

Debido a sus características autoecológicas el cerezo o aliso fue una de las primeras especies nativas que se utilizó en programas de reforestación en el país. Las primeras plantaciones se establecieron en la cuenca del río Blanco, municipio de Manizales, hace ya cerca de 40 años. Las experiencias con la especie en la región central andina de Colombia han mostrado una excelente adaptación a las



condiciones climáticas y edáficas predominantes en esa región y actualmente está siendo utilizada como componente de sistemas silvopastoriles, los cuales son de gran interés en el contexto de encontrar tecnologías apropiadas para el uso y manejo del suelo en cuencas hidrográficas. Las características de la madera de cerezo la hacen atractiva en el mercado maderero local y las posibilidades de utilización son más amplias cada vez (Del Valle & Gonzalez, 1988).

Otro estudio con el fin de evaluar las técnicas para promover la germinación de las especies de olmo rojo, aliso gris y buffalo ya que estas semillas presentan problemas de latencia desconocidos. Las semillas fueron sometidas a varias ppm de ácido giberélico ( $GA_3$ ), 250, 500 o 1000 ppm; los resultados indicaron el uso de ácido giberélico en altas concentraciones es efectivo con semillas de olmo rojo y buffalo mientras que para el aliso las condiciones fueron diferentes pues este presentó una mala germinación y concluyeron que la propagación de semillas puede no ser una opción viable para la producción en masa de esta especie (Morales *et al.*, 2012).

En Colombia son escasos los estudios realizados para evaluar la germinación y la acumulación de metales pesados por parte de especies vegetales, sin embargo, existe un estudio realizado en las orillas del río Bogotá con la especie *Alnus acuminata* ssp. *acuminata* en el cual se realizaron mediciones de Pb y Cr en las raíces, tallo, hojas, y el suelo, y se midió la altura de la planta el número de hojas, y el porcentaje de clorofila.; como resultado se observó que Pb era acumulado en las raíces, mientras que Cr se encontró en los tallos, por lo tanto, el resultado relevante de esta investigación sugiere a la especie *A. acuminata* ssp. *acuminata* como un árbol adecuado para la fitorremediación de metales a lo largo de las orillas de ríos contaminados (Escobar & Dussán 2016). En otro estudio se comprobó que *A. acuminata* presenta tolerancia germinativa al arsénico en concentraciones similares a las de suelos de minería de carbón (Ramos-Montaño 2018).

## 1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La especie *Alnus acuminata* Kunth ha sido muy utilizada en sistemas agroforestales y en plantaciones puras; esta planta desarrolla abundante follaje y tiene capacidad para restaurar cuencas y suelos degradados; aunque se encuentran algunos reportes de especies de este género a la fecha no existe un estudio fundamentado donde se conozcan aspectos básicos sobre su germinación. Las casas comerciales de semillas manifiestan que para germinar



esta especie solo es necesario una pre-imbibición durante 24 horas, además que su viabilidad y longevidad son muy bajas.

Por otro lado, Boyacá es un departamento donde gran parte de la economía se basa en la minería; este ejercicio deja como consecuencia suelos contaminados y que requieren de intervención; el principal problema es que los propietarios de las mineras que están obligados a reforestar los suelos posminería lo hacen usando especies foráneas como el pino y el eucalipto, es por esa razón que ha surgido la necesidad de tecnologías efectivas y de bajo costo capaces de reducir metales pesados como el arsénico presente en el suelo es primordial investigar una especie que posea potencial de fitorremediación de arsénico. Lo que se pretende es buscar una especie de distribución neotropical que tenga capacidades de tolerancia a elementos altamente tóxicos como el arsénico.

*A. acuminata*, cuenta con propiedades muy importantes como su capacidad de crecimiento, la retención de agua y la recuperación de suelos degradados; no obstante, la capacidad específica de fitorremediación en suelos contaminados por metaloides es desconocida, por esto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la germinación de las semillas de aliso y determinar la tolerancia al arsénico aplicando diferentes dosis de giberelina con el fin de romper la latencia de las semillas y producir plántulas aclimatizadas y de esta forma reducir la contaminación por metaloides en suelos con fines de restauración en suelos de minería y carbón.

## 1.6. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) sobre la germinación de semillas Aliso (*Alnus acuminata*) en respuesta a exposición a arsénico.

## 1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la concentración adecuada para inducir la germinación o el vigor de la semilla de Aliso (*Alnus acuminata*).
- Establecer si un tratamiento hormonal ayuda a la planta a adaptarse durante su crecimiento primario, a contaminantes como el arsénico, que está presente en suelos de minería de carbón.
- Confirmar las recomendaciones dadas para la germinación por parte de las



casas comerciales de semillas o especificarlas mejor para el cultivo forestal de esa especie.

## **1.8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La aplicación de giberelinas aumenta la tolerancia al arsénico en estadios primarios de desarrollo en plantas de aliso?

## **1.9. METODOLOGÍA**

### **1.9.1. Adquisición de semillas**

Se adquirieron semillas certificadas de *Alnus acuminata* en diciembre del año 2017 de la empresa semillero forestal un proveedor nacional de semillas comerciales con un porcentaje de germinación del 27% y pureza de un 65%.

### **1.9.2. Prueba de Corte y vigor de semilla**

Para la verificación de la viabilidad de las semillas se realizaron tres pruebas de corte con un intervalo de 100 días entre cada prueba; se les realizó un corte longitudinal de las semillas para observar la morfología interna y determinar si las semillas están llenas, vacías o infestadas.

### **1.9.3. Prueba de viabilidad (Test de tetrazolio).**

La viabilidad de las semillas se determinó utilizando la prueba de viabilidad de 2, 3, 5 trifenil cloruro de tetrazolio (TTC). Se colocaron las semillas en pre-imbibición a temperatura ambiente por 48 horas y se seccionarán longitudinalmente. Mediante este test se buscó determinar la viabilidad de acuerdo a la coloración del embrión de las semillas (International Seed Testing Association (ISTA), 2013; Rao *et al.*, 2007).

### **1.9.4. tratamientos pregerminativos**

Posteriormente se realizó otro ensayo para evaluar el efecto de dosis del ácido giberélico y diferentes concentraciones de arsénico, en total se establecieron 8 tratamientos con 5 repeticiones por tratamiento; la unidad experimental tomada fue de 0,5 gramos de semillas de aliso y se pre-embebieron las semillas por 24 horas

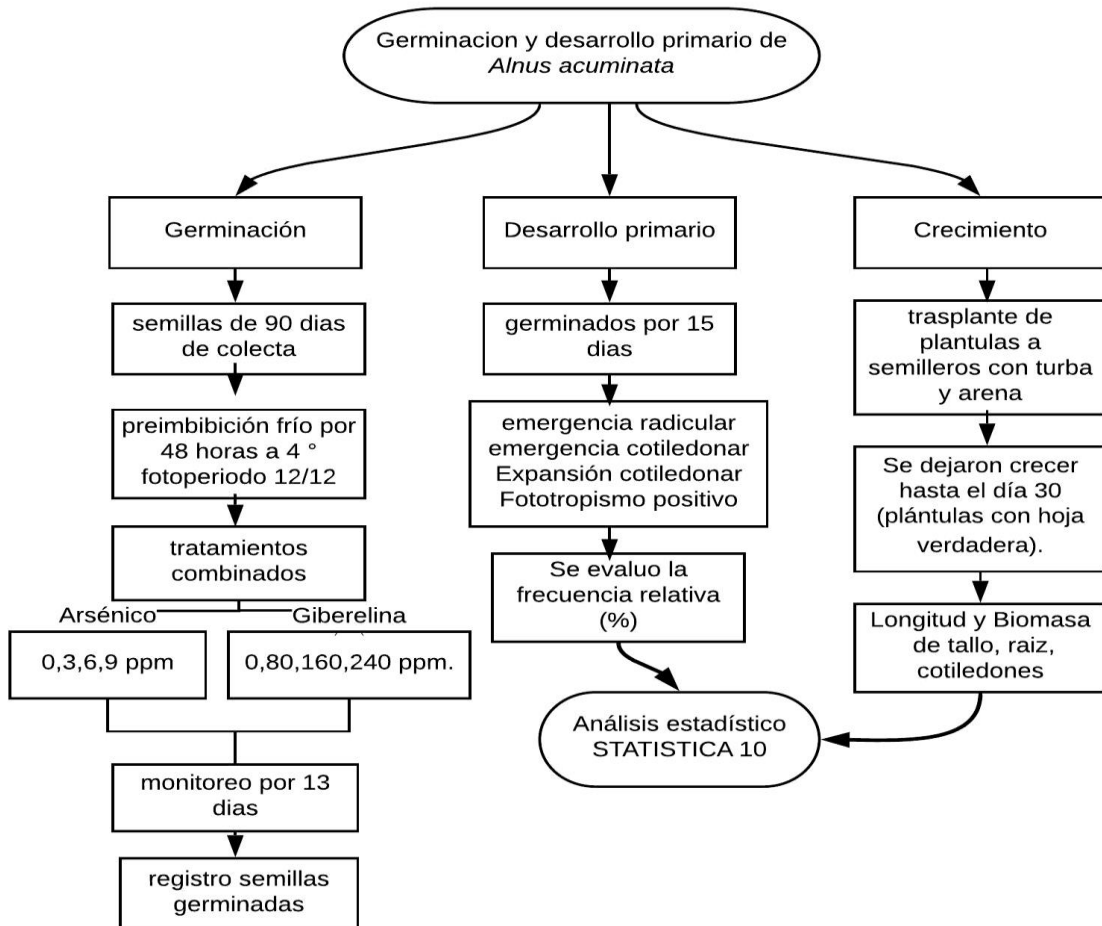


a temperatura de 3 °C siguiendo lo propuesto por Ramos-Montaño (2018). Los tratamientos que se evaluaron fueron:

1. Control: Se utilizaron 0,5 gramos de semillas y cinco replicas las cuales fueron designadas como testigos y correspondieron a semillas que no se sometieron a ningún tratamiento pregerminativo con el fin de evaluar el efecto del pretratamiento.

2. Concentraciones de solución con Ácido giberélico ( $GA_3$ ): Para determinar el efecto de las giberelinas y cuál es la concentración óptima para la germinación, se sometieron las semillas a 80, 160 y 240 ppm de  $GA_3$ .

3. Concentraciones de solución de arsenato de sodio: las semillas se sometieron a concentraciones de As de (3, 6 y 9 ppm). El As utilizado fue arsenato de sodio heptahidratado ( $NaHAsO_4 \cdot 7H_2O$ ), el cual fue disuelto para la preparación de una solución stock de alta concentración; combinada con las diferentes concentraciones de giberelinas para un total de 16 tratamientos (Figura 1).



**Figura 1** Descripción general de la metodología

Durante la parte de germinación del ensayo se separaron las semillas en grupos de 0,5 gramos y se colocaron sobre papel filtro en bandejas desechables; (Figura 2 y 3); se mantuvieron condiciones de luz y temperatura controlada 12 horas en oscuridad a 20°C y 12 horas con luz a 30°C, en la cámara germinadora del laboratorio de biotecnología de SENA CEDEAGRO Duitama.

Periódicamentedurante 12 días se les hizo seguimiento a los germinados resultantes para establecer la frecuencia relativa con la cual se alcanzaban los diferentes estados de desarrollo: Emergencia radicular, expansión cotiledonar, fototropismo positivo, presencia de primera hoja verdadera, presencia de dos o más hojas verdaderas y sobrevivencia de plántulas al final de 13 días.



**Figura 3** Unidad experimental 0,5 gramos de semillas



**Figura 2** Cajas donde se depositaron las semillas de aliso

Posteriormente las semillas se trasladaron al municipio de Arcabuco en donde se sembraron los germinados en bandejas con sustrato de turba estéril y arena de río en proporción 2:1 (Figura 4 y 5).



**Figura 5** Preparación de sustrato: Turba-arena 2:1



**Figura 4** trasplante de plántulas de aliso





### 1.9.5. Variables y parámetros germinativos

La evaluación de la germinación se determinó cada 48 h, durante 15 días siguiendo la metodología ISTA (2009) y el índice de velocidad de germinación (IVG) siguiendo la fórmula de Imram *et al.*, 2005.

$$IVG = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{Tiempo de germinación}}$$

El tiempo medio de germinación (TMG) y velocidad media de germinación (VMG), de acuerdo a Ranal & García (2006):

$$TMG = \frac{\sum_{i=1}^k ni * ti}{\sum_{i=1}^k ni}$$

$$VMG = \sum (ni/ti)$$

Porcentaje de germinación.  $PG = (N/Ns) \times 100$

$$PG = \left( \frac{N}{Ns} \right) * 100$$

Dónde: N= Numero de semillas germinadas y Ns= Numero de semillas totales

### 1.9.6. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables germinativas evaluadas se aplicó un diseño factorial con 4 componentes: efecto factor A + efecto factor B + efecto de la interacción AxB + error. Los datos obtenidos para las variables germinativas se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), con un valor de significancia de  $P > 0.05$  siguiendo el modelo estadístico, y el efecto de los tratamientos sobre el conjunto de variables morfométricas de los germinados fue evaluado con un análisis multivariado de varianzas (MANOVA). los análisis estadísticos se realizaron utilizando software STATISTICA 10 (StatSoft Inc. 1984-2011).



## 1.10. BIBLIOGRAFIA

- Abou, Q. H. 2007. Effect of scarification, gibberellic acid and scarification on seed germination of three *Pistacia* species. *A-Njah Univ. J. Res. (N. Sc.)* 21: 1-11.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Aishah, R. M. Shamshuddin, J. Fauziah, Arifin A C.H Panhwar, Q. A Using Plant Species for Phytoremediation of Highly Weathered Soils Contaminated with Zinc and Copper with Application of Sewage Sludge. In “Phytoremediation of soils,” *BioResources*14(4), 8701-8727.
- Alves, L. G., Alves, J., Teles, A. R., Santos, F. F., & Soares, G. G. (2014). Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 143–151. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.784815>
- Antosiewicz, D. M., Escudé-Duran, C., Wierzbowska, E., & Skłodowska, A. (2008). Indigenous plant species with the potential for the phytoremediation of arsenic and metals contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 193(1–4), 197–210. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9683-2>
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., & Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y el ácido giberélico sobre la germinación in vitro (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 24, 75–80.
- Arthur, E.L., Rice, P.J., Rice, P.J., Anderson, T.A., Baladi, S.M., Henderson, K.L. and Coats, J.R. (2005). Phytoremediation an overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*,24(2): 109-122, <https://doi.org/10.1080/07352680590952496>
- Carpaena, R. O., & Bernal, P. (2007). Fitorremediación de suelos contaminados Claves de la fitorremediación : fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, 16(2), 1–3.
- Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., & Baker, A. J. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80004-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80004-3)
- Danh, L. T., Truong, P., Mammucari, R., & Foster, N. (2014). A Critical Review of the Arsenic Uptake Mechanisms and Phytoremediation Potential of *Pteris vittata*. *International Journal of Phytoremediation*, 16(5), 429–453. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.798613>
- De Atrip, N., & O’Reilly, C. (2007). Germination response of alder and birch seeds to applied gibberellic acid and priming treatments in combination with chilling. *Annals of Forest Science*, 64(4), 385–394.



<https://doi.org/10.1051/forest:2007015>

- De Atrip, N., O'Reilly, C., & Bannon, F. (2007). Target seed moisture content, chilling and priming pretreatments influence germination temperature response in *Alnus glutinosa* and *Betula pubescens*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 22(4), 273–279. <https://doi.org/10.1080/02827580701472373>
- Deaquiz, O. Y., Burgos, A. Y. (2013) Efecto de la aplicación de Giberelinas (Ga3) sobre germinación de semillas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) Variedad Santa Cruz. *Conexión Agropecuaria JDC*. 3(2) 29-36.
- Del Valle, J. I., & Gonzalez, H. (1988). Rendimiento y crecimiento del cerezo (*Alnus jorullensis*) en la región Central Andina, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 41(1), 61–91. Retrieved from <http://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/28400>
- Delgado, A. E., González, C. A., Prieto, F., Villagómez, J. R., & Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 597–612.
- Escobar, M., & Dussán, J. (2016). Phytoremediation Potential of Chromium and Lead by *Alnus acuminata* subsp. *acuminata*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(4), 942–948. <https://doi.org/10.1002/ep>
- Esperón, M., & Barradas, V. (2014). Ecophysiological vulnerability to climate change: water stress responses in four tree species from the central mountain region of Veracruz, Mexico. *Reg Environ Change* DOI 10.1007/s10113-014-0624-x
- Farnese, F. S., Oliveira, J. A., Farnese, M. S., Gusman, G. S., Silveira, N. M., & Siman, L. I. (2014). Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. *Idesia*, 32(1), 99–106. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100012>
- Fitz, W. J., & Wenzel, W. W. (2002). Arsenic transformations in the soil rhizosphere plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99(3), 259–278. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00218-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00218-3)
- García, F. P., Prieto, J., Callejas, J., Román, A. D., & Méndez Marzo, M. (2010). Bioacumulación de arsénico en las etapas de desarrollo de la cebada maltera (*Hordeum distichon* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(1), 37–44.
- Gosling, P. G., McCartan, S. A., & Peace, A. J. (2009). Seed dormancy and germination characteristics of common alder (*Alnus glutinosa* L.) indicate some potential to adapt to climate change in Britain. *Forestry*, 82(5), 573–582. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp024>
- Grennan, A. K. (2006). Gibberellin metabolism enzymes in rice. *Plant Physiology*,



- 141(2), 524–526. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900192>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling and Behavior*, 8(9). <https://doi.org/10.4161/psb.25504>
- Hack, P. A., Wagner, J. A., Koseira, N. C., Da Silva, M., Stefani, R. A., & Fabiane, C. K. (2018). Giberelina e Substratos Na Produção e qualidade de Mudanças de arcazeiros amarelo e Vermelho. *Colloquium Agrariae*, 14(1), 35–48. <https://doi.org/10.5747/ca.2018.v14.n1.a188>
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.1>
- Henry, J.R. (2000). In An Overview of Phytoremediation of Lead and Mercury. NNEMS Report. Washington D.C. pp, 3-9.
- Imran, M. A., Sajid, Z. A., & Chaudhry, M. N. (2015). Arsenic (As) toxicity to germination and vegetative growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(5), 1993–2002. <https://doi.org/10.15244/pjoes/39553>
- International Seed Testing Association (ISTA). (2013). *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. (3rd Editio). Basserdorf, Switzerland.
- Kumar, V.& Kumar, P. (2019) A review on feasibility of phytoremediation technology for heavy metals removal. *Archives of Agriculture and Environmental Science* 4(3): 326-341. <https://doi.org/10.26832/24566632.2019.0403011>
- López Ortiz, C., Montañez Hernández, L Luévanos Escareño, M., Banu Kamaludeen, S., Rivera Guillen, M., Balagurusamy, N., & Morán Martínez, J. (2016). Bioquímica microbiana de arsénico: mecanicismos y potencial en biorremediación. In *Arsenico: Perspectiva Epidemiológica ambiental y de salud*.(p. 199).
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., & Kennelley, E. D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409(6820), 579–579. <https://doi.org/10.1038/35054664>
- Mandujano, M. C., Golubov, J., & Rojas-Aréchiga, M. (2007). Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactaceas y Suculentas Mexicanas*, 2, 46–52.
- Marroquín, J. J., Rodríguez, E., Jiménez, P. J., Aguirre, C. A., Mata, B. M., Rubio, C. A., & Chávez, C. C. (2017). Effect of post-mining restoration of the xerophytic scrub community, in Nuevo León, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 2017(120), 7–20. <https://doi.org/10.21829/abm120.2017.1262>
- Meharg, A. A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in



- arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154, 29–43.
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. (1990). An altered phosphate uptake system in *Holcus*. *New Phytologist*, 116(1), 29–35.
- Ministerio de minas y energía. (2016). Política minera de Colombia. Bases para la minería del futuro. In *Ministerio de Minas y Energía* (p. 62). <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8156>
- Miransaria, M. B., Smithc, D.L.(2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99, 110–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E., & Magel, E. (2001). Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 112(2), 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00125-1)
- Morales, B., Barden, C., Boyer, C., Griffin, J., Fisher, L., & Thompson, J. (2012). Improving Germination of Red Elm (*Ulmus rubra*), Gray Alder (*Alnus incana*) and Seeds with Gibberellic Acid. *USDA Forest Service Proceedings*. p.68.
- Morales, W., & Carmona, I. (2007). Estudio de algunos elementos traza en carbones de la Cuenca César - Ranchería, Colombia. *Boletín de Ciencias de La Tierra*, (20), 75–88. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/ca/revista/boletin-de-ciencias-de-la-tierra/articulo/estudio-de-algunos-elementos-traza-en-carbones-de-la-cuenca-cesar-rancheria-colombia>
- Mueller, B., Rock, S., Gowswami, D. & Ensley, D. (1999). Phytoremediation Decision Tree. – Prepared by - Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group; pp 1-36.
- Muñoz, M. C., & Cobos, J. M. (1986). Exudaciones gomosas en alisos (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertner asociadas con la presencia de hongos vasculares. *Bol. San. Veg. Plagas*, (12), 167–179.
- Neha, M. V., Yagnik, B. N., & Hitesh, A. S. (2018). Phytoremediation of Arsenic Contaminated Soil by Vegetation. *International Research Journal of Environmental Sciences*, 7(4), 27-36.
- Niño, L., Perez, R., Orozco, M., & De Granada, E. (1987). Procesos Morfológicos en la Iniciación y Desarrollo de Nódulos en Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.). *Agronomía Colombiana*, IV, 73–84.
- Ospina, C.M.; Hernandez R., R.J.; Gomez D., D.S.; Godoy B., J.A.; Aristizabal V., F.A.; Patiño C., J.N.; Medina O., J.A.(2005).El aliso o cerezo /*Alnus acuminata*/ H.B.K. spp *acuminata*/. Guía silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana. CENICAFÉ. Pp 37.
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(4), 105–126.



- <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
- Pedroso, L., Bertoldo, J. L., Marchi, B. D. A., Cruz, R. M., Souza, B., Lermen, C., & Alberton, O. (2017). Avaliação Dos Fitorreguladores Auxina E Giberelina Na Germinação E Crescimento Do Arroz. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Da UNIPAR*, 19(4), 241–245.  
<https://doi.org/10.25110/arqvet.v19i4.2016.6103>
- Rahman, M., Jakariya, M., Haq, N., & Islam, M. A. (2018). Prospect of phytoaccumulation of arsenic by *Brassica juncea* (L.) in Bangladesh. *International Journal of Phytoremediation*, 20(10), 1025–1032.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1452188>
- Ramos-Montaña, C. (2018). *Tolerância De Alnus acuminata (Aliso) Ao Arsênio, Durante a Germinação e o desenvolvimento inicial*. Universidade Federal de Viçosa.
- Ranal, M. A., & Santana, D. G. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-84042006000100002>
- Rao, N. K., Hanson, J., Ehsan Dulloo, M., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma. Bioersivity International*. [https://doi.org/ISBN 978-92-9043-757-4](https://doi.org/ISBN%20978-92-9043-757-4)
- Rodríguez, G. E., Segura, J. A., Orozco, M., & Fortis, H. P. (2016). Arsénico edáfico y su distribución en el distrito de riego 017: uso de métodos de interpolación. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 19–28.
- Rodriguez, M., Alvarez, C., Fernández, A., & Pérez A. (2016). Efecto del arsénico sobre plantas forrajeras de importancia pecuaria en la Argentina. *Investigación Veterinaria*. 18(1), 1–7.  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.01272/abstract>
- Rudas, G. (2014). La minería de carbón a gran escala en Colombia: impactos económicos, sociales, laborales, ambientales y territoriales. *Revista Análisis*, (1), 68.
- Russo, R. (1990). Evaluating *Alnus acuminata* as a component in agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 10, 241–252.  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.01272/abstract>
- Salido, A. L., Hasty, K. L., Lim, J., & Butcher, D. J. (2003). Phytoremediation of Arsenic and Lead in Contaminated Soil Using Chinese Brake Ferns (*Pteris vittata*) and Indian Mustard (*Brassica juncea*) Phytoremediation of Arsenic and Lead in Contaminated Soil Using Chinese Brake Ferns (*Pteris vittata*) and Indian. *International Journal of Phytoremediation*, 5(2), 89–103.  
<https://doi.org/10.1080/713610173>
- Silva, M. Da; Oliveira, L. S; Radaellij. C; Porto, A. H; Junior, A.W.



- (2018).Estratificación e uso de gi-berelina em sementes de *Psidium cattleianum*. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia, Guarapuava*. 11(3), 121-125. [https://doi: 10.5935 / PAeT.V11.N3.12](https://doi.org/10.5935/PAeT.V11.N3.12)
- Singh, A. P., Dixit, G., Kumar, A., Mishra, S., Singh, P. K., Dwivedi, S., ... Tripathi, R. D. (2016). Nitric Oxide Alleviated Arsenic Toxicity by Modulation of Antioxidants and Thiol Metabolism in Rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01272>
- Smith, S. E., Christophersen, H., Pope, S., & Smith, F. A. (2010). Arsenic uptake and toxicity in plants : integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil*, (327), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0089-8>
- Stimm, B., Beck E., Günter S., Aguirre N., Cueva E. , Mosandl R. and Weber M. (2008). Reforestation of Abandoned Pastures: Seed Ecology of native Species and Production of Indigenous Plant Material. Gradients in a tropical mountain ecosystem of Ecuador. *Ecological Studies*, Volume 198, V, 417-429.
- Tidwell, B. S., & Ayers, J. C. (2011). Phytoremediation of Arsenic and Lead Using *Brassica rapa*. *Young Scientist*, 19–21.
- Tovar, C., & Cogua, J. (1990). Sintomas de deficiencia de nutrimentos en aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.). *Agromonia Colombiana*, 7, 89–94.
- USDA. (2008). Betulaceae Birch family *Alnus* P. Mill. alder. In *The Woody Plant Seed Manual* (Vol. 10, pp. 232–240). <https://doi.org/10.2979/npj.2009.10.3.300>
- Voegele, A., Linkies, A., M"uller, K., Leubner-Metzger, G., 2011. Members of the gib-berellin receptor gene family *GID1* (Gibberellin Insensitive Dwarf1) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot*. 155, 1851–1870.
- Watanabe, T., Kouho, R., Katayose, T., Kitajima, N., Sakamoto, N., Yamaguchi, N., ... Osaki, M. (2014). Arsenic alters uptake and distribution of sulphur in *Pteris vittata*. *Plant, Cell and Environment*, 37(1), 45–53. <https://doi.org/10.1111/pce.12124>
- Zhang, Z., Sugawara, K., Hatayama, M., Huang, Y., & Inoue, C. (2014). Screening of As-Accumulating Plants Using a Foliar Application and A Native Accumulation of As. *International Journal of Phytoremediation*, 16(3), 257–266. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.773277>



### 1.11. PRODUCTOS

**Artículo:** ¿La giberelina aumenta la aclimatación de plántulas de *Alnus acuminata* al arsénico? **Revista:** Bosque **Estado actual:** Sometido.

**Poster:** XII Congreso Latinoamericano de Botánica. Poster: octubre de 2018, Quito – Ecuador.

**Ponencia:** Efecto de las giberelinas en la germinación de aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en presencia de arsénico. En SETAC Latin América 13th Biennial Meeting 15–18 septiembre de 2019, Cartagena de Indias-Colombia.

### 1.12. IMPACTO

La minería de carbón produce entre sus desechos liberación de distintos metales y metaloides contaminantes, entre estos el arsénico que presenta una alta preocupación por su toxicidad tanto para la salud humana como para el medio ambiente; es por esto que el presente trabajo aporta información a la línea de los programas de compensación y recuperación de suelos asociados a la minería de carbón en Boyacá por su capacidad para crecer en sitios contaminados por este metaloidela cual puede ser usada por la comunidad científica y por los entes de control y manejo del departamento de Boyacá y de zonas asociadas a minería de carbón.





**CAPITULO 2. ¿La giberelina aumenta la aclimatación de plántulas de *Alnus acuminata* al arsénico?**



## La giberelina aumenta la aclimatación de plántulas de *Alnus acuminata* al arsénico?

### RESUMEN

El arsénico es un metaloide que se distribuye naturalmente en la litosfera, sin embargo; factores antropogénicos como la minería aumentan la contaminación en los suelos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de giberelinas ( $GA_3$ ) en el desarrollo temprano de *Alnus acuminata* y determinar si este tratamiento ofrece una pre-aclimatación bajo concentraciones de arsénico similares a las de los suelos de la minería del carbón. Semillas certificadas de *A. acuminata* fueron pre-embecidas en agua a 4 °C durante 24 horas y se sembraron en cajas con 16 tratamientos combinados de giberelinas (0, 80, 160 y 240 mg L<sup>-1</sup>) y arsénico (0, 3, 6 y 9 mg L<sup>-1</sup>). Se evaluó la germinación, la morfometría de los germinados, el desarrollo temprano y la biomasa final de plántulas a los 30 días posteriores a la siembra. La cinética de germinación de *A. acuminata* se vio afectada por  $GA_3$  y arsénico. El  $GA_3$  aumentó en un 44 % la germinación, pero el arsénico aumentó el tiempo medio de germinación en un 10 %. Las concentraciones de 3 mg L<sup>-1</sup> y 6 mg L<sup>-1</sup> de arsénico tuvieron efectos negativos en la germinación y la longitud de la raíz, pero estos efectos no se observaron a 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico. De hecho, el arsénico en esta concentración combinado con giberelina, aumentó la biomasa y el vigor de *A. acuminata*. Se recomienda el tratamiento combinado de 9As+160GA3 para producir plántulas pre-aclimatadas que se podrían evaluar en planes de recuperación de suelos de minería del carbón.

*Palabras clave:* arsénico, germinación, minería de carbón, plántulas, tolerancia.

### INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide que se distribuye ampliamente en el medio ambiente debido a procesos naturales como la meteorización de rocas y emisión volcánica, y a factores antropogénicos entre los cuales se cuentan la minería, la combustión y el uso de plaguicidas que aumentan la contaminación de suelos y aguas (Alonso *et al.* 2014). Este



elemento es muy tóxico incluso a bajas concentraciones en todos los organismos vivos (Senior *et al.* 2016). Los humanos pueden estar expuestos a la toxicidad del arsénico a través del consumo de vegetales, agua y algunos productos de origen animal como carne, leche y huevos (Öztürk *et al.* 2017, Ma 2018). A nivel mundial se encuentran altas concentraciones de arsénico en países como Argentina, Bangladesh, Chile, China, Colombia, Hungría, México, Nepal, Pakistán, Tailandia, Estados Unidos y Vietnam (Bundschuh *et al.* 2012). El nivel límite de arsénico establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para agua de consumo es de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ma 2018).

Las concentraciones de arsénico en suelos contaminados suelen ser superiores a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , provocando síntomas de toxicidad y la inhibición del crecimiento de la mayoría de las plantas (Hall 2002, Abbas *et al.* 2018). Cuando este metaloide está presente en las plantas, se dan fuertes interferencias con los procesos metabólicos y daño en los ácidos nucleicos, causando disminución en la germinación de las semillas (Smith *et al.* 2010, Abbas *et al.* 2018, Begum y Mondal 2019). Consecuentemente, en los siguientes estados del desarrollo se afecta la fotosíntesis, la concentración de clorofila y la conductancia estomática (Monni *et al.* 2001, Smith *et al.* 2010).

En décadas recientes se han popularizado un conjunto de tecnologías que reducen la concentración de sustancias tóxicas en suelos y aguas a partir de procesos biológicos realizados por las plantas, conocidos como fitorremediación (Ali *et al.* 2013, Tiwari y Sarangi 2019). Las especies tolerantes a metales y metaloides en general pueden ser de gran importancia para inmovilizar esos elementos en lugares donde aún no se han excedido sustancialmente los niveles críticos. A nivel celular, las estrategias de tolerancia involucran la reacción de enzimas antioxidativas, el uso de moléculas secuestrantes como las fitoquelatinas y la presencia de transportadores específicos en membrana plasmática y vacuola (Yadav 2010, Pandey *et al.* 2019). Las especies arbóreas son especialmente atractivas para uso en fitorremediación ya que presentan gran biomasa, sistema de raíces expandidas y un largo ciclo de vida que garantiza el secuestro a largo plazo de metales pesados y metaloides. Uno de los grupos taxonómicos que ha presentado atributos de tolerancia es el género *Alnus* (Jing *et al.* 2014, Escobar y Dussán 2016) con resultados exitosos en la recuperación de suelos afectados por minería.



El aliso (*Alnus acuminata* Kunt) es un árbol nativo de América Central y América del Sur que se distribuye desde los 900 hasta los 3500m de altitud (Araya *et al.* 2000). Esta especie tiene la capacidad de formar nódulos para la fijación de nitrógeno atmosférico y micorrizas que facilitan la captura de nutrientes del suelo (Russo *et al.* 1993). Es una especie maderable y además por su rápido crecimiento tiene un importante potencial en la recuperación de los suelos (Tovar y Cogua 1990). Estudios como el de Ramos-Montaña 2018, demuestran que las semillas de *A. acuminata* presentan tolerancia germinativa al arsénico, en concentraciones hasta de 10 mg L<sup>-1</sup>; sin embargo, una de las limitaciones que presenta la especie para optimizar la producción masiva de plántulas es su relativo bajo porcentaje de germinación y alta susceptibilidad de los germinados durante las primeras semanas del desarrollo (Ramos-Montaña 2018).

Las giberelinas son hormonas que se sintetizan especialmente en sitios de crecimiento activo como los embriones o tejidos meristemáticos y estimulan tanto el rompimiento de la dormancia como la movilización de reservas durante la germinación (Pimenta-Lange y Lange 2006). Aunque el uso de giberelinas para aumentar la germinación y crecimiento vegetal es una técnica ampliamente conocida, poco se ha estudiado la acción de la hormona sobre el desarrollo de plantas sometidas a condiciones de estrés. En el caso del estrés por metales pesados o metaloides, una hipótesis a probar es si su uso aumenta la tolerancia de germinados y plántulas, funcionando como un tratamiento de pre-aclimatación.

En Colombia, una de las principales actividades en la región Andina es la minería de carbón. Los suelos de entorno de las minas abandonadas en el departamento de Boyacá presentan concentraciones de arsénico que llegan a 12 mg kg<sup>-1</sup> y *A. acuminata* es una especie que se distribuye comúnmente en la región (Ramos-Montaña 2018). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de giberelinas en semillas de *A. acuminata* y determinar si este tratamiento da lugar a un mayor número de plántulas pre-aclimatadas al arsénico, lo que se vería evidenciado en mayores índices de vigor y una mejor sobrevivencia de los germinados hasta el estado de plántula.



## MÉTODOS

En total se realizaron tres experimentos a partir de semillas de *A. acuminata* adquiridas a través de la empresa colombiana el Semillero Forestal S.A cosechadas en diciembre de 2017. La pureza promedio estimada de las semillas fue del 65 %, y el pretratamiento recomendado por Ramos-Montaño (2018) es de mínimo 24 horas de imbibición a temperaturas frías (3 a 4 °C).

Los tratamientos de arsénico se prepararon con solución de arseniato de sodio heptahidratado ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a concentraciones específicas de 0, 3, 6 y 9  $\text{mg L}^{-1}$ , que corresponden a un rango de concentraciones similares a las encontradas en suelos de minería de carbón de Samacá-Colombia (Ramos-Montaño 2018), este fue disuelto para la preparación de una solución stock de alta concentración. Los tratamientos de giberelina consistieron en soluciones con ácido giberélico (GA3) a concentraciones de 0, 80, 160 y 240  $\text{mg L}^{-1}$ . Las concentraciones de arsénico y GA3 se combinaron dando lugar a un total de 16 tratamientos.

*Experimento 1, germinación.* las semillas pre-embebidas se separaron las semillas en grupos de 0,5 gramos (unidad experimental, aproximadamente 500 semillas y 5 repeticiones por tratamiento) de peso y se colocaron sobre papel filtro en bandejas de plástico de 13x11 cm; Se adicionaron los 16 tratamientos combinados de arsénico y giberelina. Las bandejas se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controlada de 12 horas en oscuridad a 20 °C y 12 horas con luz a 30 °C, en la cámara germinadora del laboratorio de biotecnología del SENA CEDEAGRO Duitama; cada tres días se hizo conteo de semillas sin extracción (germinación acumulada) y el total de germinados se contó al final de 13 días. Al final de este tiempo se estimaron métricas de cinética germinativa como el coeficiente de velocidad de germinación (CVG) y el tiempo medio de germinación (MGT), además del índice de vigor de semilla (SVI), de acuerdo a Ranal y Santana (2007) e Imran *et al.* (2015).



*Experimento 2, desarrollo temprano.* Todos los germinados al día 13 desde la siembra fueron clasificados en los siguientes estados de desarrollo: Emergencia radicular (aparición de radícula), emergencia cotiledonar (los cotiledones cerrados expulsando la testa), expansión cotiledonar (cotiledones totalmente expandidos y pigmentados) y fototropismo positivo (germinado orientado hacia la luz con cotiledones expandidos en un ángulo de 90°). Se evaluó la frecuencia relativa (%) de cada uno de los estados de desarrollo para los 16 tratamientos combinados de arsénico y GA<sub>3</sub>.

*Experimento 3, crecimiento.* Los germinados fueron trasplantados a semilleros con turba y arena 2:1. Se colocaron en condiciones de vivero. Se dejaron crecer por 17 días (hasta el día 30 desde la siembra) al final de los cuales las plántulas se retiraron para medición de longitud total (desde la punta de la raíz principal hasta el meristemo apical), diámetro cotiledonar, longitud radicular, presencia de hojas verdaderas; se determinó la biomasa de la parte aérea y de la raíz y se evaluó la interacción entre los tratamientos combinados de arsénico y GA<sub>3</sub>.

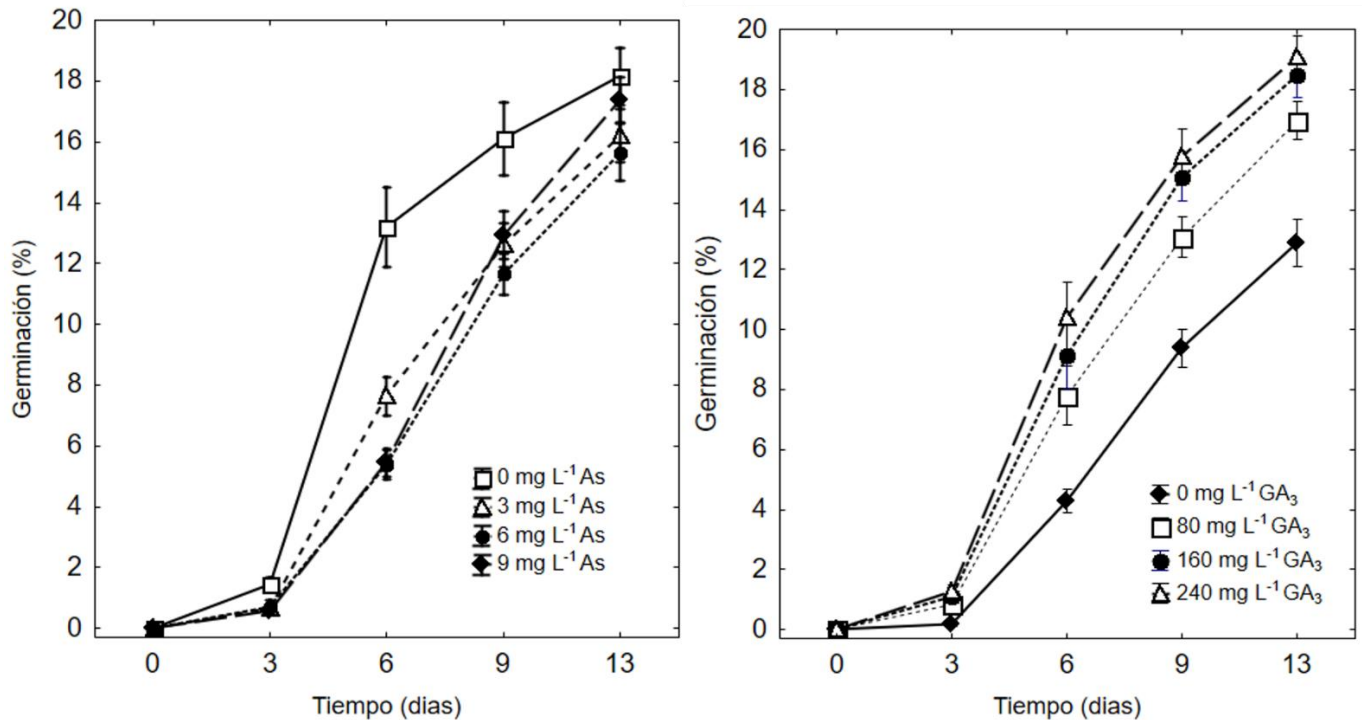
*Análisis estadístico.* Los datos de germinación fueron corregidos por la pureza y expresados en porcentaje. Se verificó la distribución normal y homogeneidad de los datos. Los resultados de germinación y vigor fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) a dos vías, y el efecto de los tratamientos sobre el conjunto de variables morfométricas de los germinados fue evaluado con un análisis multivariado de varianzas (MANOVA). Todos los análisis fueron hechos mediante el programa STATISTICA 10 (StatSoft Inc. 1984-2011).

## RESULTADOS

En los primeros días el arsénico limitó la capacidad germinativa. En el día 6 la germinación del control duplicaba a la de los tratamientos de arsénico, pero al final del tiempo de seguimiento no hubo diferencias estadísticas en la germinación. En el caso del tratamiento de giberelinas se presentaron diferencias en la germinación que comenzaron en el día 3 y terminaron al final del seguimiento con un efecto positivo de los tratamientos con



concentraciones de 160 y 240 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, que incrementaban en un 44 % la germinación con relación al control (figura 1).



**Figura 1.** (A) Efecto de la concentración de arsénico en la germinación de *A. acuminata* (B) Efecto de las giberelinas en la germinación de *A. acuminata*.

El tiempo promedio de germinación en el tratamiento control fue de 6-9 días. La cinética germinativa de *A. acuminata* fue afectada por los tratamientos de arsénico y giberelina. La aplicación de giberelina redujo en un 19 % los tiempos medios de germinación y la aplicación de arsénico los aumentó en un 10 %. Sin embargo, el tratamiento combinado de arsénico de 9 mg L<sup>-1</sup> y 160 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> tuvo efectos negativos para la germinación aumentando el tiempo medio de germinación hasta en un 24 %. Los coeficientes medios de germinación coincidieron en su patrón de respuesta con el tiempo medio de germinación. Con relación al índice de vigor, la aplicación de giberelinas tuvo un efecto altamente positivo incrementando en un 75 % el índice de vigor de semilla cuando se aplicaron 240 mg L<sup>-1</sup> de giberelina en comparación con el control. Estos efectos positivos se reducen cuando combinados con el efecto del arsénico, especialmente en concentraciones



intermedias de arsénico (3 y 6 mg L<sup>-1</sup>). En presencia de giberelinas el arsénico redujo el vigor entre un 20 y un 30%; en ausencia de giberelinas, la máxima concentración de arsénico dio lugar a plántulas con un vigor incluso similar al del control (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Influencia del As y GA<sub>3</sub> en la cinética germinativa y vigor de semillas de *Alnus acuminata*. MGT: tiempo medio de germinación. CVG: coeficiente de velocidad de germinación. VI: índice de vigor.

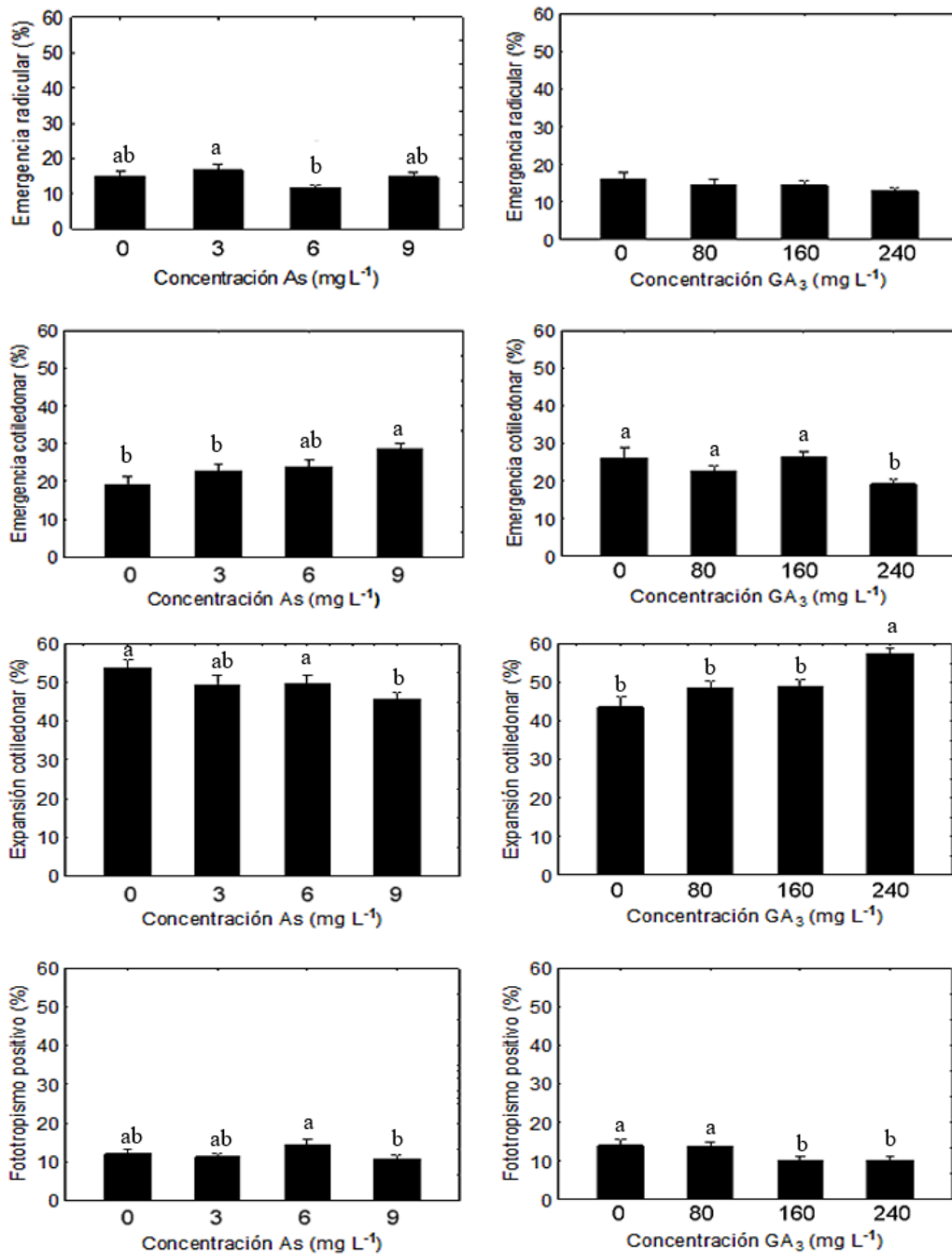
Concentración de arsénico (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración de GA <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	MGT Días	CVG (%)	VI
0,0	0,0	0,088 <sup>a</sup>	11,51 <sup>c</sup>	162,6 <sup>b</sup>
	80	0,078 <sup>b</sup>	12,82 <sup>b</sup>	235,5 <sup>a</sup>
	160	0,073 <sup>c</sup>	13,69 <sup>a</sup>	269,3 <sup>a</sup>
	240	0,073 <sup>c</sup>	13,68 <sup>a</sup>	283,7 <sup>a</sup>
3,0	0,0	0,089	11,22	119,1 <sup>c</sup>
	80	0,088	11,38	192,1 <sup>b</sup>
	160	0,085	11,72	210,8 <sup>a</sup>
	240	0,086	11,63	223,2 <sup>a</sup>
6,0	0,0	0,091	11,09	120,1 <sup>c</sup>
	80	0,092	10,96	170,3 <sup>b</sup>
	160	0,094	10,65	193,3 <sup>a</sup>
	240	0,091	10,97	194,2 <sup>ab</sup>
9,0	0,0	0,097 <sup>a</sup>	10,35 <sup>b</sup>	163,8 <sup>b</sup>
	80	0,096 <sup>a</sup>	10,43 <sup>ab</sup>	177,8 <sup>b</sup>
	160	0,092 <sup>ab</sup>	10,96 <sup>a</sup>	208,6 <sup>a</sup>
	240	0,090 <sup>b</sup>	11,13 <sup>a</sup>	212,3 <sup>a</sup>

Se encontró efectos significativos del arsénico, de las giberelinas y de la interacción arsénico x GA<sub>3</sub> sobre el desarrollo primario de los germinados ( $P < 0,01$ ). La aplicación de 240 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> presenta 19 % menos de germinados en emergencia radicular, pero un 31 % más germinados en expansión cotiledonar con relación al control. Por otra parte, la emergencia cotiledonar a 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico fue en un 43,7 % más frecuente con relación





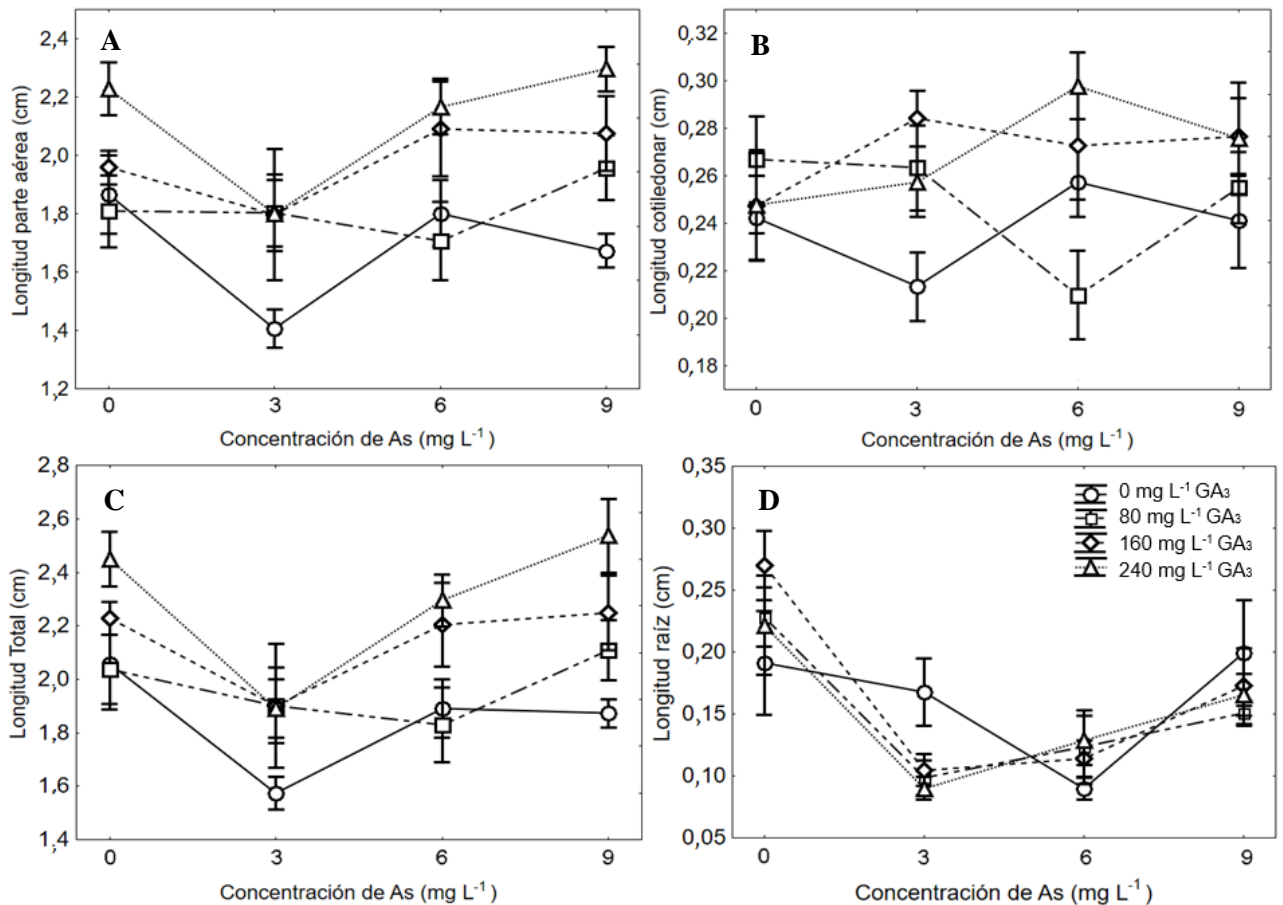
al control. La máxima aplicación de arsénico retrasa la expansión cotiledonar (15 %). En la fase final de desarrollo temprano, la proporción de germinados que llegó a fototropismo positivo fue 37 % menor cuando se aplicaron altas concentraciones de giberelinas (160 y 240 mg L<sup>-1</sup>), mientras que no hubo efectos específicos por parte del arsénico (figura 2).





**Figura 2.** Respuesta del desarrollo primario de germinados de *A. acuminata* (Media  $\pm$  error estándar) a diferentes tratamientos de arsénico (As) y giberelina (GA<sub>3</sub>). (A-B) Emergencia radicular; (C-D) Emergencia cotiledonar; (E-F) Expansión cotiledonar; (G-H) Fototropismo positivo. Los valores corresponden a frecuencias relativas del total de germinados obtenidos al final de 13 días desde la siembra.

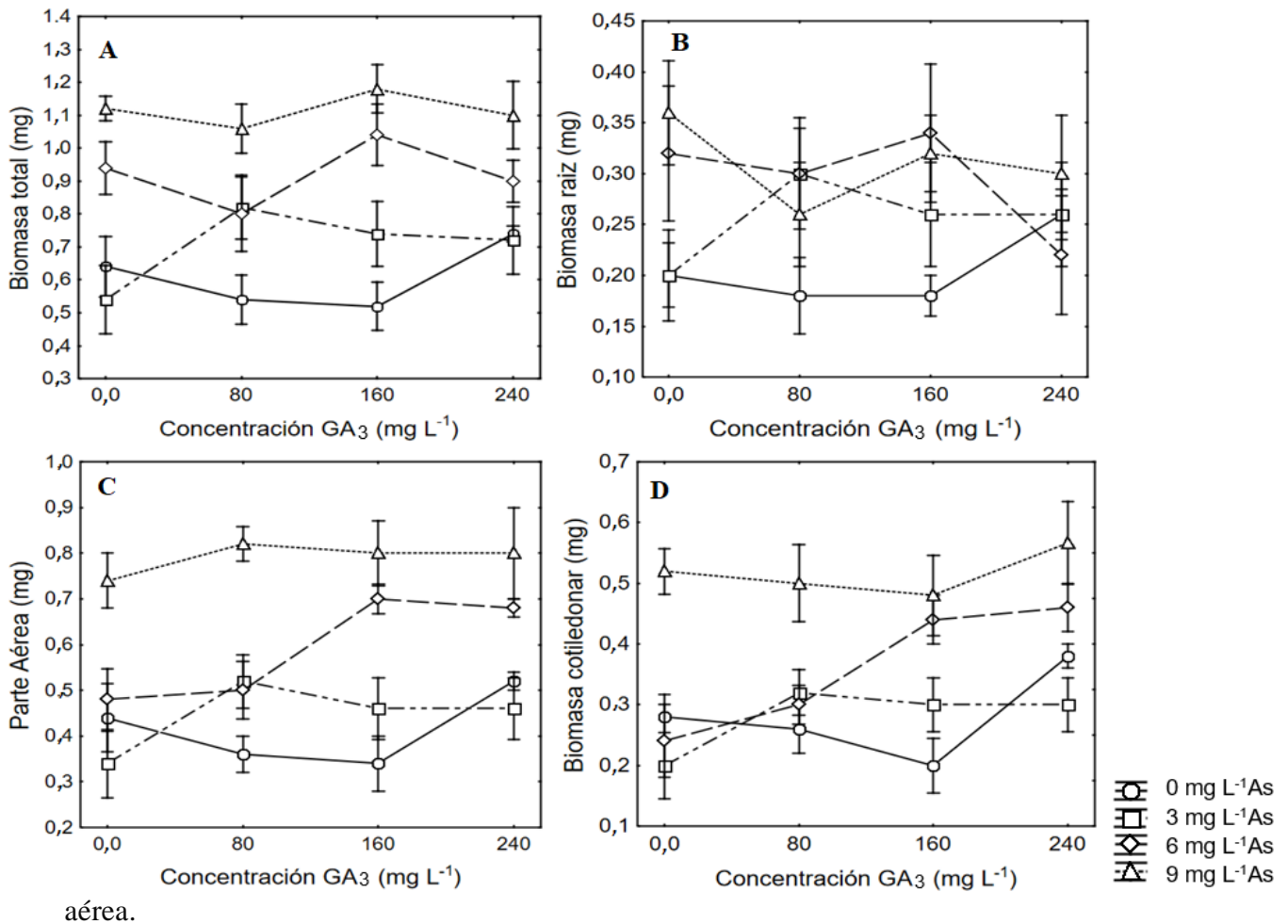
El análisis multivariado muestra que la concentración de arsénico y giberelina tienen un efecto significativo sobre la morfometría de los germinados ( $P < 0,01$ ). Además, el análisis demuestra que no existe una interacción entre los dos factores. La aplicación de giberelina llevó a un incremento significativo (19 %) de la longitud de la parte aérea de los germinados con relación al control. Mientras que concentraciones de 3 y 6 mg L<sup>-1</sup> de arsénico redujeron drásticamente la longitud de la raíz (98 %). Sin embargo, la máxima concentración de arsénico dio lugar a germinados con morfometría similar a la de germinado control. Con relación a los tratamientos combinados se encontró que en presencia de arsénico las giberelinas aumentan el diámetro cotiledonar (figura 3).





**Figura 3.** Morfometría de germinados. (A) Longitud de parte aérea; (B) Longitud cotiledonar; (C) Longitud total (D) Longitud de raíz.

La aplicación de arsénico afectó la biomasa de raíz tallo y cotiledones, pero no el tamaño del germinado. La aplicación de 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico aumentó la biomasa total con relación al control en 82 % (figura 5). No hubo un efecto de la giberelinas en la biomasa total de germinados; sin embargo, sí se encontró un efecto significativo sobre la biomasa de cotiledones. La aplicación de 240 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> representó un incremento del 32 % con relación al control (figura 4). La tendencia general, fue de un aumento en la biomasa de la parte aérea, cotiledones y raíz con la máxima concentración de giberelinas, a pesar de no detectar diferencias estadísticas generalizadas. Se encontró que en presencia de arsénico las dosis de 160 mg L<sup>-1</sup> y 240 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> registra la mayor biomasa de cotiledones y parte

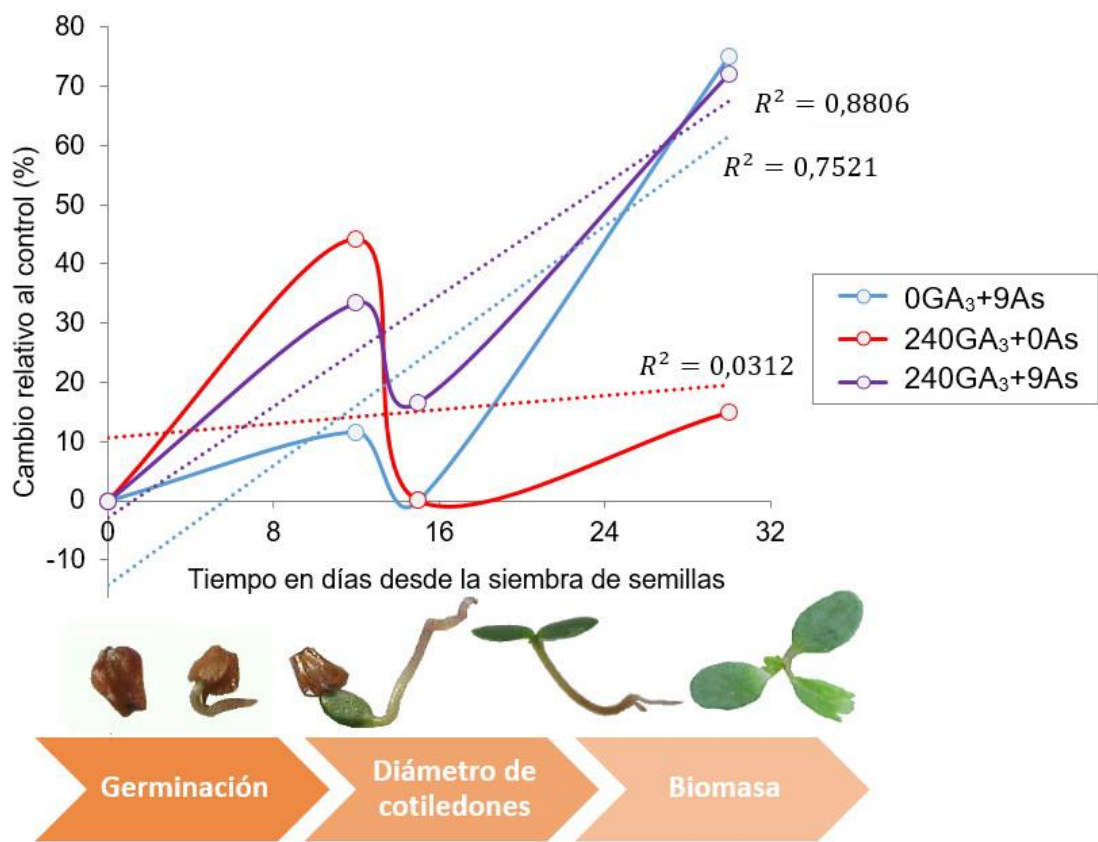


aérea.



**Figura 4.** Biomasa de plántulas al final de 30 días de seguimiento: (A) Total, (B) raíz, (C) parte aérea, (D) cotiledones.

Podría decirse que no hubo una respuesta generalizada del desarrollo temprano en cuanto a la concentración de arsénico o la concentración de giberelinas. El efecto de las giberelinas es intenso sobre la germinación y en estadios posteriores se reduce, a diferencia del arsénico, el cual inicia con efectos generalizados negativos durante la germinación y posteriormente favorece el crecimiento primario de los germinados. La figura 5 ilustra estos patrones de respuesta, comparando los tratamientos independientes de  $240 \text{ mg GA}_3 \text{ L}^{-1}$ ,  $9 \text{ mg As L}^{-1}$  y el tratamiento combinado de  $240 \text{ GA}_3 + 9 \text{ As}$ , donde puede evidenciarse que la tendencia positiva en el desarrollo de *A. acuminata* es marcada más por el arsénico que por la giberelina, lo que en general confirma que *Alnus acuminata* presenta tolerancia germinativa al arsénico.





**Figura 5.** Influencia de 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico, 240 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y el tratamiento combinado 9As+240GA<sub>3</sub> sobre la germinación y el desarrollo primario de *A. acuminata*. Los valores corresponden al cambio en porcentaje relativo al control (0,0As+0,0GA<sub>3</sub>). Las líneas de tendencia con sus correspondientes coeficientes de regresión muestran un efecto positivo generalizado del arsénico más que de la giberelina.

## DISCUSIÓN

El arsénico recurrentemente ha sido identificado como un elemento tóxico que causa interferencia en la germinación y crecimiento de plántulas. En este estudio, se encontró que el arsénico tuvo efectos en la dinámica germinativa de *A. acuminata*, asociados con un retraso en la expansión cotiledonar. Sin embargo, en estadios finales del desarrollo temprano se encontró que la proporción de germinados que alcanzaba el fototropismo positivo era similar al del control. De este modo podría decirse que los efectos del arsénico son mínimos incluso al aplicar 9 mg L<sup>-1</sup>.

Con relación a la cinética germinativa de *A. acuminata*, la aplicación de arsénico aumentó el tiempo medio de germinación hasta en un 10 % a partir del día 3 y hacia el día 9 se observó que las semillas control presentaban una germinación mucho mayor a la de cualquier tratamiento de arsénico. Sin embargo, al final del seguimiento en el día 13 esas diferencias se habían compensado casi en su totalidad. Por otra parte, la giberelina redujo en un 19 % los tiempos medios de germinación aumentó y llevó rápidamente los germinados a la fase de expansión cotiledonar. Efectos positivos de la giberelina en rompimiento de la latencia fueron reportados para *Alnus glutinosa*, *Alnus rubra* y *Alnus tenuifolia* (De Atrip y O'Reilly 2007, USDA 2008), pero dichos efectos estuvieron condicionados por la temperatura o la humedad de la semilla. En *Alnus incana* y *Alnus oblongifolia* no hubo influencia de la giberelina sobre la germinación, e incluso se llegó a reportar efectos negativos en combinación con estratificación (USDA 2008, Morales *et al.* 2012). El único antecedente para *Alnus acuminata* fue realizado en condiciones *in vitro*, en presencia de sacarosa y sales minerales, donde se sugirió que el efecto positivo de la giberelina era condicionado por la presencia de luz (Araya *et al.* 2000). Este es el primer



estudio que evalúa los efectos de la giberelina y el arsénico sobre la germinación del aliso, estandarizando cualquier otra variable interactuante.

La principal consecuencia negativa fue una menor longitud de raíz al aplicar 3 y 6 mg As L<sup>-1</sup>, que concuerda con el planteamiento de que las señales de toxicidad son visibles inicialmente en la raíz, por ser la estructura que está más expuesta a los metales y metaloides del sustrato (Sen *et al.* 2013). Sin embargo, nuevamente hubo una recuperación del tamaño y un aumento de la parte aérea de los germinados cuando fueron aplicados 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico. Estos efectos en concentraciones intermedias, que luego parecen ser compensados con una mayor concentración podría estar relacionados con un cambio en la estrategia de respuesta de la planta al arsénico, bien sea la activación de algún transportador de membrana o la activación de enzimas dependiente de concentración del sustrato, como la arsenato reductasa o las enzimas antioxidativas (Tripathi *et al.* 2007, Kofroňová *et al.* 2019).

La interacción positiva del arsénico y la giberelina en el tamaño de los cotiledones repercute de manera significativa en la biomasa de las plántulas, aumentándola hasta en un 82 % al final de 30 días. De igual manera, la máxima aplicación de arsénico combinada con la máxima aplicación de GA<sub>3</sub> resultó en un mayor vigor comparado con los germinados del control. Estos resultados validan la hipótesis planteada de que un tratamiento de las semillas con giberelina resulta en una mayor pre-aclimatación al arsénico, es decir, la giberelina contrarresta los retrasos en la cinética germinativa causados por el arsénico, y prolonga el tiempo de paso de germinado a plántula con hojas verdaderas. Durante ese tiempo, los germinados son susceptibles a diferentes factores, especialmente al estrés hídrico, y una vez en el estado de plántula hay una mayor probabilidad de sobrevivencia. Casos similares, donde un pretratamiento en la fase germinativa aumenta la aclimatación de plántulas a estrés, han sido reportados con la aplicación de peróxido de hidrógeno o de ácido salicílico para aumentar la tolerancia a la salinidad (Deef 2007, Gondim *et al.* 2010). Estos estudios, aunados con otras investigaciones en condiciones de inundación que reportan que una primera exposición al estrés activa genes de aclimatación que luego son usados para enfrentar un segundo evento de inundación (Tamang y Fukao 2015), sugieren que diferentes estrategias de pre-aclimatación durante la fase germinativa pueden ser



usadas para producir plántulas con mayor tolerancia a una segunda exposición al estrés. Del mismo modo se podría pensar a futuro en producir masivamente plántulas de aliso provenientes de semillas pre-tratadas con arsénico y giberelina, que posteriormente puedan ser llevadas a suelos contaminados para establecer si cuentan con mayores tasas de crecimiento que plántulas sin pretratamiento.

## CONCLUSIONES

En este estudio se comprueba que la giberelina aumenta la aclimatación de plántulas al arsénico. Si se pensara en producir plántulas aclimatizadas con el fin de recuperar suelos post minería de carbón, se recomienda la combinación de 160 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y 9 mg L<sup>-1</sup> de arsénico dado que permite que la germinación en las semillas sea mayor y que plántulas desarrollen una mejor biomasa. Se valida a *Alnus acuminata* como un árbol con potencial para la fitorremediación de suelos contaminados, y el siguiente paso en la línea investigativa de la especie será comprobar en campo la capacidad de tolerancia de plántulas aclimatizadas, evaluando su crecimiento y tasas de acumulación de metales pesados y metaloides.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de desarrollo Agropecuario y Agroindustrial SENA CEDEAGRO; Laboratorio de Biotecnología Vegetal a cargo de la profesional María Antonia Martínez. Duitama-Boyacá-Colombia, donde se desarrolló parte de este estudio.

## REFERENCIAS

Abbas G, B Murtaza, I Bibi, M Shahid, NK Niazi, MI Khan, M Amjad, M Hussain, Natasha. 2018. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(1): 59. DOI:



[10.3390/ijerph15010059](https://doi.org/10.3390/ijerph15010059)

- Ali H, E Khan, M Sajad. 2013. Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869–881. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2013.01.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075)
- Alonso DL, S Latorre, E Castillo, P Brandão. 2014. Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review. *Environmental Pollution* 186: 272-281. DOI: [10.1016/j.envpol.2013.12.009](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.009)
- Araya E, L Gomez, N Hidalgo, R Valverde. 2000. Efecto de La Luz y del Acido Giberelico sobre la germinacion in vitro de Jaul (*Alnus acuminata*). *Revista Agronomia costarricense* 24(1): 75-80.
- Begum M, S Mondal. 2019. Relative Toxicity of Arsenite and Arsenate on Early Seedling Growth and Photosynthetic Pigments of Rice. *Current Journal of Applied Science and Technology* 33(4): 1-5. DOI: [10.9734/cjast/2019/v33i430087](https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v33i430087)
- Bundschuh J, MI Litter, F Parvez, G Román-Ross, H Nicolli, JS Jean, CW Liu, D López, MA Armienta, LR Guilherme, A Gomez-Cuevas, L Cornejo, L Cumbal, R Toujaguez. 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment* 429: 2-35. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2011.06.024](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024)
- De Atrip N, C O'Reilly. 2007. Germination response of alder and birch seeds to applied gibberellic acid and priming treatments in combination with chilling. *Annals of Forest Science* 64: 385–394. DOI: [10.1051/forest:2007015](https://doi.org/10.1051/forest:2007015)
- Deef HE. 2007. Influence of Salicylic Acid on Stress Tolerance During Seed Germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Advances in Biological Research* 1: 40-48.
- Escobar M, J Dussán. 2016. Phytoremediation Potential of Chromium and Lead by *Alnus acuminata* subsp. *acuminata*. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 35:(4) 942-948. DOI: [10.1002/ep.12297](https://doi.org/10.1002/ep.12297)
- Gondim FA, E Gomes-Filho, F Lacerda, J Tarquinio Prisco, D Azevedo Neto, EC Marques. 2010. Pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. *Brazilian Society of Plant Physiology* 22:(2) 103-112.





DOI: [10.1590/S1677-04202010000200004](https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000200004)

- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11. DOI: [10.1093/jxb/53.366.1](https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.1)
- Imran MA, ZA Sajid, MN Chaudhry. 2015. Arsenic (As) toxicity to germination and vegetative growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Polish Journal of Environmental Studies* 24(5): 1993-2002. DOI: [10.15244/pjoes/39553](https://doi.org/10.15244/pjoes/39553)
- Jing Y, H Cui, T Li, Z Zhao. 2014. Heavy metal accumulation characteristics of Nepalese alder (*Alnus nepalensis*) growing in a lead-zinc spoil heap, Yunnan, Southwestern China. *IForest* 7(4): 204-208. DOI: [10.3832/ifor1082-007](https://doi.org/10.3832/ifor1082-007)
- Kofroňová M, A Hrdinová, P Mašková, P Soudek, J Tremlová, D Pinkas, H Lipavská. 2019. Strong antioxidant capacity of horseradish hairy root cultures under arsenic stress indicates the possible use of *Armoracia rusticana* plants for phytoremediation. *Ecotoxicology and environmental safety* 174: 295-304. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2019.02.028](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.028)
- Ma H. 2018. Review Article Arsenicosis: A Review of Its Diagnosis and Treatment. *Medicine Today* 30: 81-88. DOI: [10.3329/medtoday.v30i2.37816](https://doi.org/10.3329/medtoday.v30i2.37816)
- Monni S, C Uhlig, E Hansen, E Magel. 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 112(2): 121-129. DOI: [10.1016/S0269-7491\(00\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00125-1)
- Morales B, C Barden, C Boyer, J Griffin, L Fisher, J Thompson. 2012. Improving germination of red elm (*Ulmus rubra*), gray alder (*Alnus incana*) and buffaloberry (*Shepherdia canadensis*) seeds with gibberellic acid. In Haase DL, JR Pinto, LE Riley eds. National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations. USDA Forest Service, Proceedings RMRS-P-68. p. 93-95.
- Öztürk M, Ş Aslan, A Demirbaş. 2017. Accumulation of arsenic in plants from arsenic contaminated irrigation water. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences* 23(3): 289-297. DOI: [10.5505/pajes.2016.05657](https://doi.org/10.5505/pajes.2016.05657)
- Pandey AK, A Gautam, RS Dubey. 2019. Transport and detoxification of metalloids in plants in relation to plant-metalloid tolerance. *Plant Gene* 17: 100171. DOI: [10.1016/j.plgene.2019.100171](https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100171)



- Pimenta-Lange MJ, T Lange. 2006. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biology* 8(3): 281-290. DOI: [10.1055/s-2006-923882](https://doi.org/10.1055/s-2006-923882)
- Ramos-Montaña C. 2018. Tolerância De *Alnus acuminata* (Aliso)Ao Arsênio, Durante a Germinação e o desenvolvimento inicial. Tesis de doctorado en Fisiología Vegetal. Viçosa, Brasil. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. 70p.
- Ranal MA, DG de Santana. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 1-11. DOI: [10.1590/s0100-84042006000100002](https://doi.org/10.1590/s0100-84042006000100002)
- Russo RO, JC Gordon, GP Berlyn. 1993. Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia*-mycorrhizae) interactions: growth response of *Alnus acuminata* seedlings to inoculation with *Frankia* strain ArI3 and *Glomus intraradices*, under three phosphorus levels. *Journal of Sustainable Forestry* 1: 93-110. DOI: [10.1300/J091v01n01](https://doi.org/10.1300/J091v01n01)
- Sen A, KK Shukla, S Singh, G Tejavathi. 2013. Impact of heavy metals on root and shoot length of indian mustard : an initial approach for phytoremediation. *Science secure Journal of Biotechnology* 2(2): 48-55.
- Senior W, MH Cornejo-Rodríguez, J Tobar, MR Ramírez-Muñoz, A Márquez. 2016. Metales pesados cadmio, plomo, mercurio y arsénico en pescados congelados de elevado consumo en el Ecuador. *Zootecnia tropical* 34: 143–153.
- Smith SE, H Christophersen, S Pope, FA Smith. 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil* 37: 1-21. DOI: [10.1007/s11104-009-0089-8](https://doi.org/10.1007/s11104-009-0089-8)
- Tamang BG, T Fukao. 2015. Plant adaptation to multiple stresses during submergence and following desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences* 16(12): 30164-30180. DOI: [10.3390/ijms161226226](https://doi.org/10.3390/ijms161226226)
- Tiwari S, BK Sarangi. 2019. Transgenics for Arsenic and Chromium Phytoremediation. In *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*. 167–185. DOI: [10.1016/B978-0-12-814389-6.00009-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00009-2)
- Tripathi RD, S Srivastava, S Mishra, N Singh, R Tuli, DK Gupta, FJ Maathuis. 2007.



Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in biotechnology* 25(4): 158-165. DOI: [10.1016/j.tibtech.2007.02.003](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003)

Tovar C, J Cogua. 1990. Síntomas de deficiencia de nutrientes en aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.). *Agronomía Colombiana* 7: 89–94.

USDA (United States Department of Agriculture, US). 2008. Betulaceae Birch family *Alnus* P. Mill. alder. In Bonner FT, RP Karrfalt eds. *The Woody Plant Seed Manual*. Washington, USA. USDA, Forest Service. p. 232–240. DOI: [10.2979/npj.2009.10.3.300](https://doi.org/10.2979/npj.2009.10.3.300)

Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76(2): 167-179. DOI: [10.1016/j.sajb.2009.10.007](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007)



## Conclusiones generales

*Alnus acuminata* es considerada una especie potencial para la restauración de zonas fragmentadas, así como para la preservación de cuencas hidrográficas, pues su óptimo crecimiento y rápido desarrollo, la caracterizan como una especie colonizadora; sin embargo, pocos estudios existen sobre el potencial fitorremediador de suelos contaminados por metaloides.

En este estudio se estableció la dosis combinada de  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  y  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de arsénico para la producción de plántulas aclimatizadas permitiendo mayor germinación en las semillas y que plántulas desarrollen una mejor biomasa, esto con el fin de recuperar los suelos contaminados por la minería de carbón

El siguiente paso en la línea investigativa de la especie *Alnus acuminata* será comprobar en campo la capacidad de tolerancia de plántulas aclimatizadas, evaluando su crecimiento y tasas de acumulación de metales pesados y metaloides.

## ANEXOS



**Anexo 2** Semillas viables de *A. acuminata*.



**Anexo 1.** Plántulas de aliso de 30 días