

# El Jaúl (*Alnus acuminata*) un forestal con gran respuesta a la embriogénesis somática

Luis Gonzaga Gutiérrez L.<sup>1</sup>

## Abstract

Calluses of Alder Tree (*Alnus acuminata* H.B.K) were obtained in MS/2 media with combinations of auxins and cytokinins (ANA 1 mg.L and BA 3 mg. L<sup>-1</sup>). After transference of these calluses into MS media without hormones, a high rate of regeneration of somatic embryos has been obtained. Germination of somatic embryos was achieved in a medium with giberelin.

## Introducción

*Alnus acuminata* es una especie forestal a la cual mundialmente se ha prestado gran interés, bien sea como árbol asociado a fijadores de nitrógeno o como árbol muy promisorio para la reforestación.

En Colombia se encuentra naturalmente en los bosques secos, húmedos y muy húmedos del montano y montano bajo, en especial en las provincias de Caldas,

Risaralda, Quindío y Huila, con t° entre 7-17 °C, precipitaciones anuales de 1 000 a 2 500 milímetros y alta humedad relativa. Como el jaúl o aliso (como se lo conoce en Colombia) es una especie alógama de polinización anemófila, se tienen rodales semilleros para la obtención de semilla, en lugar de árboles aislados, por el alto riesgo de endogamia que esto conlleva. Existen plantaciones con fines principalmente protectores en Risaralda, Cundinamarca, Nariño, Quindío y Caldas (CONIF, 1996).

En relación con su papel como árbol muy propio para la reforestación se encuentra que *Alnus acuminata* está siendo empleado en programas de este tipo en Nueva Zelanda (Halloy, 1996) y en el continente africano en programas para obtención de madera como combustible. Y la más importante institución que agrupa los reforestadores de América, la cooperativa CAMCORE, lo ha señalado como una de las especies más importantes en sus programas de pro-

<sup>1</sup> Biólogo. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, Suramérica. Correo electrónico: luisgon@ambiental.utp.edu.co

ducción.

Se reporta micropropagación en las especies *Alnus glutinosa* (Perinet *et al.*, 1983; Lavarde *et al.*, 1987), *Alnus crispa* (Tremblay *et al.*, 1984), *Alnus nepalensis* (Kaur *et al.*, 1993), *Alnus cremastogyne* (Tang *et al.*, 1996), destacándose los trabajos de Tremblay *et al.*, Vestri *et al.*, Cremiere *et al.*, y Dhawan *et al.*, con publicaciones en cultivo *in vitro* en diferentes especies de *Alnus*, en los años 1984, 1986 y 1987. Wakita *et al.*, 1997, regeneró plantas de *Alnus firma* a partir de protoplastos de hojas.

Específicamente en el género *Alnus acuminata* se encuentran cuatro trabajos en micropropagación, tres de los cuales no figuran en los *abstracts* internacionales son estos los realizados por Hodson *et al.*, 1988 en la Universidad Javeriana en Bogotá; Enrico, R.J., 1997 de Argentina y González y Vilca del Perú en 1998. El cuarto es reportado por los costarricenses Badilla *et al.*, 1992 los cuales trabajaron en micropropagación de la especie.

La propagación masiva de jaúl o aliso lograda en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira y con el apoyo del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” –COLCIENCIAS– es el único trabajo reportado para esta especie que propone la vía de embriogénesis somática (Marulanda *et al.*, 1998), y responde a la necesidad de la conservación, manejo y aprovechamiento de especies forestales que presentan gran potencialidad para la reforestación y la conservación de suelos.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Plantas de *Alnus acuminata* H.B.K. de un año de edad se utilizaron como donadoras

de nudos y yemas juveniles. Para la desinfección las ramas se cortaron y se colocaron en solución de NaOCl 0,05 % de cloro activo durante 24 horas, con el fin de alcanzar todos los sitios de la planta, eliminando posibles agentes contaminantes. Luego se les retiraron las hojas y se lavaron los microesquejes con Twin 20.

Como desinfectante previo a la siembra, se empleó también hipoclorito de sodio en concentración de 1,6% de cloro activo. Como antioxidante se utilizó L-cisteína (60 mg L<sup>-1</sup>) y como fungicida Benlate (1 g L<sup>-1</sup>).

Todas las siembras del material descrito se hicieron en medio MS/2. Adicionalmente, se colocaron L-cisteína (60 mg.L<sup>-1</sup>) para evitar la oxidación de los explantes.

Para la evaluación de los medios utilizados y los tratamientos hormonales, se partió de trabajos previos realizados en esta especie por Hodson *et al.*, 1988 y Badilla *et al.*, 1992. Inicialmente, se evaluaron tres diferentes tratamientos empleando medio Murashige & Skoog a la mitad de la concentración complementado con concentraciones de auxinas/citoquininas (ANA y BA) en diferentes combinaciones, que condujeron a la obtención de callos (Cuadro 1). Como control se empleó MS/2 sin hormonas con concentraciones de 4 % de sacarosa y gelificado con Phytigel (Sigma) al 3 %. El pH de todos los medios se ajustó a 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N antes de la esterilización.

## Resultados y discusión

### Obtención de callos

Debido a que los tres medios que aparecen en el Cuadro 1 eran reportados como adecuados para la micropropagación, la transformación de los explantes en 100 %

**Cuadro 1**  
**Medios evaluados inicialmente en microesquejes de *Alnus acuminata***

Medios (mg. L-1)	% Micropropagación	% de producción de callos
MS/2-ANA(1)BA(3)	0	100
MS/2-ANA(1)BA(8)	0	0
MS/2-ANA(0,02)BA(10)	0	0
MS/2 (Sin hormonas)	0	0
Control	0	0



**Foto 1**  
**Segmento nodal (1 cm) de jaúl con formación de callo luego de 30 días de implantación**



**Foto 2**  
**Callo embriogénico de jaúl de aspecto friable**

de callos (Fotos 1 y 2) a los treinta días de exposición, con el tratamiento ANA 1 mg L<sup>-1</sup> + BA 3 mg L<sup>-1</sup>, nos sugirió de inmediato la vía de la embriogénesis somática, razón por la cual los esfuerzos hacia la propagación masiva de esta especie en el Laboratorio se enfocaron a evaluar medios adecuados para la inducción de embriones somáticos. Debe resaltarse que si bien la mayoría de los trabajos presentados reportan éxitos en la obtención de embriogénesis utilizando combinaciones auxinas/citoquininas, en las cuales la auxina está en mayor concentración que la citoquinina, trabajos como los de Rout *et al.*, 1995 en *Acacia catechu*, encuentran la concentración ANA 0,5 mg. L<sup>-1</sup> y Kinetina 3 mg L<sup>-1</sup> como ideal para la embriogénesis; Igualmente, Bonneau *et al.*, 1994 propone con éxito combinaciones hormonales para embriogénesis en donde la citoquinina es más concentrada que la auxina, para la propagación del forestal *Euonymus europaeus*.

**Inducción de embriogénesis somática**

Teniendo en cuenta que la combinación ANA 1 mg L<sup>-1</sup> + BA 3 mg L<sup>-1</sup> no generaba por sí misma embriogénesis, ya que la exposición de más de 120 días, tanto en luz como en oscuridad, provocaba solamente proliferación de callos de aspecto marrón. Se procedió a evaluar

medios hormonales para lograr la producción de embriones, en los cuales se utilizaron entre 30 a 50 callos por cada tratamiento; dichos tratamientos hormonales consistieron en bajas concentraciones de auxina o bien la ausencia total de ella (Cuadro 2). Los callos de los diferentes tratamientos fueron evaluados en condiciones de luz y oscuridad encontrándose que la producción de embriones (Foto 3) no era mayor en ninguno de los casos, razón por la cual se continuó la producción en condiciones de 12 horas de luz. Los mejores resultados como puede observarse en la Cuadro 2 se lograron en medio sin hor-

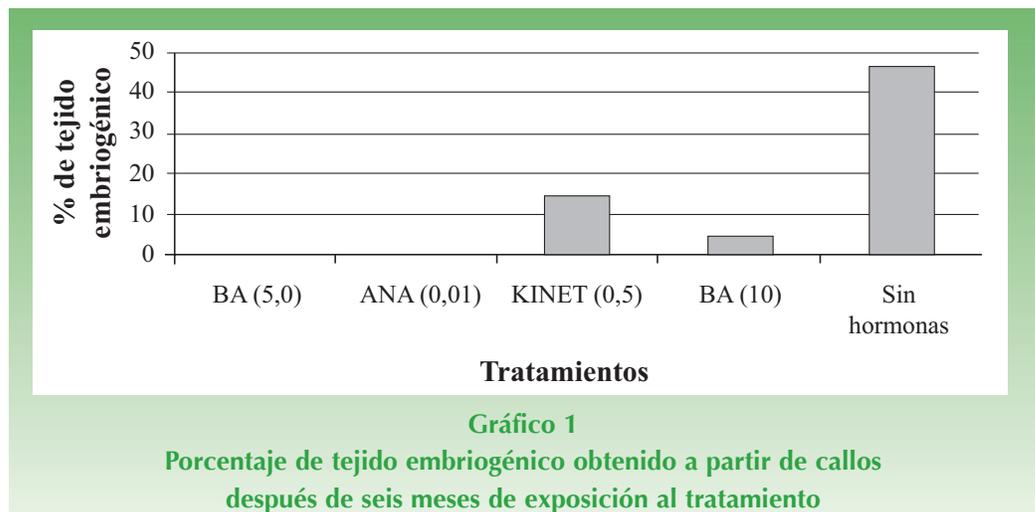
monas, con un porcentaje de 46 % de producción de embriones en los callos luego de seis meses de exposición (Gráfico 1), y teniendo en cuenta que los primeros embriones aparecieron a los 120 días de iniciado el tratamiento. Esto coincide con los trabajos en *Acacia*, en los cuales callos embriogénicos fueron obtenidos después de colocarlos en medio sin hormonas (Rout *et al.*, 1995).

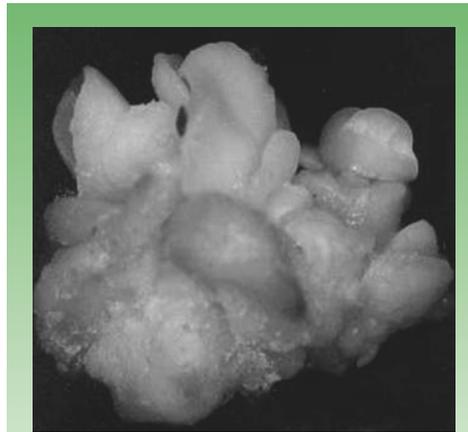
Germinación de embriones,  
elongación de plántulas y  
adaptación a vivero

La mayoría de los embriones, 80 % germinan (Foto 4) tanto en luz como en oscu-

**Cuadro 2**  
**Porcentaje de tejido embriogénico obtenido a partir de callos después de seis meses de exposición al tratamiento**

Medios para Embriogénesis (mg L <sup>-1</sup> )	Número de explantes (Callos) por tratamiento	% de callos embriogénicos
MS/2-BA(5,0)	39	0
MS/2-ANA(0,01)	35	0
MS/2-KINET(0,5)	27	14
MS/2-BA(10)	50	4
MS/2 (sin hormonas)	28	46





**Foto 3**  
Embriones somáticos de jaúl  
(0,5 cm) de aspecto cotiledonar



**Foto 5**  
Plántula (3 cm) de embriones somáticos  
de jaúl en fase de elongación



**Foto 4**  
Plántula de jaúl (1,5 cm) germinada a  
partir de embriones somáticos

ridad aproximadamente 15 días después de ser colocados en medio MS/2 complementado con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico solo o en combinación con kinetina 1 mg L<sup>-1</sup>

Para la elongación de las plántulas se han utilizado tratamientos similares a los empleados en el laboratorio en la micropropagación de mora de castilla; esto es AIA 0,05 mg L<sup>-1</sup> + AG3 0,25 mg L<sup>-1</sup> y AIA 0,5 mg L<sup>-1</sup> + AG3 0,5

mg L<sup>-1</sup> (Marulanda, 2000), con los cuales se ha logrado un óptimo desarrollo de las plántulas germinadas (Foto 5).

La adaptación a vivero consiste en colocar las plántulas en camas de arena y tierra cubiertas, con el fin de mantener humedad alta, luego de 15 días de adaptación, durante los cuales la cubierta es destapada unas horas al día, se pasan las plántulas a bolsas con tierra. La supervivencia del material que se ha pasado a tierra es de aproximadamente el 70 %.

#### Alta tasa de proliferación de embriones por subcultivo

La tasa de proliferación embriogénica a partir del callo que ha sido limpiado de embriones, se ha evaluado alrededor de 15 embriones por callo de 1,5 cm de diámetro. Tal productividad ocurre aproximadamente 45 días después de limpiados los callos de los embriones. Como se observa en el Cuadro 3, la proliferación ocurre no solo en los medios sin hormonas (propios para el subcultivo) sino, además, en los callos libres de embriones presentes en los medios para germina-

**Cuadro 3**  
**Tasa de proliferación de embriones por subcultivo**  
**luego de 45 días de exposición**

Tratamiento	Número promedio de embriones por callo de 1,5 cm de diámetro
Sin hormonas	15
AG3 0,5 mg L <sup>-1</sup>	10
AIA 0,05 mg L <sup>-1</sup> + AG3 0,25 mg L <sup>-1</sup>	5
AIA 0,5 mg L <sup>-1</sup> + AG3 0,5 mg L <sup>-1</sup>	5

ción, y en los medios para elongación de plántulas, donde con frecuencia aparece embriogénesis secundaria.

### Conclusiones

Utilizando material de plantas de un año de edad de *Alnus acuminata* y con la combinación hormonal ANA 1 mg L<sup>-1</sup> + BA 3 mg L<sup>-1</sup> en medio MS/2 se logró el 100 % de producción y proliferación de callo, luego de 30 días de exposición al tratamiento, en condiciones tanto de luz como de oscuridad.

Embriones somáticos fueron producidos en medio sin hormonas a partir de pasar los callos obtenidos con la combinación ANA 1 mg L<sup>-1</sup> + BA 3 mg L<sup>-1</sup> y luego de 180 días de exposición al tratamiento en condiciones tanto de luz como de oscuridad (obteniéndose embriones somáticos en aproximadamente 50 % de los callos colocados en medio libre de hormonas)

Una alta tasa de germinación de los embriones (80 %) se logró empleando medio MS/2 complementado con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico solo o en combinación con kinetina 1 mg L<sup>-1</sup>.

El óptimo desarrollo de las plantas se logró con los medios AIA 0,05 mg L<sup>-1</sup> + AG3 0,25 mg L<sup>-1</sup> y AIA 0,5 mg L<sup>-1</sup> +

AG3 0,5 mg L<sup>-1</sup>

Un alto porcentaje de supervivencia (70 %) se logró durante la fase de aclimatación a vivero, la cual se realiza manteniendo las plántulas en medio de arena y tierra, cubiertas por aproximadamente 15 días.

Una elevada proliferación embriogénica (aproximadamente 15 embriones por callo de 1,5 cm de diámetro), se ha logrado al subcultivar los callos libres de embriones, en un medio sin hormonas.

Debido que el material sembrado partió de árboles de más de un año de edad, existe la probabilidad que la vía embriogénica pueda ser implementada en material "elite" adulto para programas de producción.

Se ha demostrado la propagación masiva de *Alnus acuminata* por la vía de la embriogénesis somática.

### Recomendaciones

Se recomienda el escalamiento de la propagación masal de aliso cerezo mediante biorreactores o sistema RITA, en situaciones tales como propagación de material seleccionado en programas de producción de madera para ebanistería, producción de pulpa, o producción de cercas vivas, en las cuales la utiliza-

ción de material “elite” sería lo deseable.

### Agradecimientos

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” –COLCIENCIAS– por el apoyo al conocimiento y conservación de nuestros recursos naturales y al Grupo de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales por su constante colaboración.

### Bibliografía

- Badilla, M.M.V., Hidalgo D., N., Guevara B.E. & Murillo, G. O. 1992. Cultivo *in vitro* de Plántulas de Jaúl (*Alnus acuminata*). “*Tecnología en Marcha*”. 11(3):3-9.
- Bonneau, L., Monin, J. 1994. “Somatic embryogenesis and plant regeneration in a woody species: the European Spindle Tree (*Eunymus europaeus* L.) “. *Plant Cell Report*. 13:135-138
- Bousquet, J; Girouard, E; Strobeck, C; Dancik, BP; Lalonde, M.1989. Restriction fragment polymorphisms in the rDNA region among seven species of *Alnus* and *Betula papyrifera*. *Plant-and-Soil*. 118:1-2, 231-240.
- Conif, 1996. *Latifoliadas Zona Alta: Aliso*. Servicios Técnicos. Santafé de Bogotá. pp. 22-36.
- Cremiere, L., Shay, H., Prat, D. 1987. “*In vitro* culture of *Alnus species*”. *Acta Hortic*, (212):543-546.
- Dhawan, V. 1993. “Micropropagation of nitrogen fixing trees”. *For. Sci.* V. 41 pp. 303-315.
- Enrico, R. J. 1998. “Citocininas en la producción de múltiples vástagos en el cultivo *in vitro* de epicótilos de *Alnus acuminata*”. *Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*. La Habana. pp. 93-94.
- Fernández, G., Celestino, C. & Toribio, M. 1995. “Influence of External Factors on Secondary Embryogenesis and Germination in Somatic Embryos from Leaves of *Quercus suber*”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 41:99-106.
- González, C. y Vilca, J. 1998. “Micropropagación vegetativa “*in vitro*” de aliso (*Alnus acuminata*)”. *Rasefor*. Lima. 41 pp.
- Guan-Changhui; Akkermans-Adl; Kammen-a-Van; Bisseling-T; Pawlowski-K; Guan-CH; Van-Kammen-A; Berry-AM (ED.); Myrold-DD1997. ag13 is expressed in *Alnus glutinosa* nodules in infected cells during endosymbiont degradation and in the nodule pericycle. *Physiologia-Plantarum*. 99:4, 601-607.
- Halloy, S. 1996. Andean alder - *Alnus acuminata*. Invermay Agricultural Centre. [www.ALISO\andean.htm](http://www.ALISO\andean.htm).
- Hodson, E., Rodríguez, C.A. & Chemas, A. 1988. “Propagación Vegetativa de *Alnus acuminata* H.B.K. por Cultivo de Tejidos Vegetales”. *Rev. Fac. Cienc. Univ. Jav.* 1(2):67-77.
- Kaur, R; Sharma, DR; Srivastava, DK 1993. “Micropropagation of *Alnus nepalensis*”. *Indian-Journal-of-Forestry.*, 16:2, 162-164.
- Lavarde, F. 1987. “Apex tissue culture of alder (*Alnus glutinosa* Gaert). Preliminary results”. *Acta Hortic*. (212):547-550.
- Marulanda, M.L., Gutiérrez, L.G., Vento, H. 1998. Propagación de aliso cerezo (*Alnus acuminata* H.B.K.) a partir de embriogénesis somática. *Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*. La Habana. p. 139.
- Marulanda, M.L. 2000. *Propagación in vitro y caracterización molecular de Mora de castilla (Rubus glaucus)* Tesis Doctoral. Universidad Agrícola de la Habana.
- Perinet, P., Tremblay, F.M. 1987. Commercial micropropagation of five alnus species. *New For.* V. 1 (3) pp. 225-230.
- Rout, G. R., Samantaray, S & Das, P. 1995. “Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus of *Acacia catechu* -a multipurpose leguminous tree”. *Plant Cell, Tissue*

and Organ Culture.

V. 78 pp. 171-179.

Tang-Dingqin; Ishii-K; Ohba-K; Tang-DQ. 1996. "In vitro regeneration of *Alnus cremastogyne* Burk from epicotyl explants". *Plant-Cell-Reports*. 15:9, 658-661.

Tremblay, F.M., Perinet, P., Lalonde, M. 1986. "Tissue culture of *Alnus* spp. With regard to symbiosis". *Biotech. Agric. For.* V. 1, pp. 87-100.

Tremblay, F.M., Nesme, X., Lalonde, M. 1984. "Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.) Pursch (nodulation genes for ability to associate with frankia)". *Plant Soil*.

Wakita, Y. 1997 Plant regeneration from protoplasts of broad-leaved trees. *Bulletin-of-the-Utsunomiya-University-Fo rests*, N° 33, pp. 55-108.