

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

Does gibberellin increase the acclimation of seedlings of *Alnus acuminata* to arsenic?

Nataly Poveda-Díaz^a, Carolina Ramos-Montaña^{b*}, Karen L. Pulido-Herrera^a

^aUniversidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida central del norte 39-115, Tunja-Colombia.

*Autor de correspondencia: ^bUniversidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Laboratorio de Ecología de Organismos (GEO-UPTC), Avenida central del Norte 39-115, Tunja-Colombia, carolina.ramos@uptc.edu.co

SUMMARY

Arsenic is a metalloid naturally distributed in the lithosphere. However, anthropogenic factors, such as mining, increase pollution in soils. The objective of this research was to evaluate the effect of different concentrations of gibberellins (GA₃) on the early development of *Alnus acuminata*, and determine if this treatment offers pre-acclimation under arsenic concentrations similar to those of coal mining soils of Boyacá (Colombia). Certified seeds of *A. acuminata* were pre-embedded in water at 4 °C for 24 hours and planted in boxes with 16 combined treatments of gibberellins (0, 80, 160 and 240 mg L⁻¹) and arsenic (0, 3, 6 and 9 mg L⁻¹). Germination, morphometry of germinants, early development and final seedling biomass were evaluated 30 days after sowing. The germination kinetics of *A. acuminata* was affected by GA₃ and arsenic. GA₃ increased germination by 44 %, nonetheless arsenic increased the average germination time by 10 %. Arsenic concentrations of 3 mg L⁻¹ and 6 mg L⁻¹ had negative effects on germination and root length; however, these effects were not observed at 9 mg L⁻¹ of arsenic. In fact, the arsenic in this concentration combined with gibberellin increased the biomass and vigor of *A. acuminata*. The combined treatment of 9As + 160GA₃ is recommended to produce pre-acclimatized seedlings that could be tested in planning of post-mining recovery.

Key words: arsenic, germination, coal mining, seedlings, tolerance.

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 (GA₃) 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⁻¹) y arsénico (0, 3, 6 y 9 mg L⁻¹). 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 GA₃ y arsénico. El GA₃ aumentó en un 44 % la germinación, pero el arsénico aumentó el tiempo medio de germinación en un 10 %. Las concentraciones de 3 mg L⁻¹ y 6 mg L⁻¹ de arsénico tuvieron efectos negativos en la germinación y la longitud de la raíz, pero estos efectos no se observaron a 9 mg L⁻¹ 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 µg L⁻¹ (Ma 2018).

Las concentraciones de arsénico en suelos contaminados suelen ser superiores a 10 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^{-1} ; 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 germina-

ción 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^{-1} 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 35 %, y el pretratamiento recomendado por Ramos-Montaña (2018) es de mínimo 24 horas de imbibición a temperaturas frías ($3 \text{ a } 4 \text{ }^\circ\text{C}$).

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 mg L^{-1} , que corresponden a un rango de concentraciones similares a las encontradas en suelos de minería de carbón de Samacá-Colombia (Ramos-Montaña 2018), este fue disuelto para la preparación de una solución stock de alta concentración. Los tratamientos de giberelina consistieron en soluciones con ácido giberélico (GA_3) a concentraciones de 0, 80, 160 y 240 mg L^{-1} . Las concentraciones de arsénico y GA_3 se combinaron dando lugar a un total de 16 tratamientos.

Experimento 1, germinación. Las semillas pre-embebidas se separaron en grupos de 0,5 gramos (unidad experimental, aproximadamente 500 semillas y cinco repeticiones por tratamiento) de peso y se colocaron sobre papel filtro en bandejas de plástico de $13 \times 11 \text{ cm}$; 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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y 12 horas con luz a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 GA₃.

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 GA₃.

Análisis estadístico. Los datos de germinación fueron corregidos por la pureza y expresados en porcentaje. Se ve-

rificó 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⁻¹ GA₃, que incrementaban en un 44 % la germinación con relación al control (figura 1).

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⁻¹ y 160 mg L⁻¹ de GA₃ tuvo efectos negativos para la germinación aumentando el tiempo medio de germinación hasta en un 24 %. Los coe-

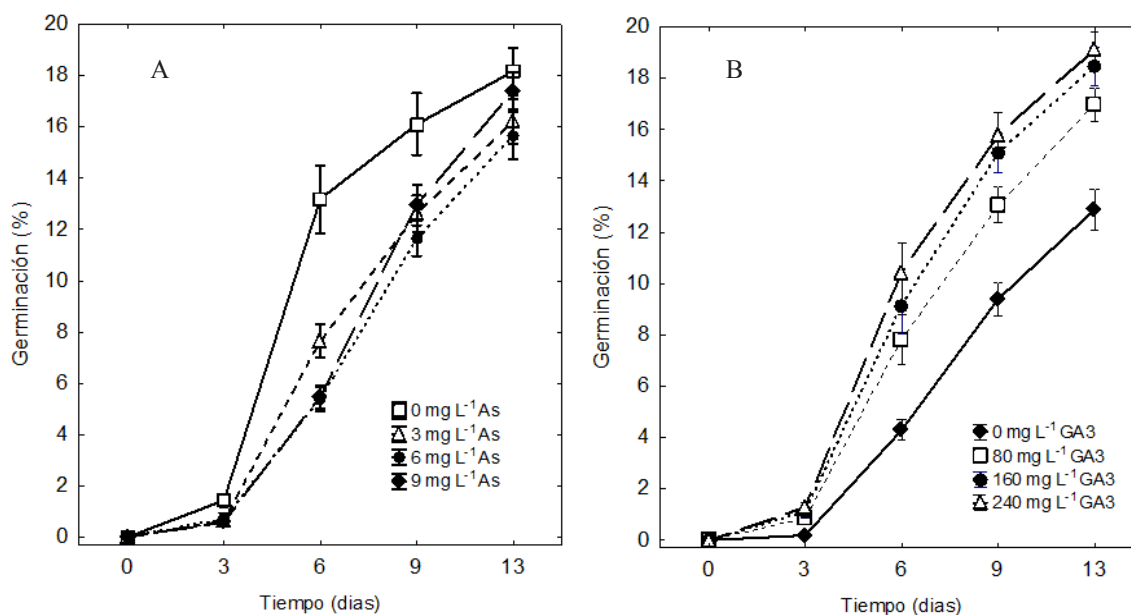


Figura 1. (A) Efecto de la concentración de arsénico en la germinación de *A. acuminata* (B) Efecto de las giberelinas en la germinación de *A. acuminata*.

(A) Effect of arsenic concentration on germination of *A. acuminata* (B) Effect of gibberellins on germination of *A. acuminata*.

ficientes 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⁻¹ 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⁻¹). 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).

Se encontró efectos significativos del arsénico, de las giberelinas y de la interacción arsénico x GA₃ sobre el desarrollo primario de los germinados ($P < 0,01$). La aplicación de 240 mg L⁻¹ de GA₃ 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⁻¹ 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 foto-

tropismo positivo fue 37 % menor cuando se aplicaron altas concentraciones de giberelinas (160 y 240 mg L⁻¹), mientras que no hubo efectos específicos por parte del arsénico (figura 2).

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⁻¹ 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).

La aplicación de arsénico afectó la biomasa de raíz tallo y cotiledones, pero no el tamaño del germinado. La aplicación de 9 mg L⁻¹ 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

Cuadro 1. Influencia del As y GA₃ 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.

Influence of As and GA₃ on the kinetics of germination and seed vigor of *Alnus acuminata*. MGT: Mean germination time. CVG: Coefficient of velocity of germination. VI: Vigor index.

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

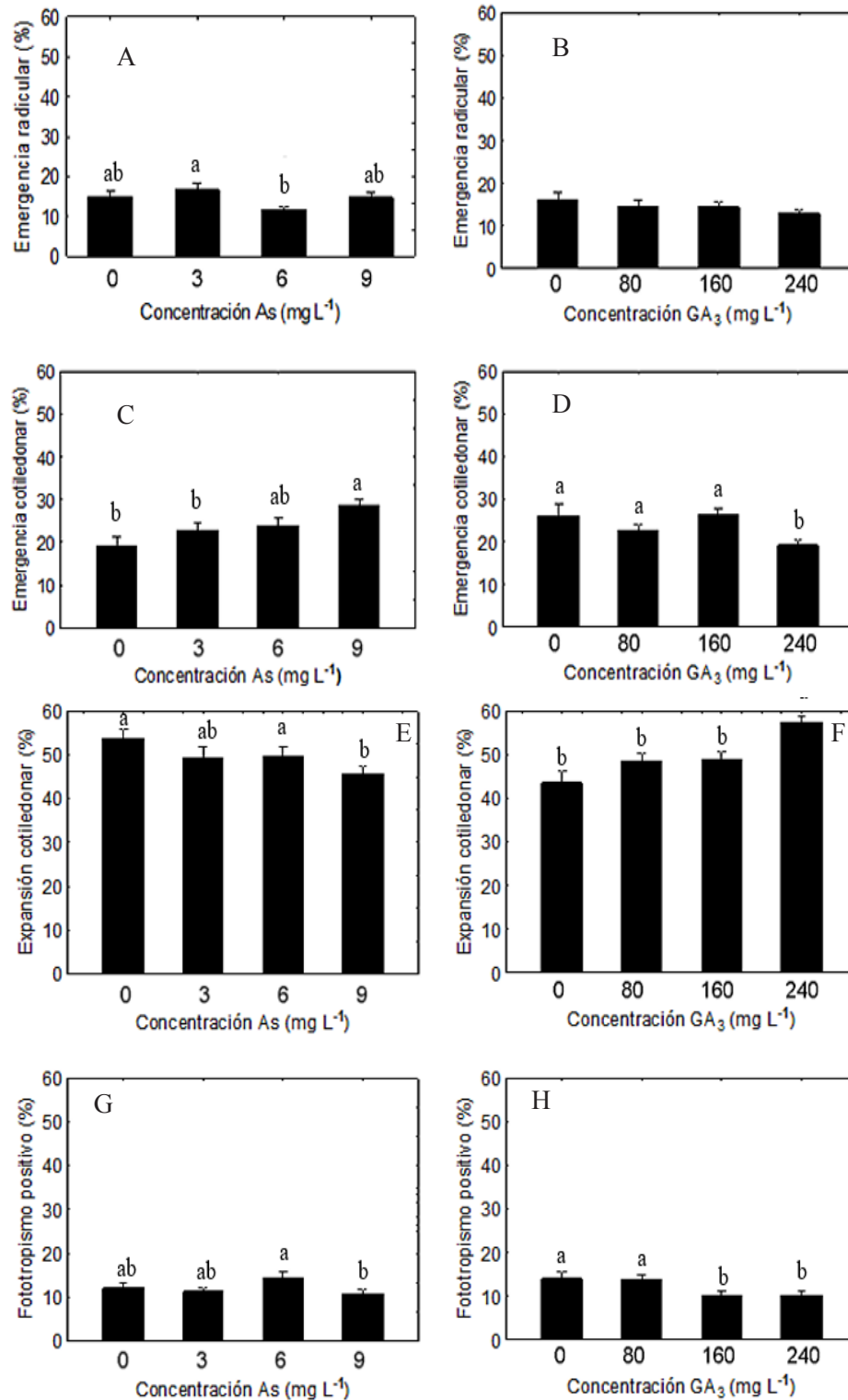


Figura 2. Respuesta del desarrollo primario de germinados de *A. acuminata* (Media \pm error estándar) a diferentes tratamientos de arsénico (As) y giberelina (GA₃). (A-B) Emergencia radicular; (C-D) Emergencia cotiledonar; (E-F) Expansión cotiledonar; (G-H) Fototropismo positivo. Los valores corresponden a frecuencias relativas del total de germinados obtenidos al final de 13 días desde la siembra.

Responses of early development of germinants of *A. acuminata* (Mean \pm standard error) under different treatments of arsenic (As) and gibberellin (GA₃). (A-B) Radicle protrusion, (C-D) Cotyledon emergency, (E-F) Cotyledon expansion, (G-H) Positive phototropism. Values are expressed as relative frequencies of the overall germinants 13 days after sowing the seeds.

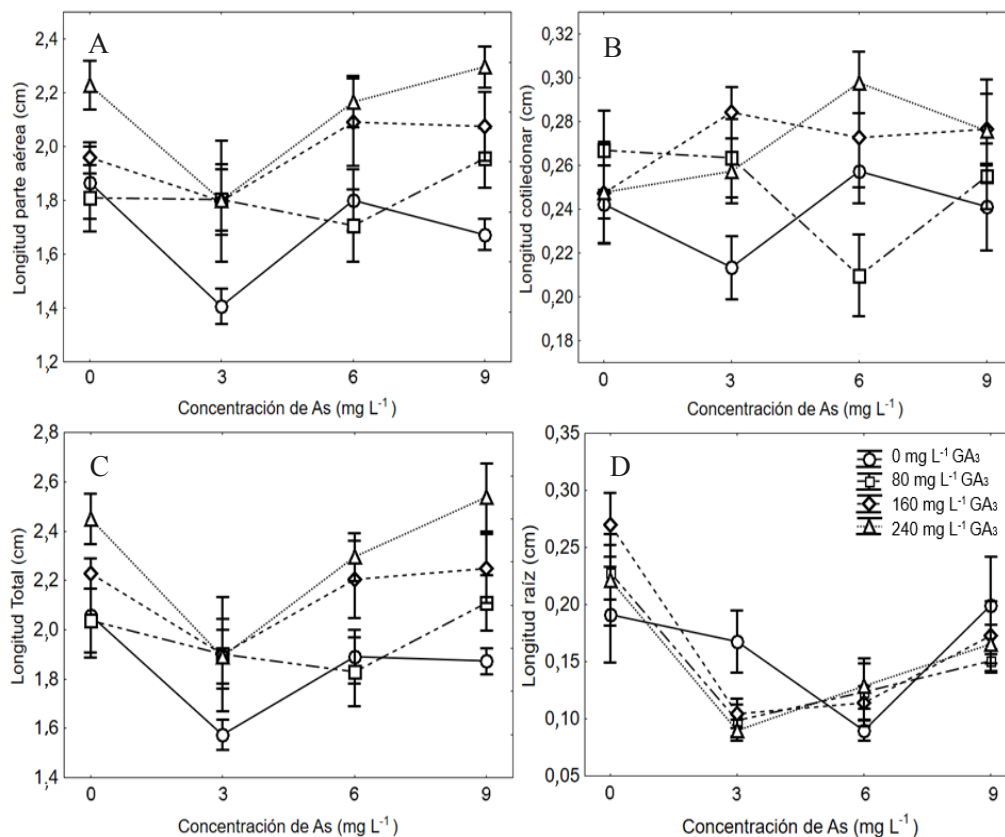


Figura 3. Morfometría de germinados. (A) Longitud de parte aérea; (B) Longitud cotiledonar; (C) Longitud total (D) Longitud de raíz. Morphometry of germinants (A) Length of aerial part, (B) Cotyledon length, (C) Total length, (D) Root length.

la biomasa de cotiledones. La aplicación de 240 mg L⁻¹ de GA₃ 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⁻¹ y 240 mg L⁻¹ de GA₃ registra la mayor biomasa de cotiledones y parte aérea.

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 mg GA₃ L⁻¹, 9 mg As L⁻¹ y el tratamiento combinado de 240 GA₃ + 9As, 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.

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⁻¹.

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*

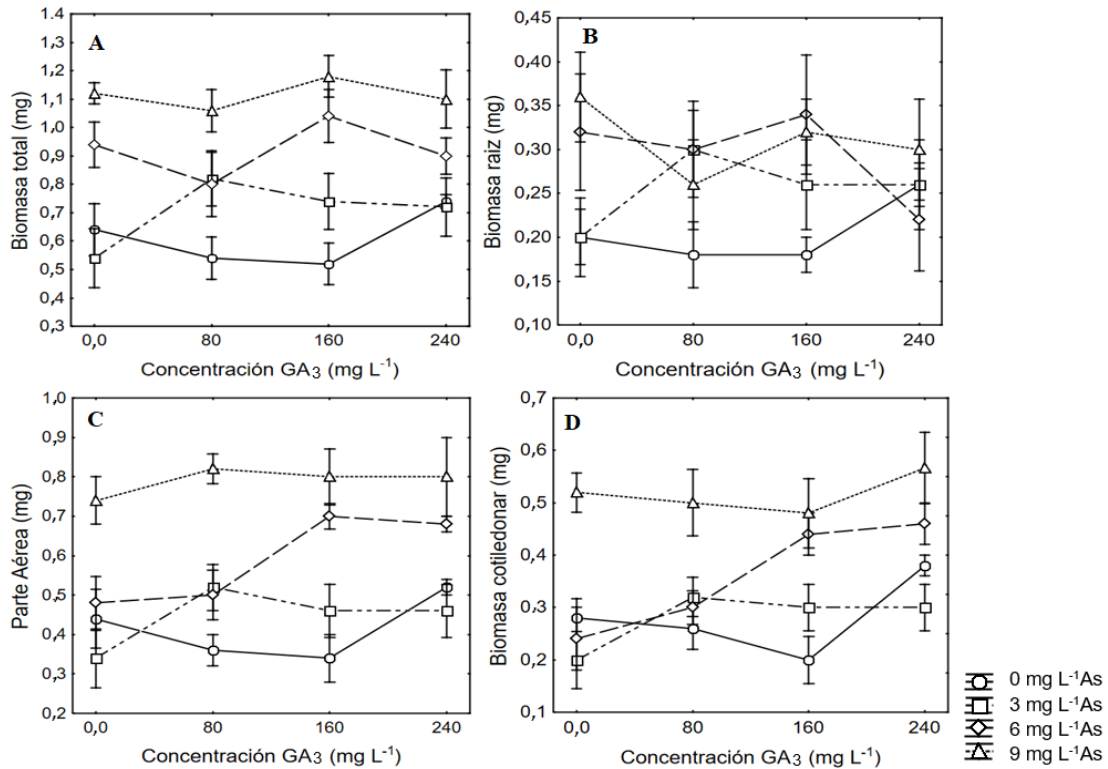


Figura 4. Biomasa de plántulas al final de 30 días de seguimiento: (A) Total, (B) raíz, (C) parte aérea, (D) cotiledones.
 Biomass of seedlings at the end of 30 days of monitoring. (A) Total, (B) Root, (C) Aerial part, (D) Cotyledons.

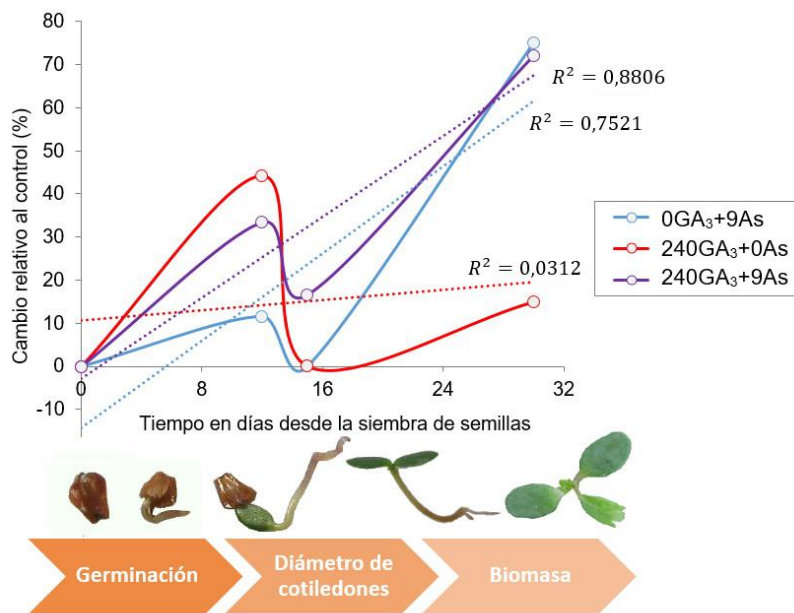


Figura 5. Influencia de 9 mg L⁻¹ de arsénico, 240 mg L⁻¹ de GA₃ y el tratamiento combinado 9As+240GA₃ sobre la germinación y el desarrollo primario de *A. acuminata*. Los valores corresponden al cambio en porcentaje relativo al control (0,0As+0,0GA₃). Las líneas de tendencia con sus correspondientes coeficientes de regresión muestran un efecto positivo generalizado del arsénico más que de la giberelina.

Influence of the treatments: 9 mg L⁻¹ of arsenic, 240 mg L⁻¹ of GA₃ and the combination 9As+240GA₃ on the germination and early development of *A. acuminata*. Values are the percentage change in relation to the control (0.0As+0.0GA₃). Lineal tendencies with their regression coefficients show a generalized positive effect from arsenic more than that obtained from gibberellin.

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⁻¹, 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⁻¹ 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 GA₃ 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⁻¹ de GA₃ y 9 mg L⁻¹ 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 fitoremediación 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(7): 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 Agronomía 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(4): 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 H₂O₂ 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(366): 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/ifer1082-007](https://doi.org/10.3832/ifer1082-007)
- 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 Ar13 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 Tejovathi. 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* 327: 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*. p. 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)

