

EFFECTO DE LA LUZ Y DEL ACIDO GIBERELICO SOBRE LA GERMINACION *in vitro* DE JAUL (*Alnus acuminata*)¹

Emanuel Araya*, Luis Gómez^{2/**}, Nancy Hidalgo^{***}, Roberto Valverde^{**}

Palabras clave: jaúl, ácido giberélico, germinación, luz, *Alnus acuminata*.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la luz y el ácido giberélico (AG₃) sobre la germinación de semillas de jaúl (*Alnus acuminata*) en condiciones *in vitro*. Las semillas de jaúl exhibieron un alto requerimiento de luz para su germinación *in vitro*. El ácido giberélico promovió una mayor y más rápida germinación de las semillas de jaúl, conforme aumentó la concentración en condiciones de luz; pero tuvo poco efecto a la oscuridad. Se discute el control de la germinación de las semillas de jaúl por un sistema de fitocromo y su relación con las giberelinas. Los resultados obtenidos *in vitro* coinciden con los publicados por otros autores, trabajando en condiciones *ex vitro*.

ABSTRACT

Effect of light and gibberellic acid on *in vitro* germination of *Alnus acuminata*. The effect of light and gibberellic acid on seed germination of alder (*Alnus acuminata*) was studied under *in vitro* conditions. Alder seeds exhibited a high light requirement to germinate. Germination of seeds not exposed to light was only 15%. Gibberellic acid improved seed germination under light conditions, but not in darkness. These *in vitro* results are similar to those reported by authors working on *ex vitro* conditions. The possible regulation of alder seed germination by the phytochrome and its relation with gibberellic acid is discussed.

INTRODUCCION

El jaúl (*Alnus acuminata*) es un árbol nativo de América Central y América del Sur, se extiende desde México hasta Argentina. En Costa Rica crece en forma natural en la Cordillera de Talamanca, División de Pérez Zeledón, Volcán Turrialba, Volcán Irazú y Bajos del Toro. Se desarrolla en lugares húmedos y nublados como el bosque montano bajo y montano húmedo. El mayor crecimiento del árbol ocurre en suelos pro-

fundos y bien drenados de tipo limo-arenoso; no obstante, esta especie tiene la ventaja de que se adapta a condiciones de suelo difíciles como son los suelos pobres y pedregosos (Muñoz 1998). También forma una simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Frankia*, que lo convierte en un importante fijador de nitrógeno atmosférico. Se estima entre 2 kg y hasta 300 kg la cantidad de nitrógeno fijado por hectárea por año. Debido a estas características el jaúl es considerado un componente importante para sistemas

1/ Recibido para publicación el 21 de marzo del 2000.
2/ Autor para correspondencia.
* Bachillerato de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
*** Escuela de Ingeniería Agrícola, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

silviculturales y agroforestales (Russo 1994). Las plantaciones de *Alnus* se establecen con árboles que provienen de semilla, la cual sobrepasado el mes de almacenamiento presenta solamente un 50% de germinación (Muñoz 1998). Es necesario estudiar los diferentes aspectos que influyen sobre la germinación de la semilla y su almacenamiento, para desarrollar procedimientos que permitan un mejor aprovechamiento de la misma.

La germinación de la semilla es un proceso complejo y sensible, tanto a las condiciones ambientales (nutrimentos, temperatura, agua y luz) como a las sustancias endógenas del crecimiento (comúnmente conocidas como fitohormonas) (Arteca 1996). Dentro de los factores ambientales, se ha observado que las semillas de muchas especies requieren luz para germinar y para algunas, la luz, es un requerimiento obligatorio (Jull y Blazich 2000). En semillas sensibles a la luz, la germinación es regulada por el fitocromo (Kamiya y García-Martínez 1999). En cuanto a los reguladores de crecimiento, las giberelinas han sido implicadas directamente en el control y la promoción de la germinación de las semillas, mientras que el ácido abscísico la inhibe (Arteca 1996, Watkinson y Pill 1998). El etileno y las citocininas también promueven la germinación de las semillas de algunas especies (Miller 1956, Prasad et al. 1996). Recientemente, se ha presentado evidencia molecular que involucra al fitocromo en el control del metabolismo y la síntesis de giberelinas, estableciendo una relación directa entre ambos factores.

En jaúl, Hernández (1990) determinó que las semillas requieren luz para germinar y que esta respuesta está bajo el control del fitocromo. La aplicación de ácido giberélico a una concentración de 5 mg/L en la oscuridad sustituyó el requerimiento luminoso. El estudio se llevó a cabo en cámaras de germinación,

Como se mencionó anteriormente, la germinación de la semilla, al igual que otros fenómenos del desarrollo de la planta, es un proceso complejo e influido por una gran cantidad de variables. El cultivo *in vitro* es una herramienta que permite reducir el efecto de estas variables, al proveer un ambiente controlado y libre de contaminantes. Comercialmente, el cultivo *in vitro* se

utiliza para la germinación de semillas de orquídeas y para el rescate de embriones en programas de mejoramiento genético (Prakash y Pierik 1993).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de semillas de jaúl (*Alnus acuminata*).

MATERIALES Y METODOS

Procedencia y desinfección de la semilla

Las semillas de jaúl (*Alnus acuminata*) se recolectaron en el Parque Nacional Ricardo Jiménez Oreamuno, ubicado en Prusia, Cartago, Costa Rica. La recolecta la realizó el Dr. Olman Murillo, Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. La desinfección de las mismas consistió en un lavado inicial con agua; luego se sumergieron en alcohol al 70% durante 1 min y finalmente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 min, en agitación constante. En una cámara de flujo laminar se lavaron 3 veces con agua estéril, durante 1 min cada vez, antes de colocarse en el medio de cultivo.

Medio de cultivo

El medio de cultivo consistió de las sales minerales y las vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa y 8.0 g/L de agar. El medio se dispensó en tubos de ensayo de 18x150 mm (10 ml/tubo). El pH se ajustó a 5.7 antes del autoclavado. Se sembró una semilla por tubo de ensayo y 20 semillas por tratamiento.

Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron 4 concentraciones de AG₃: 0; 0.5; 1.0 y 2.0 mg/L y 2 condiciones de luz: fotoperíodo de 12 h provisto por luces fluorescentes y oscuridad.

En todos los casos la temperatura se mantuvo en $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

VARIABLES EVALUADAS

Se determinó el porcentaje de germinación y la altura de las plántulas semanalmente, durante 7 semanas.

RESULTADOS

El procedimiento de desinfección utilizado permitió obtener un 100% de las semillas libres de contaminantes.

Efecto de la luz y la oscuridad sobre la germinación de las semillas

Las semillas colocadas en la oscuridad mostraron un porcentaje de germinación muy bajo (15%), mientras que las semillas expuestas a la luz alcanzaron una germinación del 61%, promedio de todas las concentraciones de AG_3 (Cuadro 1, Figura 1), luego de 5 semanas de iniciado el experimento.

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de AG_3 sobre el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de jaúl, a la luz y a la oscuridad.

Tratamiento (mg/L)	Germinación (%)			
	1 ^{ra} sds		5 ^{ta} sds	
	Luz	Osc	Luz	Osc
0.0 AG_3	25	0	50	15
0.5 AG_3	35	5	55	15
1.0 AG_3	50	0	60	10
2.0 AG_3	55	5	80	20
Promedio	41	2.5	61	15

sds: semanas después de la siembra.

El porcentaje de germinación aumentó con el tiempo en ambas condiciones de cultivo, mostrando una estabilidad luego de la cuarta semana para las semillas colocadas a la luz y de la sexta semana para aquellas en oscuridad (Figura 1).

Efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG_3)

El ácido giberélico promovió una mayor y más rápida germinación de las semillas de jaúl,

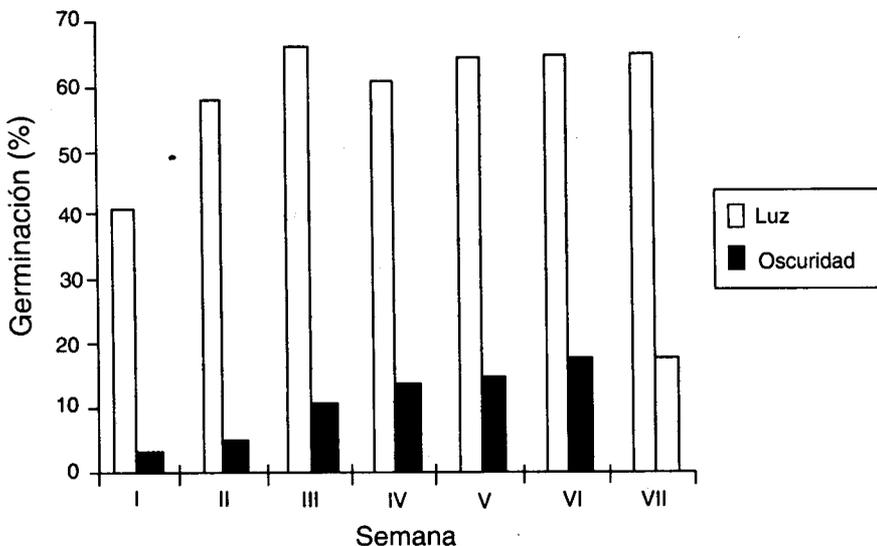


Fig. 1. Efecto de la luz sobre la germinación *in vitro* de semillas de jaúl (*Alnus acuminata*).

conforme aumentó la concentración en condiciones de luz; pero tuvo poco efecto a la oscuridad (Cuadro 1). Luego de 5 semanas de cultivo, el porcentaje de germinación alcanzado en la mayor concentración de AG_3 (2 mg/L) fue de 80% para las semillas expuestas a la luz y de 20% a la oscuridad. En el rango de concentración evaluado no se observó un efecto inhibitorio del ácido giberélico sobre la germinación (Figura 1).

La altura de las plántulas fue similar en todos los tratamientos, aunque aquellas provenientes de semillas germinadas en un medio suplementado con AG_3 presentaron valores promedio mayores, que aquellas de semillas germinadas en un medio desprovisto del regulador de crecimiento (Cuadro 2).

DISCUSION

Efecto de la luz sobre la germinación de las semillas

Las semillas de jaúl mostraron un requerimiento de luz para su germinación *in vitro*. Resultados similares fueron descritos por Hernández (1990) en condiciones *ex vitro*, quien determinó que la germinación de las semillas de jaúl está bajo el control de un sistema de fitocromo. La luz es un requisito absoluto para la germinación de muchas especies (Jull y Blazich 2000). La iluminación parece promover el aumento de la concentración de sustancias promotoras de la germinación o disminuir la concentración de in-

hibidores, o una combinación de estos dos efectos (Arteca 1996).

Efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG_3)

La adición de giberelinas al medio de cultivo promovió una mayor y más rápida germinación de las semillas de jaúl *in vitro*, especialmente bajo exposición a la luz. Se observó una relación directa entre concentración y porcentaje de germinación (Cuadro 1). Con las concentraciones evaluadas no se alcanzó una concentración máxima después de la cual se observara un efecto inhibitorio (Cuadro 1). Las giberelinas han sido directamente implicadas en el control y la promoción de la germinación en diferentes especies (Arteca 1996).

En las concentraciones evaluadas (hasta 2 mg/L), el ácido giberélico (AG_3) no eliminó el requerimiento luminoso de las semillas de jaúl, ya que a la oscuridad, ninguna de las concentraciones de ácido giberélico permitió alcanzar los porcentajes de germinación observados en semillas colocadas a la luz. Por su parte, Hernández (1990) encontró, *ex vitro*, que el ácido giberélico a 5 mg/L estimuló en un 100% la germinación de semillas de jaúl mantenidas en oscuridad continua a 29.5°C. Además, que concentraciones de 100-500 mg/L también promovieron la germinación; pero cuando se compararon con 5 mg/L, presentaron una inhibición de 10% y de 35%, respectivamente.

Cuadro 2. Efecto de la adición de ácido giberélico al medio de cultivo sobre la altura de plántulas de jaúl, provenientes de semillas germinadas *in vitro* a la luz (promedio \pm desviación estándar).

Tratamiento (mg/L)	Semanas de cultivo <i>in vitro</i>					
	II	III	IV	V	VI	VII
0.0 AG_3	0.8 \pm 0.16	1.0 \pm 0.69	1.3 \pm 0.71	1.5 \pm 1.02	1.9 \pm 1.17	2.1 \pm 1.23
0.5 AG_3	0.7 \pm 0.40	1.4 \pm 0.62	2.0 \pm 0.86	1.7 \pm 1.19	2.0 \pm 1.28	1.9 \pm 1.31
1.0 AG_3	0.9 \pm 0.31	1.8 \pm 0.60	2.1 \pm 0.75	2.2 \pm 1.17	2.3 \pm 1.35	2.3 \pm 0.92
2.0 AG_3	0.9 \pm 0.45	1.8 \pm 0.77	2.3 \pm 0.95	2.6 \pm 1.01	2.7 \pm 1.07	2.8 \pm 0.53

Hernández (1990) propuso que el control de la germinación de las semillas de jaúl, por parte de un sistema de fitocromo, ocurre mediante la síntesis de sustancias de crecimiento tipo giberelinas, ya que el requerimiento luminoso puede ser sustituido por una fuente exógena de ácido giberélico. En lechuga, Kamiya y García-Martínez (1999) establecieron que la luz promueve la síntesis de AG_1 a través de la inducción de la enzima AG_3 -b-hidroxilasa mediada por la acción del fitocromo. La luz roja induce la expresión de la enzima mientras que la luz roja lejana inhibe el proceso. En otras especies, sin embargo, el AG_3 no contrarresta el efecto inhibitorio de la oscuridad sobre la germinación de las semillas, aunque sí acelera la germinación a la luz, como ocurrió en el presente trabajo (Figura 1 y Cuadro 1) (Arteca 1996). Es necesario evaluar concentraciones mayores de AG_3 *in vitro* para determinar si al aumentar la concentración se promueve la germinación de las semillas de jaúl a la oscuridad.

El tipo de giberelina también puede influir en la diferencia en la respuesta sobre la sustitución del requerimiento luminoso, observado por Hernández (1990) y no en el presente trabajo. En el estudio *in vitro* se empleó AG_3 . Hernández (1990) no especificó el ácido giberélico utilizado. En semillas de lechuga, Kamiya y García-Martínez (1999) establecieron que AG_1 es la forma biológicamente activa que promueve la germinación. Los contenidos endógenos de AG_1 se incrementan después del tratamiento con luz roja. El AG_3 , por su parte, promueve la germinación en semillas de lichi (Prasad et al. 1996) y de algunas gramíneas (Watkinson y Pill 1998).

Las citocininas, otro grupo de bioreguladores, han sido involucradas en la respuesta del fitocromo y son capaces de contrarrestar el efecto inhibitorio de la luz roja lejana en la germinación de las semillas de lechuga (Miller 1956), por lo que deberían evaluarse en futuras investigaciones.

El ácido giberélico favoreció ligeramente la elongación de las plántulas provenientes de semilla (Cuadro 2). Está bien documentado que el AG_3 promueve la elongación de los entrenudos y la división celular; pero su efecto depende del genotipo (Arteca 1996).

En ausencia de giberelinas y a la luz, se obtuvo un 50% de germinación a la quinta semana de evaluación. Este porcentaje de germinación es relativamente alto y posiblemente ligado al uso del hipoclorito de sodio (NaOCl) durante la desinfección superficial de las semillas. El hipoclorito de sodio ejerce un efecto escarificador y promueve la germinación en varias especies. También se ha observado un efecto aditivo con el ácido giberélico o con tratamientos de frío (Watkinson y Pill 1998).

Los resultados descritos en el presente trabajo coinciden con los de Hernández (1990), realizados *ex vitro*, en lo referente al efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación de las semillas de jaúl expuestas a la luz. A la oscuridad, la aplicación de ácido giberélico no sustituyó el requerimiento luminoso. De manera que el sistema *in vitro* podría emplearse en el estudio de otros aspectos de la fisiología de las semillas de jaúl y de otras especies forestales. Desde el punto de vista práctico, la germinación de las semillas de jaúl puede aumentarse y acelerarse mediante el tratamiento de las mismas con AG_3 (2 mg/L) y su exposición a la luz (fotoperíodo de 12 h).

LITERATURA CITADA

- ARTECA, R. 1996. Plant growth substances. Principles and Applications. Chapman and Hall. New York, USA. 331 p.
- HERNANDEZ, R. 1990. Un estudio sobre la germinación de la semilla de *Alnus acuminata* H.B.K. Revista Forestal Venezolana (3):39-54.
- JULL, L.; BLAZICH, F.A. 2000. Seed germination and selected provenances of Atlantic White-Cedar as influenced by stratification, temperature, and light. Hort Science 35:132-135.
- KAMIYA, Y.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. Current Opinion in Plant Biology 2:398-403.
- MILLER, C.O. 1956. Similarity of some kinetin and red light effects. Plant Physiology 31:318.
- MUÑOZ, F. 1998. Propiedades y usos de las maderas de jaúl y melina. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 37 p.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:437-497.
- PRAKASH, J.; PIERIK, R. 1993. *Plant Biotechnology: Commercial prospects and problems*. Oxford & IBH Publishing Co. New Dehli, India. 289.
- PRASAD, J.S.; KUMAR, R.; MISHRA, M.; KUMAR, R.; SING, A.K.; PRASAD, U.S. 1996. Characteristics of lichi seed germination. *Hort Science* 31:1187-1189.
- RUSSO, R. 1994. *Alnus acuminata*: A valuable nitrogen fixing tree for neotropic highlands. *In: International Expert Workshop on Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils* (1994, Turrialba, Costa Rica). CATIE. sp.
- WATKINSON, J.I.; PILL, W.G. 1998. Gibberellic acid and presowing chilling increase seed germination of indiagrass (*Sorghastrum nutans* (L.) Nash). *Hort Science* 33:849-851.