



ESTABLECIMIENTO INVITRO DE PLANTASNATIVAS DE ALISO (*Alnus acuminata*)- MORTIÑO (*Vaccinium meridionale*) A PARTIR DE SEMILLAS Y SEGMENTOS NODALES DE BOSQUE NATIVO DE LA MICROCUENCA DE LA QUEBRADA LAS TORRES

In vitro establishment of native alder (*Alnus acuminata*) - mortiño (*Vaccinium Meridionale*) plants from seeds and nodal segments of native forest in the microwa-Tershed of the Las Torres stream.

Dora Elena Merchan Naranjo. Ingeniera Sanitaria. Especialista en Sistemas Integrados de Gestión. Instructor. Centro Minero. helenmerchan@misena.edu.co.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue lograr el establecimiento in vitro de las especies aliso (*Alnus acuminata*) - mortiño (*Vaccinium meridionale*) debido a la dificultad de propagarlas sexual y asexualmente con técnicas convencionales. se utilizaron dos medios de cultivos los cuales por sus características se ajustan al material de reproducción, se seleccionaron el Murashige y Skoog (MS). Se escogió este medio MS ya que es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina. Posterior mente se realizó el otro medio de cultivo seleccionado WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown, 1980) Este medio se seleccionó teniendo en cuenta que es utilizado ampliamente para el cultivo de tallos de plantas leñosas y arbustivas, tipos de plantas para las que está especialmente adaptado este medio de cultivo. Adicionalmente a estos medios se utilizaron hormonas como la bencilaminopurina (BAP) y ácido Indolacético (IAA). Las cuales mejoran las características de multiplicación y enraizamiento. Durante el establecimiento de cultivos in vitro, un 4% de semillas asépticas desarrollaron raíces y algunos brotes, tan solo el 2% de las yemas mostraron entre dos y cuatro brotes basales. La propagación de aliso y mortiño tiene como fin la restauración y conservación de ecosistemas alto andinos en estado de deterioro y vulnerabilidad.

Palabras clave: Micropropagación, desinfección, especies leñosa y arbustivas, cultivo in vitro.

SUMMARY

The objective of this research was to achieve the in vitro establishment of the species aliso (*Alnus acuminata*) - mortiño (*Vaccinium meridionale*) due to the difficulty of propagating them sexually and asexually with conventional techniques. Two culture media were used, which due to their characteristics are suitable for the reproduction material, the Murashige and Skoog (MS) were selected. The

MS medium was chosen because it is suitable for most of the species, so it is widely used, except for the most sensitive to salinity, since it is characterized by a high saline concentration. Subsequently, the other selected culture medium was WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd and McCown, 1980). This medium was selected taking into account that it is widely used for the cultivation of stems of woody and shrubby plants, types of plants for which this culture medium is especially adapted. In addition to these media, hormones such as benzylaminopurine (BAP) and Indolacetic acid (IAA) were used. These improve multiplication and rooting characteristics. During in vitro culture establishment, 4% of aseptic seeds developed roots and some shoots, only 2% of the buds showed two to four basal shoots. The propagation of alder and mortiño is aimed at the restoration and conservation of high Andean ecosystems in a state of deterioration and vulnerability.

Key words: Micropropagation, disinfection, woody and shrub species, in vitro culture.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de los bosques altos andinos vienen siendo afectados negativamente por la alteración de las condiciones climáticas y por ciertas actividades antrópicas como lo es la actividad minera; el uso que el hombre le ha dado a los suelos de ha causado la alteración y deterioro de muchas especies nativas importantes para continuar con el equilibrio de los ecosistemas, transformado y afectando su paisaje y su riqueza natural; es por esto que se ve la necesidad de tomar acciones que contribuyan a la conservación y restauración de estos bosques nativos que son imprescindibles tanto para la fauna como para el ser humano.

Los procesos de restauración ecológica se ven considerablemente afectados por la escasez de propágulos de estas especies nativas sobre todo en la zona de estudio y es importante dar a conocer que estas especies presentan una gran utilidad potencial en procesos de

restauración y conservación del paisaje, así como en la recuperación de las cuencas hidrográficas. Adicionalmente, debido a sus frutos como el caso del mortiño y su floración son de gran importancia para la fauna nativa, ya que se debe tener en cuenta que la mayoría de las especies nativas se reproducen por semilla sexual, cuya disponibilidad depende de la duración de los ciclos de floración, de la capacidad de fecundación, fertilidad y germinación, además, dicha reproducción puede presentar dificultades por falta de una dispersión adecuada y de sitios para su establecimiento.

Al respecto, el desarrollo de estas plantas con la ayuda de biotecnologías relacionadas con procedimientos de propagación masiva de especies silvestres, sobre todo de aquellas que por muy diversas razones se encuentran en estado de vulnerabilidad y amenaza.

No obstante, la mayoría del material vegetal colectado en campo contiene patógenos endógenos que limitan su viabilidad y en las semillas, que son los explantes que garantizan el mantenimiento y aumento de la diversidad genética de una especie, estos contaminantes afectan negativamente su sobrevivencia retrasando el crecimiento de las plántulas ya que por protocolo estas deben llevarse a un proceso de desinfección, el cual altera notablemente sus propiedades y hay posibilidad que no se encuentren resultados exitosos.

Por tal razón, el objetivo de este estudio fue establecer a partir de semilla sexual y yemas un procedimiento para multiplicar in vitro plántulas de aliso y mortiño utilizables en un futuro en procesos de restauración y conservación de la zona de estudio.

METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro de desarrollo agroindustrial del Duitama CEDEAGRO, la colecta de los segmentos nodales de las plantas de aliso y de las semillas de las plantas de mortiño se llevó a cabo en la zona de la microcuenca de la quebrada las torres en

en la vereda de Morcá del municipio de Sogamoso departamento de Boyacá, a partir de árboles adultos ubicados en la zona de bosque nativo ubicada a 2864 msnm. Se seleccionaron 120 brotes de aliso del árbol seleccionado y 120 frutos de mortiño del árbol seleccionado, eligiendo los brotes de aliso y los frutos de mortiño con características propicias para su propagación, los cuales fueron introducidos inmediatamente en un frasco con agua estéril, cada frasco se colocó en una hielera para su transporte al laboratorio.



Fig. 1 Segmentos nodales de Aliso y frutos del mortiño, utilizados para micropropagación en condiciones de laboratorio.

Fuente: Autores

Desinfección de las semillas.

En el laboratorio se colocaron las semillas se lavaron con detergente líquido antibacterial comercial por 20 minutos, después se enjuagaron con agua destilada. Se sumergieron en una solución de alcohol anticéptico 70 % por 5 segundos se enjuagaron nuevamente con agua destilada y se sumergieron en hipoclorito de sodio 3% por 25 minutos, se enjuaga nuevamente y se sumergen en alcohol anticeptico por 5 segundos , enjuaga y 20 minutos en hipoclorito de sodio por 20 minutos, finalmente se enjuaga en cabina de flujo laminar para siembra.

Desinfeccion de las yemas.

Se sumergen en benlate por dos horas en constante agitacion con agua destilada, se enjuagan con agua destilada, se sumergen por 5 segundos en acohol anticéptico, se enjuaga con agua destilada se sumergen en hipoclorito de sodio al 3% por 15 minutos, enjuaga con agua destilada y se sumergen en hipoclorito de sodiao al 1% y tween al 20 % por 5 minutos y se realiza enjuagues con agua destilda en cámara para siembra.



Fig. 2 : Proceso de desinfección de las Yemas de aliso y de las semillas de Mortiño en Laboratorio
Fuente: Autores

Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo para germinación de semillas y para la propagación de las yemas axilares con el fin de inducir la germinación in vitro de semillas de mortiño y el crecimiento de nuevos brotes de las yemas de aliso, se empleó como base dos medios de cultivo el medio WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd & McCown, 1981) 1 g/lt de carbón activado como antioxidante y 7 mg/l. de dimetilalilaminopurina (2iP) como fitohormona para el desarrollo y crecimiento de los esquejes. El pH se ajustó a 5.8 y el medio MS (Murashige y Skoog) 1 g/lt de carbón activado como antioxidante y 1 mg/lt de BAP (Bencilaminopurina) como fitohormona para la inducción de yemas axilares. El pH se ajustó a 5.8. se esterilizó en autoclave a 120 °C a 15 lb de presión durante 15 min. Una vez realizada la siembra en recipientes de vidrio con capacidad de 200 ml, los explantes resultantes fueron incubados en cuartos de crecimiento a temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperíodo de 12 h luz con lámparas de luz blanca fría (2000 lux, aproximadamente).



Fig. 3 Preparación de medios de cultivo MS y WPM
Fuente: Autores

Introducción del material seleccionado in vitro

Se llevó a cabo la multiplicación vegetativa del aliso y mortiño en dos tipos de medios con la finalidad de observar su evolución en cada frasco. El trabajo se llevó a cabo en la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia usando el protocolo.



Fig. 3 Siembra en cabina
Fuente: Autores

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de semillas y yemas

En terminos de variables como explantes y

semillas libres de contaminación se determinó que el tiempo de exposición y las concentraciones a las cuales fueron expuestos los explantes dio como resultado explantes necrosados y el porcentaje de explantes sobrevivientes fue alto (8 %) en cuanto a las semillas de mortiño el proceso de desinfección dio como resultado un (4%) de semillas enraizadas esto se debe a la exposición química debido a la desinfección, la cual se ve en deterioro en la velocidad de germinación de las semillas.

El material seleccionado en cuanto a las semillas de mortiño y las yemas de aliso, el tratamiento de desinfección presentó diferentes respuestas de contaminación; presentaron un 13,75% de contaminación en los dos medios utilizados presentando una mayor contaminación el medio WPM para las dos especies, alcanzando una desinfección de 86.25% mediante el protocolo de desinfección utilizado. Sin embargo, el tiempo prolongado y a elevadas concentraciones, alteraron las condiciones fisiológicas de los explantes dando lugar a una necrosis y pérdida de la viabilidad. Del mismo modo, en esta especie se observó gran pérdida de material por necrosis de los explantes en todos los tratamientos de desinfección debido a que el material vegetal y las condiciones del medio donde se encuentra puede tener microorganismos endógenos.

Contaminación
Brotación 15 días
Brotación y enraizamiento 45 días

Aliso		Mortiño	
WPM	MS	WPM	MS
7* hongos	5* hongos	12* hongos	9* hongos
0	0	0	0
4	2	2	5

Tabla 1 Comparación de explantes y semillas germinadas con medios de cultivo.
Fuente: Autores

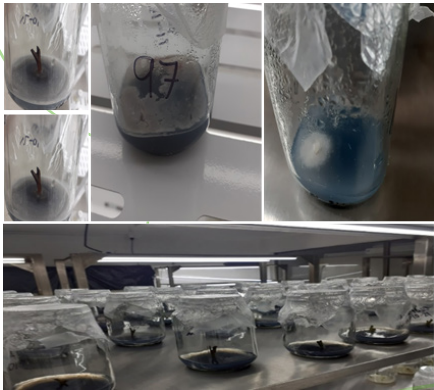


Fig. 5 5 medios de cultivo contaminados por hongos y explantes con necrosis
Fuente: Autores

*Porcentajes de valores teniendo en cuenta 60 repeticiones en cada uno de los medios en el cultivo in vitro de Aliso y Mortiño. el protocolo.

	Tratamientos	Explantes limpios %	Explantes necrosados%	Sobrevivencia%
Yemas	MS	8,3	91,7	1,2
De aliso	WPM	11,6	88,4	6,6
Semillas de mortiño	MS	15	85	8,3
	WPM	11,66	88,4	3,3

Tabla 2 Comparación de porcentajes de contaminación, necrosis y sobrevivencia.
Fuente: Autores

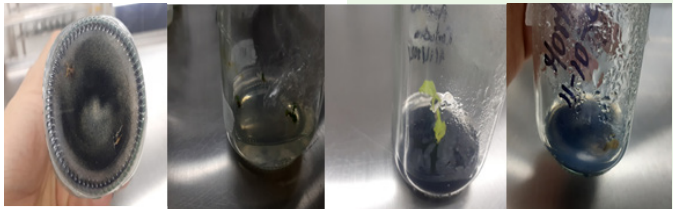


Fig. 6 sobrevivencia de semillas y segmentos nodales
Fuente: Autores

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La etapa de producción in vitro sigue siendo una de las etapas más limitante para el establecimiento de este material, debido a que el material de campo por coexistir con otros organismos en su ambiente natural desarrollan relaciones estrechas con ellos y esto resulta en la necesidad de aplicar desinfecciones muy drásticas a los explantes, lo que conduce a daños severos y fuertes oxidaciones que al final no conducen a un resultado final positivo.
- En ambas especies se logró el establecimiento in vitro utilizando el hipoclorito de sodio como agente desinfectante. Se concluye que el WPM es el mejor medio de cultivo para el desarrollo de aliso (*Alnus acuminata*); mientras que para mortiño (*Vaccinium meridionale*) el mejor medio de cultivo es MS. Además, se logró la inducción de brotes a partir de segmentos nodales de aliso y la germinación de semillas de mortiño. Sin embargo, se plantea que a partir de los datos obtenidos en ambas especies se sugiere que la multiplicación partir de segmentos nodales y semillas de mortiño se realice a partir de plantas madre tratadas que no estén expuestas a la contaminación directa del medio como hongos bacterias y polvo, lo cual fue un factor determinante en los resultados obtenidos teniendo en cuenta

los tiempos de desinfección que se realizaron. Lo anterior, las clasifica como especies altamente difíciles de establecer en condiciones in vitro. Es importante destacar que sí es posible su establecimiento en condiciones in vitro y que se deben estudiar otras metodologías de multiplicación y desinfección que permitan la propagación del material ya establecido.

AGRADECIMIENTOS

Se resalta la labor desarrollada por la ingeniera Sandra Mesa quien con sus aportes y conocimientos lideró el proceso de preparación y siembra del material, al laboratorio de Biotecnología del Centro de desarrollo agroindustrial del Duitama CEDEAGRO, al centro minero y a quienes por la gestión de la obtención de los recursos y los espacios necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE LOURDES TORRES, María; TRUJILLO, Diana; ARAHANA, Venancio S. Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). ACI Avances en Ciencias e Ingenierías, 2010, vol. 2, no 2.

Cárdenas, L.D. & Salinas, N.R. (2006). Libro rojo de plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas. I parte. Instituto de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá D.C. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

Castro, R.D., Jiménez, C.M., Ríos, G.D., Restrepo, A.C. & Giraldo, M.C. (1993). Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro para la propagación y conservación de germoplasma de cuatro especies vegetales en vías de extinción en el Oriente antioqueño. Comino, abarco, almendrón y guayacán. Cuaderno de Investigación y Desarrollo Regional No. 8. El Santuario. Cornare, 94 p.

Pedroza-Manrique, J. & Bejarano-Tibocha, H. (2008). Propagación vegetativa In Vitro de Puya santossi. Revista Colombiana de Biotecnología,

10(1), 36-48

MENESES, Luis, et al. Establecimiento in vitro de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y Avances en su Micropropagación. 2018.

CHAMORRO GARCÍA, Grace Carolina. Determinación de métodos de propagación sexual y asexual del mortiño (*Vaccinium floribundum*) con fines de conservación de la especie. 2019. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

CATOTA TIMBILA, Enma Verónica. Evaluación de dos métodos de propagación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), para la obtención de plántulas. 2022. Tesis de Licenciatura.

ORTIZ, César Gonzalos; AQUINO, Julio Vilca. Micropropagación vegetativa" in vitro" de aliso (*Ainus acuminata*).

CASTRO, Elena Corredoira; JANEIRO, Laura V.; SAN JOSÉ, M. Carmen. Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación del aliso con vistas a su conservación. Recursos rurales: revista oficial do Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural (IBADER), 2011, no 7, p. 49-57.

DE JARAMIJLO, Elizabeth Hodson; RODRÍGUEZ, Carmen E.; CHEMÁS, Alexandra. Propagacion vegetativa de *Alnus acuminata* HBK por cultivo de tejidos vegetales. Universitas Scientiarum, 1988, vol. 1, no 2, p. 67-77.



Foto: Lucía Tamara
Instructora área Ambiental

Aprendices SENA Centro Minero - Tecnólogo en Supervisión Agua y Saneamiento