

Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones *in vitro*

Control of phenolic oxidation of Handroanthus heptaphyllus nodal segments under in vitro conditions

Díaz-Lezcano Maura Isabel^{1,*}, Rodas-Ramirez Javier María¹, Gonzalez-Segnana Luis Roberto¹ y Vera de Ortiz Mirtha¹

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, Campus de San Lorenzo, Paraguay

* Autor para correspondencia: maura.diaz@agr.una.py

Fecha de recepción del manuscrito: 03/02/2021

Fecha de aceptación del manuscrito: 30/06/2021

Fecha de publicación: 15/07/2021

Resumen—El cultivo *in vitro* podría constituirse en una opción viable en la producción masiva de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (lapacho de flores blancas), especie forestal nativa en Paraguay, de la familia de las *Bignoniaceae*, poseedora de una característica singular atribuible a sus inflorescencias blancas, las cuales se observan en pocos ejemplares del género. El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo para el control de la oxidación fenólica *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus*, mediante el uso de carbón activado en distintas concentraciones (1, 2, 3 y 4 g.L⁻¹) en medio de cultivo de *Murashige* y *Skoog*. Fueron utilizados 40 segmentos nodales provenientes de plantas madres mantenidas en vivero. Se realizó el tratamiento de las plantas madres con la aplicación de mancozeb 3 g.L⁻¹. Las variables medidas fueron oxidación y sobrevivencia hasta los 35 días de incubación. Se efectuó análisis de varianza y test de Tukey con un nivel de confianza del 5%. Los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas en el control de la oxidación, siendo la concentración de 3 g.L⁻¹ de carbón activado el tratamiento más efectivo.

Palabras clave—Explantos, Lapacho de flores blancas, Micropropagación, Plantas madres, Oxidación fenólica.

Abstract—*In vitro* culture could become a viable option in the mass production of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (white-flowered lapacho), an indigenous species from Paraguay, from the family *Bignoniaceae*. This species possesses a unique characteristic due to its white inflorescences, which are observed in a few specimens of the genus. The objective of the present work was to establish a protocol for the control of *in vitro* oxidation of *Handroanthus heptaphyllus* nodal segments by using activated charcoal in different concentrations (1, 2, 3 and 4 g.L⁻¹) in *Murashige* and *Skoog* culture medium. A total of 40 nodal segments were used from parent plants that were kept in the nursery. These parent plants were treated with the application of mancozeb at 3 g.L⁻¹. The variables measured were oxidation and survival up to 35 days of incubation. Analysis of variance and Tukey test were performed with a confidence level of 5%. Statistical analyses showed significant differences in oxidation control. The 3 g.L⁻¹ concentration of activated charcoal has been the most effective.

Keywords—Explants, White-flowered lapacho, Micropropagation, Parent plants, Phenolic oxidation.

INTRODUCCIÓN

Handroanthus heptaphyllus (Mart.) Mattos es una especie arbórea de la familia *Bignoniaceae*, de alto valor económico. Debido a su intensa floración es bastante común su utilización en proyectos de paisajismo y arborización urbana (Carvalho 2003). Es uno de los árboles más altos del Paraguay, posee copa semi-globosa y poco densa, con el follaje concentrado en un solo estrato hacia los extremos. La inflorescencia es una panícula terminal con numerosas flores vistosas de 5-8 cm de largo, tiene una corola tubular de color rosado o rosado-morado, en forma de una campana con cinco lóbulos redondeados desiguales, aunque algunos

individuos tienen flores blancas, y florece de mayo a julio (López et al., 2002).

Si bien esta especie se propaga comúnmente por semilla, tiene el inconveniente de que durante su almacenamiento presenta variaciones en términos de calidad, teniendo un poder germinativo que rápidamente se ve reducido (Carvalho, 1994; Duarte et al., 2014). En este sentido, las semillas de las especies del género *Handroanthus* tienen un período relativamente corto de viabilidad natural, lo que representa dificultades para establecer técnicas de cultivo orientadas a la producción de plántulas (Cabral et al., 2003; Martins et al., 2012). Ante estas limitaciones para la propagación de

Handroanthus, los métodos de cultivo *in vitro* constituyen una vía alternativa con resultados satisfactorios en los coeficientes de multiplicación y por las posibilidades de éxito de las plantaciones forestales en campo. Los principales avances del cultivo *in vitro* de tejidos han permitido la multiplicación de especies de interés forestal mediante organogénesis y embriogénesis somática (Daquinta et al., 2000; Barbón, 2011; Jiménez Terry Agramonte, 2013).

La micropropagación contribuye a mantener el equilibrio del ecosistema forestal y del medio ambiente, ya que como herramienta de rescate permite la producción de plantas y la conservación de la biodiversidad genética, así como la innovación de procedimientos tecnológicos en los bosques tropicales (Farjon, 2003). En el cultivo de tejidos *in vitro*, la oxidación constituye uno de los principales inconvenientes en el proceso, y es causada principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo y el volumen y la calidad del frasco de cultivo (Abdelwahd et al., 2008).

El resultado de este trabajo podría constituir un aporte para el establecimiento de un protocolo para la micropropagación del *Handroanthus heptaphyllus*, para su utilización con fines ornamentales, de restauración forestal y/o para reforestación.

El objetivo de la presente investigación fue establecer un protocolo para el control de la oxidación *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* mediante el uso de carbón activado en diferentes concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicada en el Campus de ciudad de San Lorenzo, Paraguay.

Se utilizaron 40 segmentos nodales provenientes de 50 plantas madres sanas de *Handroanthus heptaphyllus* las cuales fueron obtenidas por injerto, las mismas poseían una altura promedio de 35 cm. El medio de cultivo utilizado como base para el experimento fue la solución inorgánica desarrollada por Murashige Skoog (MS) suplementado con 1, 2, 3 y 4 g.L⁻¹ de Carbón Activado (CA). Para la inoculación *in vitro* se procedió a la extracción de segmentos con dos yemas. Para cada tratamiento se realizaron 10 réplicas.

Tratamiento de las plantas madres

Se realizó un ensayo preliminar de tratamientos de plantas madres, con la comparación de 50 plantas tomadas como testigos y 50 con la aplicación de un fungicida. Las 50 plantas madres fueron tratadas con el fungicida Dithane M-80 de composición mancozeb etileno bis de manganeso (ditiocarbamato) con una concentración de 3 g.L⁻¹ aplicadas por medio de un pulverizador manual. Las mismas estuvieron instaladas en el vivero forestal de la Facultad de Ciencias Agrarias, en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay con coordenadas geográficas: 25°20'14,37" S y 57°30'53,37".

Método de inoculación *in vitro* de segmentos nodales

Se utilizaron 40 segmentos nodales, los cuales fueron sumergidos en frascos esterilizados que contenían alcohol etílico al 70% durante un periodo de 3 minutos. Luego, fueron sometidos a un tratamiento de desinfección, constituido por una solución de hipoclorito de sodio al 10%, durante un tiempo de 5 minutos, según protocolo de desinfección de Díaz Lezcano et al. (2020). Posteriormente, fueron realizados tres enjuagues con agua destilada estéril.

Una vez desinfectados los segmentos nodales fueron sembrados en el medio de cultivo de Murashige Skoog, suplementado con CA en concentraciones de 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) y 4 g.L⁻¹ (T4), respectivamente.

Una vez realizada la siembra en la cámara de flujo laminar, los explantes fueron llevados a la cámara de incubación a una temperatura aproximada de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz, proporcionada por tres fluorescentes de 20W, y 8 horas oscuridad, para finalmente evaluar la oxidación fenólica de los explantes por un tiempo de 35 días.

Análisis estadístico

Se analizaron la oxidación fenólica y la sobrevivencia de los explantes en función de la concentración de CA (cuatro tratamientos). Los resultados obtenidos del experimento fueron analizados mediante una ANOVA paramétrica con distribución normal de los datos y homogeneidad de varianzas de tipo unifactorial y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey al nivel de 5% de probabilidad con la ayuda del programa estadístico XLSTAT.

RESULTADOS

El tratamiento de las plantas madres con fungicida "Dithane M-80" a una concentración de 3 g.L⁻¹ se mostró efectivo, resultando en el 45% de plantas libres de signos de hongos fitopatógenos (Figura 1).

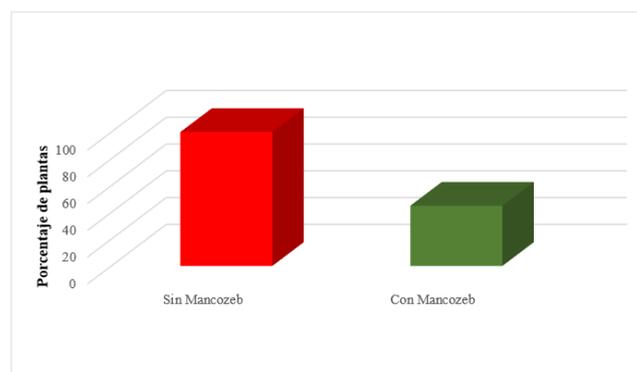


Fig. 1: Porcentaje de plantas madres de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos con signos de presencia de hongos con y sin aplicación del fungicida.

Para el control de la oxidación fenólica, los segmentos nodales sembrados en el medio de cultivo del T3 (concentración de 3 g.L⁻¹ de CA) dieron el mejor resultado con 0% de oxidación en los explantes al cabo de los 35 días de experimentación (Figura 2).

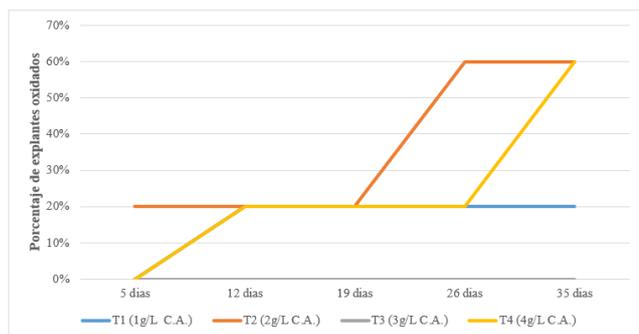


Fig. 2: Porcentaje de oxidación de explantes *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, sometidos a los diferentes tratamientos (T1-T4) con Carbón Activado (C.A.).

El análisis de varianza reportó diferencias significativas ($F = 9,00$ $p < 0,05$) en la proporción de explantes oxidados a los 35 días para los tratamientos empleados. Como puede apreciarse en la Tabla 1, el Test de Tukey revela que el tratamiento T3 fue significativamente más efectivo para controlar la oxidación que los tratamientos T2 y T4 (60 % de oxidación en ambos casos).

Tabla 1: Resultado del test de Tukey para la comparación de las proporciones de explantes oxidados en función de los tratamientos empleados en el control de la oxidación de *Handroanthus heptaphyllus*. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Diferencia Mínima Significativa (Test de Tukey al 5 %) = 0,8167	
Tratamiento	Media
2	1,000 A
4	1,000 A
1	0,333 AB
3	0,000 B

Sobrevivencia

La sobrevivencia de explantes fue disminuyendo con el tiempo, representando un máximo de 20% a los 35 días con la aplicación de T3, siendo la contaminación la principal causa de necrosis de los explantes representando 80% (Figura 3).

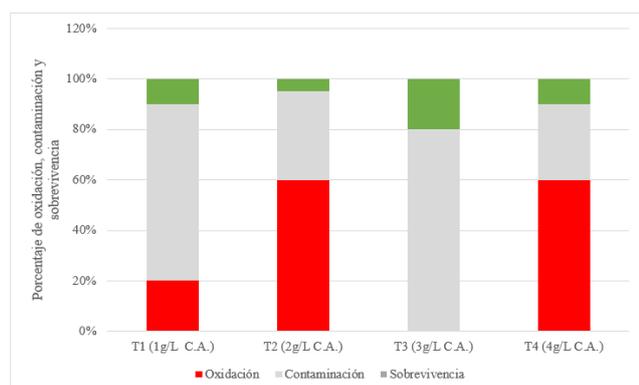


Fig. 3: Porcentaje de oxidación, contaminación y sobrevivencia de explantes *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos a los 35 días del cultivo.

La sobrevivencia fue evaluada mediante el análisis de varianza, el cual no reportó diferencias significativas en los tratamientos empleados.

DISCUSIÓN

El tratamiento de desinfección puede comenzar con pre-tratamientos aplicados a la planta madre principalmente para combatir microorganismos (Chagas et al., 2006), lo cual significó un aporte importante en los ensayos previos al control de oxidación de los explantes. Como pre-tratamiento, Díaz Lezcano et al (2021) trataron plantas madre de *Handroanthus heptaphyllus* con Oxidocloruro de cobre (OxiCob®) y Ditiocarbamato (Mancozeb®) en proporción de 3 y 2 $g.L^{-1}$, respectivamente, obteniendo el control de la ocurrencia de hongos, coincidiendo con la presente investigación en donde el tratamiento consistió en la aplicación de Mancozeb a una concentración de 3 $g.L^{-1}$.

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente angiospermas leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo (Azofeifa, 2009), causadas por la liberación de pigmentos por parte de las plantas, principalmente polifenoles y taninos (Hernández y González, 2010). Teixeira (2006) menciona que cuando se extrae un explante de la planta madre, la primera respuesta del tejido es la oxidación de compuestos fenólicos en el sitio de corte, que es lo que ocurrió en el presente estudio. Los explantes con alto contenido de polifenoles complican el cultivo *in vitro*, ya que la oxidación fenólica de esta sustancia produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes (Roca y Mroginski, 1991).

Esta oxidación pudo ser controlada en los ensayos con el uso de carbón activado, de manera similar a lo obtenido por Fiori Fernández et al. (2016) utilizando Medio Murashige Skooge suplementado con 2 $g.L^{-1}$ de C.A., quienes afirman que el uso de este antioxidante suprimió la oxidación en explantes de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. También Zichner et al. (2012) obtuvieron buenos resultados en la propagación clonal *in vitro* de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, donde de manera similar a este estudio, una concentración de 3 $g.L^{-1}$ de carbón activado obtuvo los mejores resultados.

En cuanto a la sobrevivencia, la misma está referida a la cantidad de segmentos nodales que presentaron callos, brotes y a la vez segmentos indiferentes estos están relacionados directamente con la cantidad de explantes oxidados y contaminados. Puede decirse que cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables regenera nuevos individuos (Villalobos y Thorpe 1993).

En cualquier caso, en el presente experimento encontramos una elevada proporción de contaminación. Investigaciones de Larraburu (2014) reportaron que la desinfección de explantes de *Handroanthus impetiginosus* mediante lavado bajo corriente de agua, tratamiento con NaClO y enjuagues con agua estéril permitió la obtención de un bajo porcenta-

je de contaminación (5-10%). Por su parte Díaz Lezcano *et al.* (2020) sostienen que el tratamiento con NaOCl comercial al 10% en la desinfección de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* mostró los mayores porcentajes de pérdidas por necrosis. Teniendo todo esto en cuenta, y con base en el alto porcentaje de contaminación microbiana observada en el presente estudio, se concluye que los tratamientos de desinfección deben ser mejorados en futuras investigaciones.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización, MD, JR y LG; metodología, MD, LG y JR; análisis formal, MD, JR, LG y MV; investigación, MD, JR y LG; recursos, MD, JR y LG; curación de datos, MD, JR y MV; redacción y preparación del borrador original, MD y JR; redacción, revisión y edición, MD.

REFERENCIAS

- Abdelwahd, R; Hakam, N; Labhilili, M; UduPA, S. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*. Consultado 26 jun 2013. Disponible en <http://www.mag.go.cr/revmeso/v20n01153.pdf>
- Barbón, R (2011) Embriogénesis somática de *Swietenia mahoganii* (L. Jacq.) en medios de cultivo semisólidos. *Revista Forestal Baracoa* 30: 124
- Cabral, E. L.; Barbosa, D. C. A.; Simabukuro, E. A. (2003). Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. Hook. f. ex. S. Moore. *Acta Botânica Brasílica*, v.17, p.609-617.
- Carvalho P (1994) *Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Colombo: Embrapa. 640 p.
- Carvalho, P.E.R. (2003). *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília, BR Embrapa Informação Tecnológica. p. 567-572.
- Chagas, CJ; Medeiros, AM; Lacerda, M. (2006). Factores Inerentes À Micropropagación. Campina Grande. PB. BR. EMBRAPA. Consultado 15 mayo 2013.
- Daquinta, M, Ramos L, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2000) Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotecnología vegetal* 1(1): 39-44
- Díaz Lezcano, M., Rodas Ramirez, J., González Segnana, L., Vera de Ortiz, M. (2020). Establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. *Biotecnología Vegetal*, 20 (3), 203-210. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/672>
- Díaz Lezcano MI, Vera Arza DM, González Espínola DD, López Talavera CA. (2021). Micropropagación de *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.) Mattos a partir de segmentos nodales. *Rev. Soc. cient. Parag.*; 26(1):49-63
- Duarte E., Avico E., Sansberro P., Luna C. (2014). Efecto de la testa sobre la germinación de la ssemillas de *Handroanthus heptaphyllus* tras distintos tiempo de almacenamiento. *Ciencias Agronómicas - Revista XXIV* -29: 029 - 035
- Farjon, A (2003) The remaining diversity of conifers. *Acta Horticulturae (ISHS)* 615: 75-89
- Fiori Fernández, C, Díaz Lezcano, MI, González Segnana, LR (2016). Enraizamiento in vitro de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. Colombia Forestal. Bogotá-Colombia. Vol. 19 (1) 67-78 pp.
- Jiménez-Terry, F., Agramonte, D. (2013). Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Biotecnología Vegetal*, 13(1). Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456>
- Hernández, Yuniel, González, María E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutas perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sciarttextpid=S0258-59362010000400015&lng=est&lng=es>.
- Larraburu, EE (2014) Morfogénesis in vitro de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Luján. Luján. Argentina.
- López, JA; Little Junior, EL; Ritz, JGF; Rombold, JS, Hahn, W. (2002). *Árboles comunes del Paraguay: ñandeyvyra mata kuéra*. 2 ed. Asunción, PY, Cuerpo de Paz. 458 p.
- Martins, Leila, Lago, Antonio A. do, Cícero, Silvio M.. (2012). Conservação de sementes de ipê-roxo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(1), 108-112. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662012000100014>
- Roca, M, Mroginski, A (1991) Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales (en línea). CO. CIAT. Consultado 06 jul. 2013. Disponible en <http://ciat-library.ciat.cgiar.org/documentoselectronicosciat/isbn958-9183-15-8/capitulo1.pdf>
- Teixeira, JB. 2006. Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 8 p. Consultado 20 abr. 2012. Disponible en: es.scribd.com/doc/60042247/limitacoes-na-cultura-in-vitro-de-lenhosas

Villalobos, V, Thorpe, T (1993) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados (en línea). In Roca, WM; Mroginski, LA. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO, CIAT. Consultado el: 11 set 2013.

Zichner, A, Díaz Lezcano, MI, González Segnana, LR, Vera de Ortiz, M (2012) Efecto del carbón activado en el control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maidenida en el listado? cultivados in vitro. Revista de Investigación Agrarias. 12(2):107-111. San Lorenzo, Paraguay