

Efecto del carbón activado en el control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivados *in vitro*

Effect of activated carbon on the control of oxidation in nodal segments of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden grown *in vitro*

Alex Zichner Zorz¹, Maura Isabel Díaz Lezcano^{1*}, Luis Roberto González Segnana² y Mirtha Vera de Ortiz¹

¹ Carrera de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción (FCA, UNA). San Lorenzo, Paraguay.

² Carrera de Ingeniería Agronómica, FCA, UNA. San Lorenzo, Paraguay.

*Autor para correspondencia (maura.diaz@agr.una.py).

Recibido: 23/08/2012; Aceptado: 28/11/2012.

RESUMEN

La propagación clonal mediante cultivo de tejidos de especies leñosas de interés comercial, como los eucaliptos, representa una técnica de reproducción masiva para individuos genéticamente mejorados y de alta demanda. Con el objetivo de establecer un protocolo que posibilite el control de la oxidación en la propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden se realizó un estudio experimental en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, con la hipótesis de que el uso del carbón activado controla la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* propagados *in vitro*. El diseño experimental fue completamente aleatorio con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos consistieron en cuatro concentraciones (0, 1, 2 y 3 g/L) de carbón activado (CA) adicionados a la composición de sales de Murashige y Skoog. Se utilizaron 100 segmentos nodales distribuidos equitativamente entre los tratamientos. Las variables medidas cada 5 días por un periodo de 30 días fueron porcentaje de contaminación, oxidación, sobrevivencia, brotación, enraizamiento y longitud de brotes. Se efectuó el análisis de varianza, las medias fueron comparadas mediante el test de Tukey al 5%. Los resultados mostraron 61% de cultivos establecidos *in vitro*, resaltando el efecto de la Tetraciclina sobre las plantas madres, controlando la contaminación en 75% de los cultivos. El CA 3 g/L controló al 100% la oxidación de los tejidos. Este protocolo permitió la regeneración de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*.

Palabras clave: *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, carbón activado, micropropagación, oxidación.

ABSTRACT

Clonal propagation by tissue culture of commercial interest woody species, such as eucalyptus, represents a massive reproduction technique for genetically improved individuals with high demand. An experimental research was conducted at the Laboratorio de Biología of the Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción with the objective to establish a protocol for *in vitro* clonal propagation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. The hypothesis was that the use of activated carbon controls phenolic oxidation of the nodal segments of *in vitro* propagated *Eucalyptus grandis*. The experimental design was completely randomized with 4 treatments and 5 replications. Treatments consisted of four concentrations (0, 1, 2 and 3 g/L) of activated carbon (AC) added to the composition of Murashige and Skoog salts. Hundred nodal segments were used evenly distributed between treatments. The variables measured every five days up to 30 days of incubation were percentage of contamination, oxidation, survival, sprouting, rooting and shoot length. Variables were analyzed for variance, means were compared using test of Tukey at 5%. The results showed 61% of cultures grown *in vitro*, highlighting the effect of the antibiotic Tetracycline on the mother plants, controlling contamination at 75% of the cultures. Activated carbon at the 3 g/L concentration, controlled 100% oxidation of the tissues. In conclusion, this protocol effectively enabled plant regeneration from nodal segments of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivated *in vitro*.

Keywords: *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, activated carbon, micropropagation, oxidation.

INTRODUCCIÓN

La propagación de plantas a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, o micropropagación, constituye una de las estrategias más importantes de la biotecnología moderna dada la magnitud de su aplicación práctica, que se fundamenta en la clonación de individuos élite. Sin embargo, existen dificultades que impiden el éxito de los objetivos de esta técnica y éstas están relacionadas con el material vegetativo utilizado y con el medio en que se cultivan.

La oxidación representa uno de los más frecuentes problemas, especialmente durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* con explantes de especies leñosas, debido a una reacción metabólica desencadenada por diversos factores, los cuales pueden ser evitados o prevenidos mediante el uso de antioxidantes o adsorbentes de estas sustancias liberadas, las cuales pueden llegar a inhibir el progreso del cultivo e incluso la muerte del tejido (Azofeifa 2009).

Considerando la importancia de la micropropagación de eucalipto, basada en la multiplicación masiva de árboles superiores seleccionados mediante el mejoramiento genético y debido a los escasos estudios locales en el área forestal involucrados en este tema, es necesario el desarrollo de esta técnica, en específico en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, dado que es una especie exótica adaptada a las condiciones del Paraguay y de alta demanda.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del carbón activado en la propagación clonal *in vitro* de segmentos nodales *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, la hipótesis fue que el uso del carbón activado es efectivo para el control de la oxidación de los explantes.

METODOLOGÍA

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

El genotipo seleccionado de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden constituye el primer clon comercial en el Paraguay de dicha especie, seleccionado y capturado de entre diversos ensayos de progenie desarrollados por la empresa privada Desarrollos Madereros S.A., sito sobre la Supercarretera Itaipú km 32, ciudad de Hernandarias, Departamento de Alto Paraná, Paraguay, el cual posee bajo porcentaje de rajado de la madera (alrededor del 18%) y densidad considerada media, de entre 500 a 560 kg/m³ que le confieren excelentes aptitudes para su plantación y aprovechamiento como madera sólida.

Las plantas madres fueron primeramente desinfectadas, mediante una solución antibiótica de Tetraciclina (250 g) y Bencilamina (50 g) a una concentración de 1,2 g/L, con un aspersor manual día de por medio durante 20 días. Posteriormente los explantes fueron sometidos al procedimiento de asepsia mediante su inmersión en una solución de alcohol etílico de 96° al 70% durante 1 minuto y en hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos seguido de un triple enjuague con agua destilada esterilizada.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos fueron cuatro concentraciones de carbón activado. Fueron sembrados 100 segmentos de tallo constituidos por una yema axilar, en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementados mediante las cuatro concentraciones 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2) y 3 (T3) g/L de carbón activado (CA), instaladas en una sala de incubación bajo condiciones de 16 h de luz y a una temperatura de 27°C.

Las variables evaluadas fueron porcentaje de contaminación, oxidación, sobrevivencia, brotación, enraizamiento y longitud de brotes hasta los 30 días de incubación.

Se efectuó el análisis de varianza (ANAVA), la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5% y el análisis de independencia al 5% de error sobre las variables en la última evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de contaminación

Los ensayos preliminares mostraron que el 100% de los segmentos nodales de las plantas madres presentaron contaminación por bacterias, las cuales no fueron controladas mediante el procedimiento básico de asepsia, consistente en la desinfección con alcohol etílico al 70%.

Mediante la combinación de Tetraciclina (250 mg) y Bencilamina (50 mg) a una concentración de 1,2 g/L, adicionado al procedimiento de asepsia, logrando controlar la contaminación en 75% de los explantes.

Este procedimiento concuerda con Malysz et al. (2011), quienes también evaluaron el porcentaje de desinfección de los explantes de *Eucalyptus dunnii* con y sin tratamiento previo de las plantas madres mediante fungicida (Dicarboximida 2,0 g/L) y como bactericida la combinación de Oxitetraciclina más Sulfato de

Estreptomina a una concentración de 2,0 g/L suplementados a los tratamientos de asepsia, donde resalta también la importancia de este tratamiento, logrando hasta 80,2% de cultivos libres de contaminantes.

Porcentaje de oxidación

Según Pedroza et al. (2010) la oxidación fenólica ha sido un problema en la micropropagación de especies leñosas, siendo relatada por diversos trabajos, como lo describen Sharma y Ramamurthy (2000) en el cultivo de *Eucalyptus tereticornis*; Rocha (2005) trabajando con *Cabralea canjerana*; Cysne (2006) con *Moringa oleifera*; Almeida et al. (2008) en el establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* y Brondani (2008) en el desarrollo *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Esto ocurre por el corte que sufre el explante, como explican Andrade et al. (2000), dañando las células de los tejidos y promoviendo la liberación de los compuestos fenólicos, precursores de la síntesis de lignina, los cuales modifican la composición del medio de cultivo y la absorción de metabolitos pudiendo llevar a la muerte de los tejidos.

Signos de oxidación de los explantes se observaron en 14% del total del experimento, destacando que en el T3 que poseía la concentración más elevada de CA en el experimento (3 g/L), no se registró oxidación en las evaluaciones posteriores al establecimiento del cultivo (Figura 1).

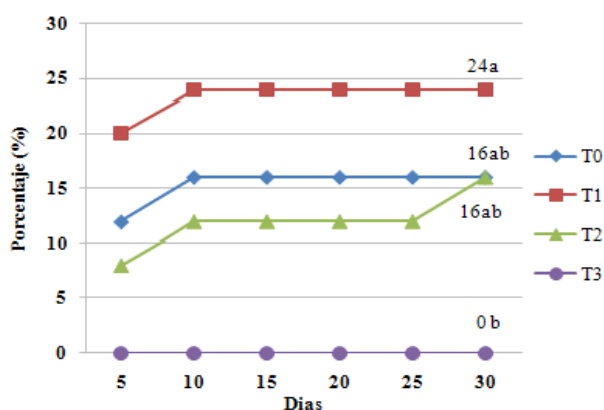


Figura 1. Porcentaje de oxidación *in vitro* de explantes de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) sometidos a tratamientos con carbón activado. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey al de 5% de probabilidad de error.

El porcentaje más alto de oxidación se registró en el T1 con 24% de los explantes, seguido de los tratamientos T0 y T2 con 16% respectivamente en el final de las

evaluaciones, manteniendo una tendencia constante en todos los tratamientos a partir de los 10 días de incubación (Figura 1).

Porcentaje de sobrevivencia

Al analizar los cuatro tratamientos se aprecia que el T3 presentó el porcentaje más alto, 72% de explantes vivos y el porcentaje más bajo se observó en T0 y T1 con 52%, sin diferir estadísticamente entre estos, registrando en total 61% de explantes establecidos a los 30 días de incubación. La Tabla 1 muestra el porcentaje de sobrevivencia para cada tratamiento, registrándose los mejores resultados con el tratamiento constituido por sales de Murashige y Skoog suplementado con 3 g/L de Carbón Activado.

Tabla 1. Medias del porcentaje de sobrevivencia *in vitro*, porcentaje de brotación y longitud de brotes de explantes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden según los tratamientos con CA, a los 30 días de incubación.

Tratamientos	Sobreviven- cia ^{ns} %	Brotación ^{ns} %	Longitud de brotes ^{ns} cm
T0 (CA 0 g/L)	52 a*	40 a*	1,02 a*
T1 (CA 1 g/L)	52 a	28 a	0,36 a
T2 (CA 2 g/L)	68 a	60 a	1,34 a
T3 (CA 3 g/L)	72 a	44 a	0,98 a
Diferencia Mínima Significativa	43,2	47,45	1,16
C. V (%)	39,14	52	69,12

^{ns}: no significativo, * medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

Porcentaje de brotación

El número de explantes con brotación se incrementó a medida que transcurrieron las evaluaciones, destacando al T2 que presentó mayor cantidad de explantes brotados con 60%, y en menor cantidad se observó en el T1 con 28%, aunque el análisis de varianza mediante el test de F ($p < 0,05$) indica que la presencia de brotaciones no presentó diferencias significativas entre las concentraciones de CA a las cuales fueron expuestas (Tabla 1).

Longitud de brotes

La tendencia de los promedios se asemeja a la presentada por la variable anterior, siendo los valores de las longitudes de los brotes proporcionales a la cantidad de explantes con presencia de brotes.

Las longitudes de mayor expresión se registraron en los tratamientos T0 y T2, con 1,02 y 1,34 cm

respectivamente. La adición de las distintas concentraciones de CA en el medio de cultivo MS no tuvo efecto significativo mediante el análisis de varianza por el test F ($p < 0,05$), en las elongaciones de los explantes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Tabla 1).

Para Ahuja citado por Herrera (1989), la adición del CA en el medio de cultivo relacionado a la multiplicación de *Eucalyptus citriodora* (*Corymbia citriodora*), demuestra que este componente favoreció a la elongación de los brotes y al tamaño de las hojas. La altura de los brotes fue entre 5 y 8 cm y entre 0,2 y 1,0 cm con y sin el uso de CA, respectivamente.

Porcentaje de enraizamiento

El enraizamiento de los explantes establecidos *in vitro* se observó al final de las evaluaciones, donde se registró el 11,45% de los explantes enraizados en el experimento. La mayor cantidad de cultivos con raíces adventicias se observó en el tratamiento exento de CA (T0) con 38,46%, además de los tratamientos T2 y T3 que presentaron explantes con 5,88 y 5,56% de raíces, respectivamente.

En algunas ocasiones, el carbón activado puede no ser benéfico cuando se utiliza en cultivo *in vitro* de plantas, así como lo mencionan Grattapaglia y Machado (1998) y Pasqual mencionado por Souza y Pereira (2007), este adsorbe componentes del medio de cultivo necesarios para el desarrollo del explante, y podría además perjudicar la emisión de raíces de los mismos.

Los porcentajes de enraizamiento de los segmentos nodales fueron evaluados mediante el análisis de independencia indicando significancia de la variable con respecto a los tratamientos, donde Xc representa el grado de dependencia calculada entre la variable y los tratamientos y Xt el valor tabular admisible, es decir, la aparición de raíces estuvo influenciada por las concentraciones de CA, favorecido por el tratamiento testigo (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de independencia sobre los porcentajes de enraizamiento a los 30 días de incubación.

Variable	Tratamientos				Sub-total
	T0	T1	T2	T3	
Enraizados	5	0	1	1	7
No enraizados	8	13	16	17	54
Total	13	13	17	18	61
Xc	12,1*				
Xt	7,81				

Xc: Chi calculada, Xt: Chi tabulada, * significativo por chi-cuadrada al 0,05 nivel de probabilidad.

Erig et al. (2004) concluyeron que, utilizando la hormona ANA (ácido naftalacético) en ausencia de carbón activado

en el medio de cultivo, fue posible el enraizamiento de *Pyrus sp.*

CONCLUSIONES

Este protocolo de establecimiento posibilitó el cultivo *in vitro* exitoso del 61% de los segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* procedentes de clones de progenie conocida.

La aplicación de Tetraciclina como tratamiento antibiótico sobre las plantas madres, aliado al procedimiento de asepsia, fue favorable en el control de la contaminación en 75% de los explantes.

En el experimento se observó signos de oxidación en el 14% de los explantes, donde las concentraciones superiores de CA (1 y 2 g/L) utilizadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento testigo (CA 0 g/L) en el control de la oxidación de los cultivos.

Se acepta la hipótesis planteada al inicio del experimento, destacando que el tratamiento T3 (CA 3 g/L) controló al 100% la oxidación de los explantes.

El porcentaje de sobrevivencia, brotación de los explantes y la longitud de brotes de los mismos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con carbón activado en los que estos fueron incubados.

El porcentaje de enraizamiento del experimento fue de 11,45%, presentándose la mayor proporción de rizogénesis en el tratamiento testigo (CA 0 g/L) con 38,46% de los explantes con raíces adventicias.

LITERATURA CITADA

- Almeida, JR; Martins, CR; Dutra, LF. 2008. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. Revista da FZVA, Uruguaina, v. 15, n. 1, p. 54–60. Consultado 04 jul. 2012. Disponible en: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewFile/3701/2845>
- Andrade, MW.; Luz, JMQ.; Lacerda, AS; De Melo, PR. 2000. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (en línea). Ciência agrotécnica, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180. Consultado 11 jun. 2012. Disponible en: <http://ciencialivre.pro.br/media/eae5c31f0bce1fefff82c7fffd523.pdf>
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro* (en

- línea). Agronomía Mesoamericana. Universidad de Costa Rica, CR. v. 20, n. 1, p. 153-175. Consultado 03 jun. 2012. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/437/43711514016.pdf>
- Brondani, EG. 2008. Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* (Maiden & Cambage) x *Eucalyptus dunnii* (Maiden). (en línea) Tesis Mag. Sc. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. PR. BR. 118. Consultado 15 jul. 2012. Disponible en: <http://www.ipef.br/servicos/teses/arquivos/-brondani,ge.pdf>
- Cysne, JRB. 2006. Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L. (en línea). Tesis Mag. SC. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. CE. BR. 81 p. Disponible en: http://www.fitotecnia.ufc.br/Disserta%E7%F5es/2006_Junior_Regis.pdf
- Erig, AC; Schuch, MW; Braga, EJ. 2004. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) (en línea). Ciência Rural, Santa Maria, RS, BR. v.34, n.1, p. 275-277 Consultado 10 jun. 2012. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a43v34n1.pdf>
- Grattapaglia, D y Machado, MA. 1998. Micropropagação. In: Torres, AC; Caldas, LS; Buso, JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v. 1, p. 183-260.
- Herrera, PD. 1989. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. Tesis Mag. Sc. Curitiba. PR. BR. Universidade Federal do Paraná. 63 p. Consultado 05 jul. 2012. Disponible en: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/25224/D%20%20PINEDO,%20DAVID%20NICOLAS%20HERRERA.pdf;jsessionid=BDB6CD54C957F892373488A24A71EA40?sequence=1>
- Malysz, M; Cadore, D; Tibola, E; Leontiev-Orlov, O; Cansian, R L; Mossi, AJM. 2011. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* (Maiden). (en línea). Perspectiva, Erechim. v. 35, n. 131, p. 69-78. Consultado 20 jul. 2012. Disponible en: http://www.uricer.edu.br/new/site/pdfs/perspectiva/-131_221.pdf
- Pedroza, MJ; Serrato, ML; Castaño, M. 2010. Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* (Linden ex Lindl) y *Maxillaria nutans* (Lindl) *in vitro*. (en línea). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, CO. Revista Colombiana de Biotecnología. v. 7, n. 2, p. 86-102 Consultado el 02 de agosto del 2012. Consultado 03 oct. 2012. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=77617808007>
- Rocha, SC. 2005. Establecimiento *in vitro* e micropropagação de canjarana (*Cabralea canjerana*). (en línea). Tesis Mag. Sc. Curitiba. PR. BR. Universidade Federal do Paraná. 80 p. Consultado 23 jun. 2012. Disponible en: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/5763/dissertation.pdf?sequence=1>
- Sharma, SK y Ramamurthy, V. 2000. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. (en línea). Plant Cell Reports, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511-518. Consultado 03 jul. 2012. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/aqf6kxvt7hmee9q/fulltext.pdf>
- Souza, AV y Pereira, AMS. 2007. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu. SP. BR. v. 9, n. 4, p. 103-117 Consultado 17 mayo 2012. Disponible en: http://www.sbpmed.org.br/download/issn_07_4/artigo17_v9_n4.pdf