

<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v72i1.54500>

Influencia de la edad en el contenido de fenoles y ligninas en *Gmelina arborea* (Lamiaceae)

Bernal Azofeifa Bolaños^{1*};  <https://orcid.org/0000-0002-8902-0352>

Víctor Álvarez Valverde²;  <https://orcid.org/0000-0001-6007-9150>

Ashly Olivares Madriz²;  <https://orcid.org/0009-0006-3604-2810>

Mariana Pineda Cascante²;  <https://orcid.org/0009-0009-1794-4386>

Daniela Campos Salas²;  <https://orcid.org/0009-0001-8465-5762>

Ana Hine Gómez¹;  <https://orcid.org/0000-0002-7226-2275>

1. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional, 86-3000, Heredia, Costa Rica; bernal.azofeifa.bolanos@una.cr (*Correspondencia), ana.hine.gomez@una.cr
2. Laboratorio de Fitoquímica, Universidad Nacional, 86-3000, Heredia, Costa Rica; victor.alvarez.valverde@una.cr, ashly.olivares.madriz@est.una.ac.cr, mariana.pineda.cascante@est.una.ac.cr, daniela.campos.salas@est.una.ac.cr

Recibido 15-V-2023. Corregido 06-XI-2023. Aceptado 08-I-2024.

ABSTRACT

The influence of age on the phenolic contents and lignins of *Gmelina arborea* (Lamiaceae)

Introduction: Melina (*Gmelina arborea*) is a tree species of great interest for its wood and medicinal properties. In Costa Rica, there are genetically superior clones that are propagated without knowledge of the ontogenic and physiological age of the materials.

Objective: To evaluate how age influences the content of phenols and lignins in leaves, petioles, stems, and roots of melina plants.

Methods: The total phenolic and lignins contents were determined using Folin-Ciocalteu colorimetric method and alkaline extraction method, respectively. Plants of five different ages were chosen for the investigation (*in vitro* plants “year 0” and trees of a year and a half, four, seven and 20 years). Sampling was done in March and April 2021.

Results: All parts of the plant analyzed contain phenolic compounds and lignins, regardless of their age. There was no positive correlation between age and phenol and lignin content for any development condition, since the highest values were not obtained in the oldest trees. Leaf extracts from *in vitro* plants and seven-year-old trees showed, respectively, the highest phenol and lignin contents for all conditions ($P < 0.05$). The lowest average values of phenolic compounds for all conditions were obtained in four-year-old trees. Regarding lignins, the lowest content occurred in the oldest roots, although the trend was not maintained for the rest of the plant parts.

Conclusions: This study provides the first results of the content of phenolic compounds and lignins present in different tissues of a forest species of different ages. Therefore, they are the first reference values about the biochemical commitment for phenolic synthesis according to the age and the specific developmental stage of a woody plant.

Key words: reinvigoration; secondary metabolites; ontogeny; photomorphogenesis; heterotrophy.



RESUMEN

Introducción: La melina (*Gmelina arborea*), es una especie de gran interés por su madera y propiedades medicinales. En Costa Rica, existen clones genéticamente superiores que se propagan sin el conocimiento de la edad ontogénica y fisiológica de los materiales.

Objetivo: Evaluar la relación del contenido de fenoles y ligninas en hojas, peciolos, tallos y raíces de plantas con diferentes edades.

Métodos: Los contenidos de fenoles y ligninas totales se determinaron mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y el método de extracción alcalina, respectivamente. Para la investigación se eligieron plantas *in vitro* “año cero” y árboles de año y medio, cuatro, siete y 20 años. El muestreo se realizó en marzo y abril de 2021.

Resultados: Se demostró que todas las partes de la planta analizadas contienen compuestos fenólicos y ligninas, independientemente de su edad. No hubo una correlación positiva entre la edad con el contenido de fenoles y ligninas para ninguna condición de desarrollo, pues los valores más altos no se obtuvieron en los árboles más longevos. Los extractos de hojas de las plantas *in vitro* y los árboles de siete años mostraron, respectivamente, los contenidos más altos de fenoles y ligninas para todas las condiciones ($P < 0.05$). Los valores promedio más bajos de compuestos fenólicos para todas las condiciones se obtuvieron en los árboles de cuatro años. Respecto a las ligninas, el contenido más bajo se presentó en las raíces más longevas, aunque la tendencia no se mantuvo para el resto de las partes de la planta.

Conclusiones: La investigación muestra los primeros resultados del contenido de compuestos fenólicos y ligninas presentes en diferentes tejidos de una especie forestal de edades diferentes. Por lo tanto, son los primeros valores de referencia acerca del compromiso bioquímico para la síntesis fenólica según la edad y el estado de desarrollo específico de una planta leñosa.

Palabras clave: revigorización; metabolitos secundarios; ontogenia; fotomorfogénesis; heterotrofia.

INTRODUCCIÓN

Gmelina arborea Roxb. ex Sm. es un árbol maderable de la familia Lamiaceae. Su distribución natural comprende países como India, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, China, Laos, Camboya e Indonesia. Debido a su importancia en la industria forestal y medicinal, la melina se cultivó en muchas regiones tropicales de países de Latinoamérica como Brasil, Costa Rica, Honduras, Panamá, Venezuela, México y Colombia (Warrier et al., 2021).

En las regiones tropicales de América, Costa Rica es el país con mayor experiencia en la selección y mejoramiento genético de *G. arborea*. Desde las primeras plantaciones establecidas en la década del sesenta para la selección fenotípica de características comerciales, el establecimiento posterior de rodales y huertos semilleros para la venta de semilla seleccionada, hasta la obtención de clones de árboles “plus”, la investigación y desarrollo en melina se ha convertido en un eje de vanguardia dentro del sector forestal (Araya, 2005; Ávila-Arias et al., 2016; Dvorak, 2004; Morales, 2004).

La melina es la segunda especie más cultivada desde el 2004 en Costa Rica y es la especie forestal que produce más tarimas para el empaque de los principales productos de exportación del país (ONF, 2022). A pesar de ello, desde el 2015 hay una tendencia de reducción sistemática de plantaciones de alta calidad. Las variaciones intraespecíficas inter e intrapoblacionales en cuanto a la densidad de la madera generan una crisis de renovación sustentable (Ávila-Arias et al., 2015; Dvorak, 2004) y una menor expectativa para el uso de la madera en mercados más especializados del sector construcción, exportación o mueblería.

En la actualidad, existe una necesidad por conocer la edad ontogénica de los clones de melina de alto valor comercial, pues la capacidad de multiplicación disminuye cuando la propagación se realiza a partir de segmentos de plantas maduras. Está ampliamente documentado que las tecnologías y estrategias empleadas en el cultivo *in vitro* permiten el rejuvenecimiento de materiales fisiológicamente maduros (Read & Bavougian, 2013). Generalmente, las estrategias morfológicas para

identificar cambios de desarrollo atribuidos a la ontogenia necesitan el valor potencial de respuesta en la madurez. Evidentemente, en plantas leñosas se necesitan herramientas más rápidas y confiables para evaluar los estados de desarrollo. Fernandez-Lorenzo et al. (1999), caracterizaron estadios juveniles y adultos de árboles con el análisis cromatográfico y espectrofotométrico de polifenoles con relativa rapidez y sencillez.

Los compuestos fenólicos, incluidas las ligninas, están presentes en todas las plantas superiores y cumplen diversas funciones durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los cambios en los contenidos de estos compuestos están relacionados con el estado de diferenciación (Amoo et al., 2012; Rencoret et al., 2011), control genético, las condiciones ambientales (Covelo & Gallardo, 2001) y la capacidad de secuestrar especies reactivas de oxígeno (ERO) en presencia de factores de estrés (Liu et al., 2018). Por lo tanto, además de su función como marcador bioquímico de la edad, la concentración de fenoles en los tejidos vegetales es un buen indicador para predecir el grado de tolerancia al estrés en las plantas (Sharma et al., 2019).

Es difícil determinar los patrones de síntesis de metabolitos secundarios en plantas, incluidos los compuestos fenólicos, pues existen factores genéticos, ontogenéticos, morfogenéticos y ambientales que ocasionan fluctuaciones en los contenidos. En este sentido, Pérez-Ochoa et al. (2022) mencionan que los fenoles, flavonoides y terpenos cambian con la edad de la planta y que en algunos casos los contenidos aumentan en dependencia de los estados generativos (floración/fructificación) en comparación con los estados vegetativos. Por esos motivos, no sólo es importante determinar el contenido total de los metabolitos secundarios, sino también, su composición en cada etapa de desarrollo (Koricheva & Barton, 2012).

Meta análisis de las investigaciones que han evaluado los cambios en la producción de metabolitos secundarios en plantas relacionados con la ontogenia y la estacionalidad, revelaron que las concentraciones constitutivas de

todos los tipos de estos compuestos aumentan significativamente desde la etapa de plántula hasta la madurez, tanto en plantas herbáceas como leñosas (Koricheva & Barton, 2012). En relación con los cambios ontogenéticos en la inducción de metabolitos secundarios por herbivoría, la mayoría de los estudios se han realizado en hierbas juveniles y plantas herbáceas; éstas han mostrado un aumento significativo en comparación con las plantas maduras. Según los mismos autores, el único estudio que investigó la relación entre la edad ontogenética y la inducción de metabolitos secundarios por herbivoría en plantas leñosas demostró que las plantas maduras acumulan más metabolitos que las juveniles.

En especies leñosas, se han propuesto varias hipótesis para predecir los efectos del ambiente y la disponibilidad de recursos en la regulación y producción de metabolitos secundarios. Las dos hipótesis más aceptadas: equilibrio carbono-nutriente (ECN) y equilibrio crecimiento-diferenciación (CD) (Covelo & Gallardo, 2001) no predicen la asignación de carbono durante la fotosíntesis (nivel de jerarquía bajo), debido a que la proporción asignada para el metabolismo secundario está en función del excedente producido en niveles de jerarquía altos (Koricheva et al., 1998). Por su parte, el modelo de competencia proteica basado en los controles de la biosíntesis de proteínas y fenoles se basa en los orígenes metabólicos de la ruta que regula el flujo de carbono y la asignación de componentes secundarios basados en carbono, los destinos alternativos de los precursores de la ruta y los mecanismos reguladores bioquímicos, por lo cual, se considera el modelo más adecuado para predecir la asignación de fenoles foliares en plantas superiores terrestres (Jones & Hartley, 1999).

Aunque las plantas de forma natural producen compuestos fenólicos, la evaluación de la expresión en ambientes *in vitro* dependerá de los factores ambientales presentes en condiciones heterótrofas. Debido a la breve fase estacionaria de las plantas cultivadas *in vitro*, la producción de metabolitos secundarios presenta muy bajos rendimientos, por ejemplo:



se inhibe la acción enzimática normalmente presente en plantas maduras (Dias et al., 2016). No obstante, existen numerosos estudios donde se obtienen compuestos fenólicos a través del cultivo *in vitro* al mantener la capacidad de sintetizar compuestos de plantas *ex vitro*. Sin embargo, según Dubravina et al. (2005), en la mayoría de los casos el nivel de acumulación de estos compuestos es menor en comparación con plantas *ex vitro*, aparentemente por la acumulación de cambios genéticos y bioquímicos en las células de los cultivos *in vitro*.

Durante el cultivo *in vitro*, debido al control estricto de los ambientes fisicoquímicos, se eliminan presiones externas como cambios drásticos de luz, temperatura, humedad, herbivoría, competencia por nutrientes, entre otros; motivo por el cual, se esperan niveles bajos de expresión de compuestos fenólicos debido a la poca o nula variación de los agentes que ocasionan estrés oxidativo. Sin embargo, esta hipótesis no se ha evaluado en melina y es de suma importancia la generación de información para determinar si el cultivo de tejidos puede ocasionar o no un estrés oxidativo que pueda ocasionar problemas durante la revigorización de las plantas en comparación con plantas *ex vitro* de diferentes edades.

Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar cómo influye la edad en el contenido de fenoles y ligninas en hojas, peciolas, tallos y raíces de clones de *G. arborea*. Los resultados obtenidos en esta investigación representan el primer trabajo en melina que informa acerca de los contenidos de metabolitos secundarios como marcadores de la ontogenia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional (LAFIT-UNA). Las muestras vegetales de año y medio, cuatro, siete y 20 años usadas en este estudio se obtuvieron de plantaciones de melina ubicadas en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (coordenadas geográficas aproximadas 9°53'32.2" N & 83°39'4.4"

W). Las vitroplantas provenientes de la fase de multiplicación se obtuvieron del proyecto "Biofábrica para el rejuvenecimiento y reproducción masiva de material seleccionado de Melina (*Gmelina arborea* Roxb.) para el sector forestal costarricense (0576-19)", adscrito al Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la UNA (INISEFOR-UNA). El muestreo de las plantas *ex vitro* fue realizado los meses de marzo y abril del 2021. Las muestras de hojas compuestas se transportaron en nitrógeno líquido hasta el laboratorio donde fueron liofilizadas durante 24 h y posteriormente almacenadas en congelación (-20 °C).

Extracción de fenoles: Para el proceso de extracción y cuantificación de fenoles se utilizó la metodología propuesta por Gurr et al. (1992). Las hojas liofilizadas se molieron y se tamizaron hasta obtener tamaños de partícula menores a 1 mm. Se pesaron 75 mg de muestras secas y se depositaron en viales de rosca cilíndricos. A cada muestra se le agregó 3 ml de metanol. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 s antes de realizar un baño por sonicación a 40 °C durante 5 min. Los tubos se centrifugaron a 3 500 rpm durante 5 min. El procedimiento se repitió tres veces y se aforó con el mismo disolvente a 10 ml de extracto.

Cuantificación de fenoles: La cuantificación de los fenoles se realizó por triplicado en un lector de microplacas (BioTek Synergy™ HT, California, USA) para microplaca de 96 pocillos se evaluó la absorbancia de las muestras. A 30 µl del extracto se le agregaron 200 µl de agua destilada y 15 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, se le adicionaron 50 µl de Na₂CO₃ 15 %. Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 755 nm. El contenido de compuestos fenólicos solubles se expresó como los miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG * g⁻¹ MS).

Extracción de ligninas: Para la extracción y cuantificación de las ligninas se utilizó la metodología de Stafford (1960). Se tomaron

75 mg de muestras secas sin clorofila y se depositaron en viales de rosca cilíndricos. La primera extracción se realizó con 2 ml de dietil éter durante dos min para luego centrifugar a 2 000 g por 5 min. El sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó con 5 ml de agua destilada. Se volvió a centrifugar y nuevamente se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó por duplicado. Luego, se realizó una extracción alcalina al precipitado con 2 ml de NaOH 0.5N entre 70-80 °C por 14 h. Posteriormente, en frío, se agregó 100 µl de HCl 2N y se ajustó el pH a 7 o 8 con NaOH. Una vez ajustado el pH se aforó a un volumen de 3 ml con agua destilada. La mezcla se centrifugó a 2 000 g por 5 min y se colectó el sobrenadante. A 2 ml del extracto se le agregó 2 ml de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. A la otra alícuota de los 2 ml del extracto se le agregó 2 ml de NaOH 0.1N (pH 12.3). Finalmente, se midió la absorbancia a 245 y 350 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher, Evolution™ 350 UV-VIS, Massachusetts, USA).

Cuantificación de ligninas: El contenido total de ligninas se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ligninas} = (\text{Abs pH7 245 nm} - \text{Abs pH12 350 nm}) / E. \text{ guaiacol} * \text{FG} * \text{MM guaiacol} * \text{FD} * \text{VB/m}$$

Donde:

E. guaiacol (absortividad molar) = 4 100

FG = 1000 (g a mg)

MM guaiacol (masa molecular) = 124.14 g/mol

FD (factor de dilución)

VB (volumen de balón)

m (masa en gramos)

El contenido de ligninas se expresó como los miligramos equivalentes de lignina por gramo de muestra seca (mg lignina * g⁻¹ MS).

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y todos los datos se expresaron como valores promedio ± desviación estándar.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico R 3.5.1 (R Core

Team, 2019). Las comparaciones múltiples de los valores medios de los contenidos fenólicos y de ligninas se realizaron con el paquete Multcomp en R (Hothorn et al., 2008).

RESULTADOS

La presente investigación describe los resultados del contenido de fenoles totales solubles (FTS) y ligninas presentes en hojas, peciolo, tallos y raíces de clones de melina de cinco edades diferentes: plantas *in vitro* y plantas de año y medio, cuatro, siete y 20 años. Se demostró que todas las partes de la planta analizadas contienen compuestos fenólicos y ligninas independientemente de su edad.

En términos generales, los extractos de hojas tienen un contenido mayor de FTS y de ligninas en comparación con los extractos de peciolo, tallos y raíces para todas las edades (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4).

Los extractos obtenidos de las plantas *in vitro* presentaron las mayores concentraciones de FTS, con excepción de los extractos fenólicos obtenidos de los tallos de los árboles de año y medio y los mayores a 20 años, donde se presentaron valores promedio más altos, pero sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Fig. 3). En todos los casos, los valores promedio más bajos se obtuvieron en los árboles de cuatro años. Independientemente de la edad, los extractos de todas las partes de las plantas incrementan el contenido de FTS sin llegar a los valores obtenidos por las plantas *in vitro*. Sin embargo, el patrón de respuesta del contenido fenólico varía entre las diferentes partes de la planta una vez alcanzado los siete años. En cuanto a las hojas, la concentración promedio obtenida para los árboles de siete y 20 años fue de $40 \pm 1 \mu\text{g EAG/ g MS}$ ($P < 0.05$) (Fig. 1). Tendencia similar se presentó en las raíces con valores promedio de $16 \pm 0.6 \mu\text{g EAG/ g MS}$ ($P < 0.05$) (Fig. 4). No obstante, para estas mismas edades los extractos de peciolo y tallos muestran un contenido de fenoles con una tendencia descendente (de 13 ± 0.6 a $9 \pm 0.6 \mu\text{g EAG/ g MS}$; $P < 0.05$) y

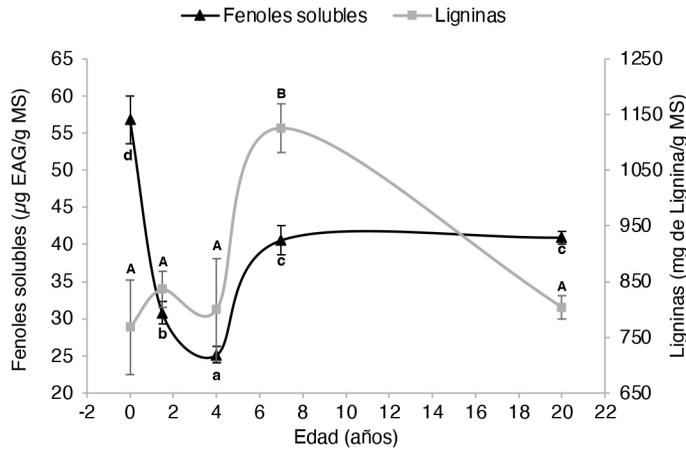


Fig. 1. Concentración de fenoles totales solubles y ligninas en hojas de *Gmelina arborea* en función de su edad. MS: muestra seca. EAG: equivalentes de ácido gálico. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes significan que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los contenidos de fenoles y ligninas, respectivamente. / **Fig. 1.** Concentration of total soluble phenols and lignins in leaves of *Gmelina arborea* as a function of age. DM: dry sample. EAG: gallic acid equivalents. Different lowercase and uppercase letters mean that there are significant differences ($P < 0.05$) between phenol and lignin contents, respectively.

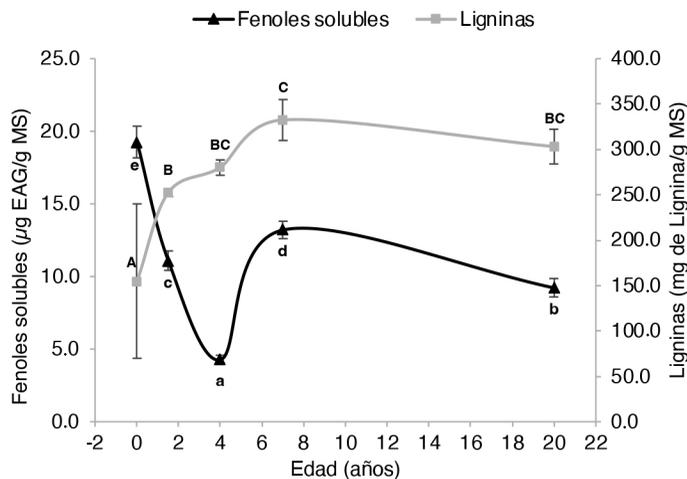


Fig. 2. Concentración de fenoles totales solubles y ligninas en peciolo de *Gmelina arborea* en función de su edad. MS: muestra seca. EAG: equivalentes de ácido gálico. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes significan que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los contenidos de fenoles y ligninas, respectivamente. / **Fig. 2.** Concentration of total soluble phenols and lignins in petioles of *Gmelina arborea* as a function of age. DM: dry sample. EAG: gallic acid equivalents. Different lowercase and uppercase letters mean that there are significant differences ($P < 0.05$) between phenol and lignin contents, respectively.

ascendente (de 9 ± 0.1 a 13 ± 0.5 µg EAG/ g MS; $P < 0.05$), respectivamente (Fig. 1, Fig. 2).

En relación con las ligninas, los extractos foliares obtuvieron los mayores contenidos en comparación con todas las partes de la planta,

independientemente de la edad. Los extractos de hojas, y en menor medida los extractos de los peciolo mostraron una relación de U invertida (Fig. 1, Fig. 2). En el caso de las hojas, las plantas más jóvenes presentaron los valores

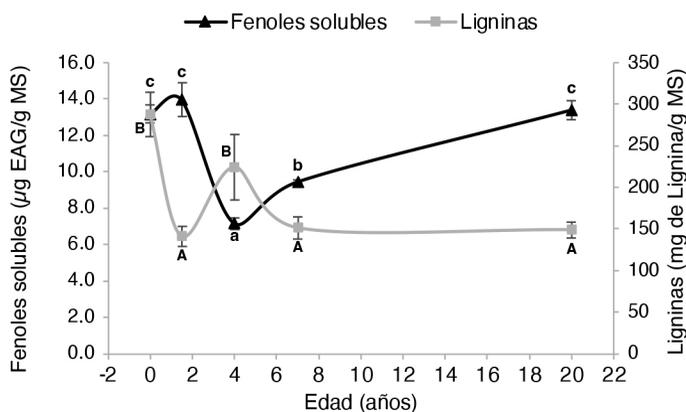


Fig. 3. Concentración de fenoles totales solubles y ligninas en tallos de *Gmelina arborea* en función de su edad. MS: muestra seca. EAG: equivalentes de ácido gálico. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes significan que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los contenidos de fenoles y ligninas, respectivamente. / **Fig. 3.** Concentration of total soluble phenols and lignins in *Gmelina arborea* stems as a function of age. DM: dry sample. EAG: gallic acid equivalents. Different lowercase and uppercase letters mean that there are significant differences ($P < 0.05$) between phenol and lignin contents, respectively.

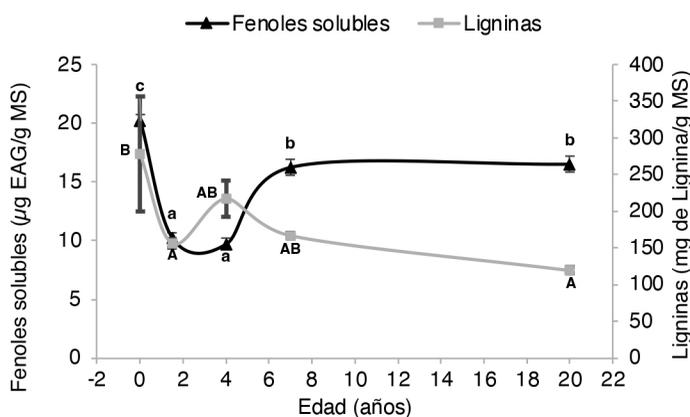


Fig. 4. Concentración de fenoles totales solubles y ligninas en raíces de *Gmelina arborea* en función de su edad. MS: muestra seca. EAG: equivalentes de ácido gálico. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes significan que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los contenidos de fenoles y ligninas, respectivamente. / **Fig. 4.** Concentration of total soluble phenols and lignins in roots of *Gmelina arborea* as a function of age. DM: dry sample. EAG: gallic acid equivalents. Different lowercase and uppercase letters mean that there are significant differences ($P < 0.05$) between phenol and lignin contents, respectively.

promedio más bajos ($768 \text{ mg} \pm 49 \text{ lignina g}^{-1} \text{ MS}$), aunque estadísticamente no significativos con los árboles de año y medio; siete y 20 años ($P > 0.05$). La mayor concentración de ligninas ($1126 \pm 42 \text{ mg lignina g}^{-1} \text{ MS}$) se obtuvo a los siete años ($P < 0.05$), después de lo cual, las plantas más longevas disminuyeron el contenido fenólico a valores similares a las plantas *in vitro* ($805 \pm 21 \text{ mg lignina g}^{-1} \text{ MS}$) (Fig. 1).

En el caso de los peciolo, el patrón de respuesta fue muy similar a las hojas, con los promedios significativamente más bajos para las plantas *in vitro* ($155 \pm 14 \text{ mg lignina g}^{-1} \text{ MS}$) y los más altos para las plantas de siete años ($332 \pm 22 \text{ mg lignina g}^{-1} \text{ MS}$; $P < 0.05$). No obstante, la disminución observada de las ligninas en los árboles más viejos fue menos pronunciada que en las hojas, pues la diferencia promedio



en comparación con los árboles de siete años no fue significativa, pero con las plantas más jóvenes la diferencia fue el doble (de 155 ± 14 a 303 ± 7 mg lignina g^{-1} MS; $P < 0.05$).

Los patrones observados de los contenidos de ligninas obtenidos en tallos y raíces fueron muy similares. Las plantas *in vitro* obtuvieron los extractos con los mayores contenidos (288 ± 27 y 278 ± 79 mg lignina g^{-1} MS, respectivamente). Los valores promedio más bajos de la investigación se obtuvieron en los tallos de los árboles de año y medio (141 ± 12 mg lignina g^{-1} MS), aunque las diferencias no fueron significativas con los árboles de siete y 20 años. Las raíces de los árboles más longevos presentaron los contenidos de lignina más bajos (120 ± 5 mg lignina g^{-1} MS), pero estadísticamente sólo tuvo diferencias significativas con las plantas *in vitro*. A los cuatro años, los tallos y las raíces aumentaron el contenido de las ligninas, pero el incremento solo fue significativo en los tallos (224 ± 40 y 218 ± 25 mg lignina g^{-1} MS, respectivamente). La tendencia en el contenido de ligninas disminuye conforme el árbol aumenta la edad. En el caso de los tallos de los árboles de siete y 20 años, los valores promedio fueron 151 ± 13 y 149 ± 9 mg lignina g^{-1} MS, mientras en las raíces la reducción fue de 167 ± 4 a 120 ± 5 mg lignina g^{-1} MS, respectivamente ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la evaluación de un único periodo del ciclo de vida de un conjunto de plantas de diferentes edades. En plantas longevas, como los árboles, se puede tener un gradiente complejo de tejidos en diferentes etapas ontogenéticas de desarrollo (Koricheva & Barton, 2012). Por tanto, las diferencias en los contenidos de fenoles entre los segmentos evaluados de las plantas *in vitro* e *in vivo* se deben a las diferentes condiciones de crecimiento y etapas específicas del desarrollo de la planta.

Es importante destacar que los estudios de largo plazo acerca de la distribución de los metabolitos secundarios en plantas son escasos, y según Wam et al. (2017), los patrones son inconsistentes y poco claros. La mayoría de los

estudios acerca de la inducción de metabolitos secundarios en plantas leñosas se llevan a cabo en plántulas, probablemente por razones prácticas, lo cual limita los datos para los estados maduros (Koricheva & Barton, 2012).

La información en la literatura en relación con la presencia de fenoles y ligninas en dependencia de las etapas de desarrollo es contradictoria. Aunque existen investigaciones que concluyen que las plantas *in vitro* presentan menores rendimientos en la producción de metabolitos secundarios en comparación con las plantas de campo (Dias et al., 2016; Dubravina et al., 2005), muchos estudios han demostrado que las condiciones específicas de la micropropagación estimulan la producción de compuestos fenólicos al modificar el metabolismo primario. Particularmente, los nutrientes y las hormonas influyen en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Debnath & Goyal, 2020; Gupta et al., 2017; Liu et al., 2018). Incluso, hay evidencia de una mejora en los metabolitos secundarios de materiales micropropagados de plantas, tejidos o células en comparación con las plantas cultivadas en el campo (Gupta et al., 2017).

Según Isah et al. (2018), los bajos rendimientos obtenidos de metabolitos secundarios en condición *in vitro* es por la alta utilización del carbono exógeno del medio de cultivo para el metabolismo primario. La demanda total de proteínas en condiciones no *in vitro*, y por tanto, su síntesis, está relacionada con las demandas proteicas vinculadas al crecimiento, fijación de carbono y homeóstasis (Jones & Hartley, 1999). Pero, en condiciones *in vitro*, el crecimiento y fijación de carbono no ocurre por fotosíntesis, sino a través de fotomorfogénesis, un proceso de desarrollo heterotrófico mediado por luz y fuentes de carbono exógenas.

Según el modelo de competición proteica propuesto por Jones y Hartley en 1999, existe una disputa bioquímica por la fenilalanina, que es la molécula precursora de la síntesis de proteínas y fenoles. La hipótesis postula que cuando las tasas de síntesis proteicas son altas, las tasas de síntesis fenólicas deben ser bajas y viceversa. En condiciones naturales, las

concentraciones de fenoles tienden a ser bajas durante la fase de desarrollo juvenil porque las demandas de proteínas totales son más altas durante estos periodos (Koricheva & Barton, 2012). De la misma forma, en condiciones de laboratorio no se esperan altas concentraciones porque la acumulación *in vitro* de grandes cantidades de metabolitos secundarios requiere un nivel específico de diferenciación celular (Amoo et al., 2012). La mayor cantidad de fenoles obtenidos en esta investigación para la condición *in vitro* (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4), aún en condiciones con gran cantidad de sacarosa, reflejan inconsistencias en relación con la competencia entre proteínas y fenoles por la utilización de fenilalanina para sus respectivas síntesis.

Aun así, la investigación considera que el modelo de competición proteico puede explicar los resultados obtenidos, lo cual se confirma con los estudios en mutantes de papa donde la interrupción de la primera enzima involucrada en la síntesis de fenilalanina y tirosina (corismato mutasa) disminuye no solo la fenilalanina, sino también, las ligninas y los compuestos fenólicos (Verpoorte & Alfermann, 2000). Como la distribución de la fenilalanina para la síntesis proteica o fenólica está determinada por el balance de la demanda (Jones & Hartley, 1999), se interpreta que la demanda o competencia de fenilalanina para la síntesis proteica –si ocurrió–, no impidió el suministro del aminoácido para incrementar la síntesis de fenoles en condiciones *in vitro* (Fig. 1). Como la fotosíntesis es opcional en condiciones de heterotrofia (Ahlert et al., 2003), la alta cantidad de sacarosa promueve la síntesis proteica de una forma donde los genes de la fotosíntesis autotrófica no se utilizan. Básicamente, los genes implicados en la síntesis proteica durante el cultivo *in vitro* se pueden eliminar sin afectar la viabilidad celular y el desarrollo de la planta (Ahlert et al., 2003).

Debido a la relación que existe entre los niveles de especies reactivas de oxígeno con el incremento en el contenido de compuestos fenólicos, se podría argumentar que los procedimientos de micropropagación ocasionaron

una afectación de magnitudes superiores al estrés que sufren las plantas en condiciones de campo, lo cual se reflejó en los contenidos de fenoles de las plantas *in vitro*, cuyos valores fueron superiores para todas las edades y para todas las partes evaluadas (con excepción de los tallos para los árboles de año y medio) (Fig. 3).

Existen investigaciones en las cuales se mencionan que los altos niveles de compuestos fenólicos en las plantas micropropagadas se deben a la capacidad de secuestrar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Liu et al., 2018). Si lo anterior se llegara a confirmar en *G. arborea*, es necesario evaluar las estrategias de micropropagación específicas para la especie, pues las plantas al estar estresadas producen especies reactivas de oxígeno que tienen que contrarrestarse con el aumento de fenoles. La presencia de plantas con fenotipos diferentes en el mismo medio de cultivo puede ser el resultado de plantas hiperhidratadas o un “envejecimiento” ocasionado por la pérdida de competencia morfogenética en cultivos *in vitro* a largo plazo (Fig. 5) (Valledor et al., 2007). Es una hipótesis que debe evaluarse en otro estudio, pero que indica la necesidad de utilizar y/o complementar otros marcadores para concluir el efecto del cultivo *in vitro* en el estrés de las plantas.

Las respuestas obtenidas del contenido de fenoles en los árboles de siete y 20 años en comparación con las plantas de año y medio pueden explicarse por las diferentes condiciones ecológico-ambientales que alteran de forma diferente la biosíntesis de los metabolitos secundarios. Puesto que, las plantaciones forestales se encontraban bajo el mismo fotoperiodo y temperatura, el aumento en el contenido de fenoles se puede explicar por la salinidad del suelo, la fertilización nitrogenada y fosfatada, así como, por los distintos niveles de déficit hídrico entre plantaciones (Pérez-Ochoa et al., 2022).

En lo que se refiere a los contenidos de fenoles en plantas de campo, la mayoría de los estudios se han realizado sobre la química foliar (Koricheva & Barton, 2012). Los resultados obtenidos muestran tendencias similares con la investigación de Lim et al. (2017), donde las hojas de *Macaranga pruinosa* tuvieron

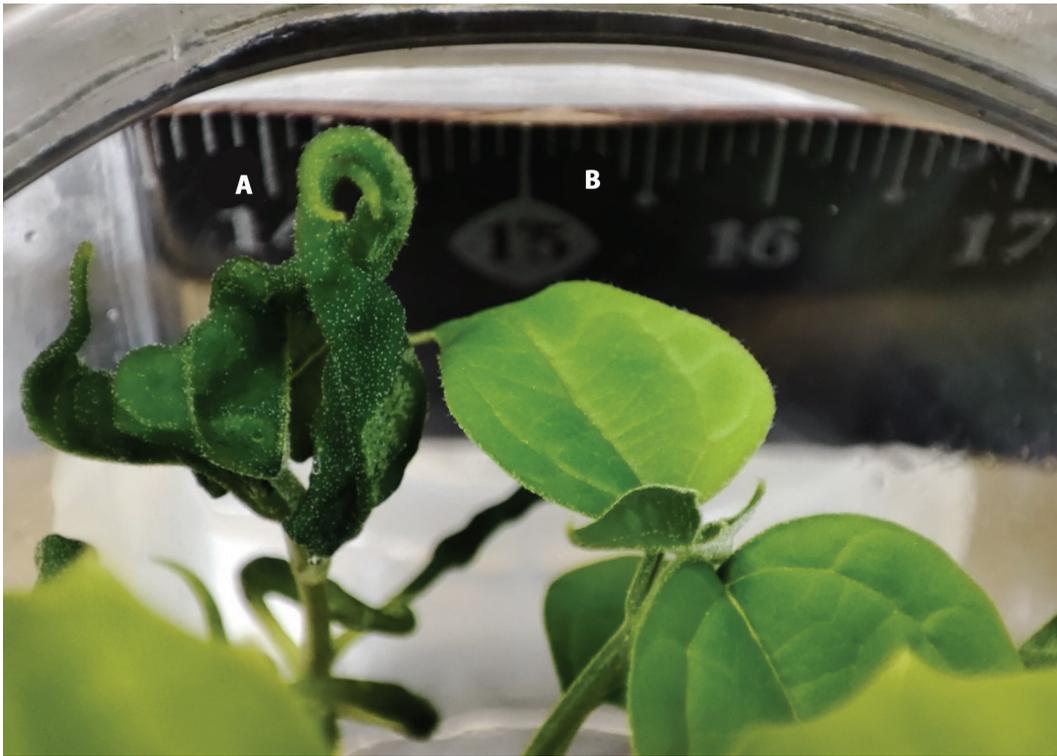


Fig. 5. Plantas *in vitro* de *Gmelina arborea* A. Fenotipos con posible hiperhidratación. B. Fenotipos normales. Imágenes propias de la investigación. / **Fig. 5.** *In vitro* plants of *Gmelina arborea* A. Phenotypes with possible hyperhydration. B. Normal phenotypes. Own images of the research.

contenidos fenólicos totales mayores que tallos y raíces. Los autores indican que la temporada tiene un efecto en los valores promedios obtenidos en hojas de *M. pruinosa*. Otro resultado que concuerda con esta investigación fue el publicado por Dutta y Ray (2020), quienes obtuvieron mayores fenoles totales en los extractos metanólicos de las hojas en comparación con el tallo. Por su parte, las conclusiones de Filová (2014), indican que las raíces *in vivo* son las que producen los mayores rendimientos de metabolitos secundarios debido a la variedad de estrés ambiental a las que están expuestas.

La melina tiene una diversidad de fitoquímicos bioactivos con comprobada importancia etnofarmacológica (Warrier et al., 2021). La obtención *in vitro* de fenoles y ligninas sin el uso de elicitores, son resultados prometedores en el campo de la fitoquímica forestal, pues

existen plantas que no producen o producen muy pocos compuestos en condiciones de cultivo de tejidos (Verpoorte et al., 2002).

Otro aspecto que pudo influir en los contenidos de fenoles y ligninas es el proceso de secado, particularmente las muestras de los tejidos *in vitro*. El estrés ocasionado por el daño mecánico y la desecación generan alteraciones bioquímicas en las células y tejidos previo al secado, la cual es una fase sensible porque, en dependencia del proceso, varía la concentración de los contenidos fenólicos de las muestras (Kittibunchakul et al., 2022).

Los patrones obtenidos de la concentración de ligninas muestran una tendencia opuesta a lo indicado en la literatura. Debido a que la deposición de lignina es una de las etapas finales de la diferenciación de las células del xilema y tiene lugar principalmente durante el

engrosamiento secundario de la pared celular (Rencoret et al., 2011), se esperaba, al menos para la variable tallo, una fuerte correlación positiva (entre más edad más lignina), pero los árboles más longevos para todas las partes de la planta mostraron los valores más bajos de estos polímeros (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). Para árboles de *Eucalyptus globulus* se demostró que el contenido de ligninas totales aumenta de un 16 % en plantas de un mes hasta un 25 % en planta de 9 años (Rencoret et al., 2011).

Además de los enfoques bioquímicos, es necesario complementar los estudios con datos epigenéticos. En algunas especies de árboles, los niveles de metilación de ADN son mayores en plantas adultas en comparación con plantas juveniles (Bräutigam et al., 2013; Fraga et al., 2002; Valledor et al., 2010). Durante la madurez aumenta la metilación *de novo* debido al proceso de diferenciación (Valledor et al., 2007; Valledor et al., 2010). Este trabajo constituye el primer eslabón para el diseño de experimentos más robustos que puedan dar perspectivas del funcionamiento bioquímico en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de árboles tropicales.

A pesar de ser los primeros datos que evalúan la relación entre la ontogenia y las condiciones de crecimiento de plantas clonales de melina, se requieren acciones para mejorar el alcance de los resultados, entre estas se destacan: la optimización de los muestreos *in situ*, debido a las diferencias significativas en las concentraciones de fenoles y ligninas de hojas de diferente tamaño tomadas de la misma rama y altura del árbol (datos no mostrados), la falta de medición de las proteínas totales que podrían ayudar a explicar el compromiso bioquímico central del modelo de competición proteica, la evaluación en condiciones *in vitro* de un mismo clon en diferentes ambientes (heterotróficos, mixotróficos y autotróficos) para comprender mejor la dinámica de la distribución de la fenilalanina durante la síntesis proteica y fenólica en especies forestales.

Es la primera investigación que evalúa el contenido de compuestos fenólicos y ligninas presentes en diferentes tejidos de una especie forestal de edades diferentes, por lo cual, son

los primeros valores de referencia acerca del compromiso bioquímico para la síntesis fenólica según la edad y el gradiente morfoanatómico de crecimiento específico. Las diferencias halladas en relación con estos metabolitos durante todas las fases de crecimiento es información valiosa para la determinación de índices bioquímicos relacionados con los tiempos de aprovechamiento óptimo en el cultivo clonal de especies forestales.

El estudio propone que los resultados obtenidos en condiciones de heterotrofia están relacionados con el modelo de competición proteico, debido a la absorción de sacarosa para la síntesis proteica sin afectar la demanda (por competencia) de fenilalanina para la síntesis fenólica. La presencia de mayor contenido de fenoles en las plantas *in vitro* y los altos contenidos de ligninas en esta condición para los tallos y raíces genera interrogantes en relación con la edad fisiológica y ontogenética de las plantas *in vitro* en comparación con plantas de campo. Por tanto, se recomienda una caracterización fitoquímica en cada etapa de desarrollo junto con el uso de marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares para explicar si los procesos del cultivo *in vitro* permiten revigorar materiales selectos en comparación con otros estados de desarrollo ontogenético.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

A Luis Diego Jiménez Alvarado del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) por su colaboración durante los muestreos en las plantaciones de melina.



A Gustavo Hernández Sánchez y William Hernández Castro del INISEFOR por su colaboración durante las actividades de campo.

REFERENCIAS

- Ahlert, D., Ruf, S., & Bock, R. (2003). Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *PNAS*, *100*(26), 15730–15735. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533668100>
- Amoo, S. O., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2012). In vitro plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *111*(3), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0200-3>
- Araya, E. (2005). Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, *2*(6), 1–14.
- Ávila-Arias, C., Murillo-Cruz, R., & Murillo-Gamboa, O. (2015). Selección de clones superiores de dos conjuntos genéticos de *Gmelina arborea* en el Pacífico Sur de Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, *49*(1), 17–35. <https://doi.org/10.15359/rca.49-1.2>
- Ávila-Arias, C., Salas-Rodríguez, A., & Murillo-Cruz, R. (2016). Selección de genotipos superiores de *Gmelina arborea* Roxb. por su heredabilidad genética a la tolerancia de la enfermedad de pudrición del tronco, Pacífico sur de Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, *13*(32), 11–20. <https://doi.org/10.18845/rfmk.v010.2548>
- Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, J. G., Fluch, S., Fraga, M. F., Guevara, M. Á., Abarca, D., Johnsen, Ø., Maury, S., Strauss, S. H., Campbell, M. M., Rohde, A., Díaz-Sala, C., & Cervera, M. T. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*, *3*(2), 399–415. <https://doi.org/10.1002/ece3.461>
- Covelo, F., & Gallardo, A. (2001). Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain. *Canadian Journal of Botany*, *79*(11), 1262–1269. <https://doi.org/10.1139/b01-109>
- Debnath, S. C., & Goyal, J. C. (2020). In vitro propagation and variation of antioxidant properties in micropropagated *Vaccinium* berry plants—A review. *Molecules*, *25*(4), 788. <https://doi.org/10.3390/molecules25040788>
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, *82*, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
- Dubravina, G. A., Zaytseva, S. M., & Zagorskina, N. V. (2005). Changes in formation and localization of phenolic compounds in the tissues of European and Canadian yew during dedifferentiation *In Vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology*, *52*(5), 672–678. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0100-z>
- Dutta, S., & Ray, S. (2020). Comparative assessment of total phenolic content and *in vitro* antioxidant activities of bark and leaf methanolic extracts of *Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard. *Journal of King Saud University - Science*, *32*(1), 643–647. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.09.015>
- Dvorak, W. S. (2004). World view of *Gmelina arborea*: Opportunities and challenges. *New Forests*, *28*(2–3), 111–126. <https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000040940.32574.22>
- Fernandez-Lorenzo, J. L., Rigueiro, A., & Ballester, A. (1999). Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology*, *19*(7), 461–466. <https://doi.org/10.1093/treephys/19.7.461>
- Filová, A. (2014). Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Research Journal of Agricultural Science*, *46*(1), 236–245.
- Fraga, M. F., Cañal, M. J., & Rodríguez, R. (2002). Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, *215*(4), 672–678. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0795-4>
- Gupta, S., Seal, T., Mao, A. A., & Sarma, S. (2017). High frequency direct shoot organogenesis of leaf explants and a comparative evaluation of phytochemicals, antioxidant potential of wild vs. in vitro plant extracts of *Lysimachia laxa*. *3 Biotech*, *7*(4), 274. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0907-2>
- Gurr, S. I., Pherson, M. I., & Bowles, D. J. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In D. L. Wilkinson (Ed.), *Molecular plant pathology: a practical approach* (pp. 51–56). Oxford Press.
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, *50*(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., & Frukh, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *132*(2), 239–265. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>

- Jones, C. G., & Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*, 86(1), 27–44. <https://doi.org/10.2307/3546567>
- Kittibunchakul, S., Hudthagosol, C., Sanporkha, P., Sapwarobol, S., Suttisansanee, U., & Sahasakul, Y. (2022). Effects of maturity and thermal treatment on phenolic profiles and in vitro health-related properties of sachá inchi leaves. *Plants*, 11(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants11111515>
- Koricheva, J., & Barton, K. E. (2012). Temporal changes in plant secondary metabolite production. In G. R. Iason, M. Dicke, & S. E. Hartley (Eds.), *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes* (pp. 34–55). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511675751.004>
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., Keinänen, M., & Keinänen, M. (1998). Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, 83(2), 212–226. <https://doi.org/10.2307/3546833>
- Lim, T. Y., Lim, Y. Y., & Yule, C. M. (2017). Distribution and characterisation of phenolic compounds in *Macaranga pruinosa* and associated soils in a tropical peat swamp forest. *Journal of Tropical Forest Science*, 29(4), 509–518. <https://doi.org/10.26525/jtfs2017.29.4.509518>
- Liu, B. L., Fan, Z. B., Liu, Z. Q., Qiu, X. H., & Jiang, Y. H. (2018). Comparison of phytochemical and antioxidant activities in micropropagated and seed-derived *Salvia miltiorrhiza* plants. *HortScience*, 53(7), 1038–1044. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13072-18>
- Morales, G. A. (2004). Potential of *Gmelina arborea* for solid wood products. *New Forests*, 28(2–3), 331–337. <https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000040956.68838.97>
- ONF. (2022). *Usos y aportes de la madera en Costa Rica. Estadísticas 2021 & Precios 2022*. Alma Creativa.
- Pérez-Ochoa, M. L., Vera-Guzmán, A. M., Mondragón-Chaparro, D. M., Sandoval-Torres, S., Carrillo-Rodríguez, J. C., & Chávez-Servia, J. L. (2022). Effects of growth conditions on phenolic composition and antioxidant activity in the medicinal plant *Ageratina petiolaris* (Asteraceae). *Diversity*, 14(8), 595. <https://doi.org/10.3390/d14080595>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing* (Software). R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Read, P. E., & Bavougian, C. M. (2013). In vitro rejuvenation of woody species. In M. Lambardi, E. A. Ozudogru, & S. M. Jain (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology* (pp. 305–316). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>
- Rencoret, J., Gutiérrez, A., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Faulds, C. B., Kim, H., Ralph, J., Martínez, Á. T., & del Río, J. C. (2011). Lignin composition and structure in young versus adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiology*, 155(2), 667–682. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167254>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Stafford, H. A. (1960). Differences between lignin-like polymers formed by peroxidation of eugenol and ferulic acid in leaf sections of Phleum. *Plant Physiology*, 35(1), 108–114. <https://doi.org/10.1104/pp.35.1.108>
- Valledor, L., Hasbún, R., Mejió, M., Rodríguez, J. L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M. F., Cañal, M. J., & Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(2), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9262-z>
- Valledor, L., Mejió, M., Hasbún, R., Jesús Cañal, M., & Rodríguez, R. (2010). Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *Journal of Plant Physiology*, 167(5), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.018>
- Verpoorte, R., & Alfermann, A. W. (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3>
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Wam, H. K., Stolter, C., & Nybakken, L. (2017). Compositional changes in foliage phenolics with plant age, a natural experiment in boreal forests. *Journal of Chemical Ecology*, 43(9), 920–928. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0881-5>
- Warrier, R. R., Priya, S. M., & Kalaiselvi, R. (2021). *Gmelina arborea* – an indigenous timber species of India with high medicinal value: A review on its pharmacology, pharmacognosy and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113593. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113593>