

---

ÁREA AGRÍCOLA  
OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO DE  
ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE *Magnolia arcabucoana*  
(Lozano) Govaerts. (Magnoliaceae) COMO UNA  
HERRAMIENTA DE CONSERVACIÓN

OPTIMIZATION THE *in vitro* ESTABLISHMENT  
PROTOCOL OF *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts.  
(Magnoliaceae) AS A CONSERVATION TOOL



Diana Milena Avendaño Torres  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad  
Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja,  
Colombia., Colombia  
diana.avendano@uptc.edu.co

Elberth Hernando Pinzón-Sandoval  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad  
Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja,  
Colombia., Colombia  
elberth.pinzon@uptc.edu.co

Revista de Investigación Agraria y Ambiental  
vol. 16, núm. 1, p. 103 - 122, 2025  
Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia  
ISSN: 2145-6097  
ISSN-E: 2145-6453  
Periodicidad: Semestral  
riaa@unad.edu.co

Recepción: 09 febrero 2024  
Aprobación: 09 junio 2024  
Publicación: 19 diciembre 2024

DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.7651>

URL: <https://portal.amelica.org/ameli/journal/130/1305272005/>

**Resumen:** **Contextualización:** el magnolio de arcabuco (*Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts), es una especie categorizada en peligro de extinción, que presenta deficiencias en la propagación sexual debido a la baja producción de frutos y semillas, esto genera una alta vulnerabilidad de las poblaciones naturales existentes a eventos de extinción. Las técnicas para el cultivo de tejidos *in vitro* son una alternativa eficaz para la propagación de especies amenazadas que requieren estrategias concretas para su conservación.

**Vacío de conocimiento:** en la actualidad no se cuenta con un protocolo que genere las condiciones óptimas que permitan la desinfección y establecimiento *in vitro* de *Magnolia arcabucoana*.

**Propósito:** establecer y optimizar un protocolo para la desinfección y establecimiento *in vitro* de yemas vegetativas como una herramienta de conservación para *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts.

**Metodología:** se evaluó un protocolo de desinfección, un protocolo de agentes inhibidores de fenoles y un protocolo de establecimiento, a través de diseños experimentales completamente aleatorizados (DCA), empleando las metodologías existentes según el tipo de protocolo.

**Resultados y conclusiones:** se obtuvo que concentraciones de 1 g L<sup>-1</sup> de CA (carbón activado) + 0,5 g L<sup>-1</sup> de AA (ácido ascórbico) incluidas en el medio de cultivo y solución de AA al 25 % p/v durante 15 minutos, controlaron en un 67,7 % la oxidación fenólica y la necrosis de las yemas. El mejor tratamiento de desinfección se logró con inmersión por tres minutos en una concentración de 0,8 % de Ca(ClO)<sub>2</sub>. En la fase de establecimiento el mayor crecimiento de las yemas se consiguió con Woody Plant Medium (WPM) con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-Bencilaminopurina) + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenacético). La brotación se obtuvo 105 días después del

establecimiento en el medio WPM con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Los resultados constituyen un aporte para el establecimiento *in vitro* de *Magnolia arcabucoana* con fines de conservación.

**Palabras clave:** biotecnología, medios de cultivo, organogénesis directa, oxidación fenólica.

**Abstract: Contextualization:** The magnolio of arcabuco (*Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts) is a species categorized as endangered, which presents deficiencies in sexual propagation due to low fruit and seed production. This generates high vulnerability of existing natural populations to extinction events. *In vitro* tissue culture techniques are an effective alternative for the propagation of threatened species that require specific strategies for their conservation.

**Knowledge gap:** Currently, there is no protocol available that generates the optimal conditions to allow for the disinfection and *in vitro* establishment of *Magnolia arcabucoana*.

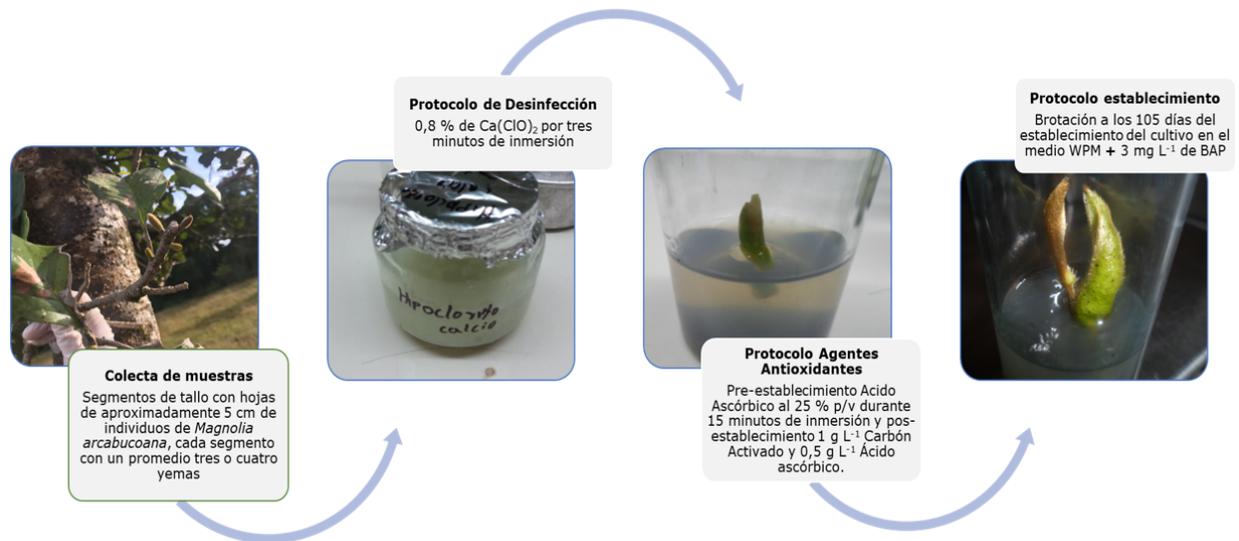
**Purpose:** Establishing and optimizing a protocol for the disinfection and *in vitro* establishment of vegetative buds can serve as a conservation tool for *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts).

**Methodology:** A protocol for disinfection, a protocol for phenol inhibitors, and a protocol for establishment were evaluated through completely randomized experimental designs (CRD), using existing methodologies according to the type of protocol.

**Results and conclusions:** It was found that concentrations of  $1 \text{ g L}^{-1}$  of activated carbon (CA) +  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  of ascorbic acid (AA) included in the culture medium and a 25% w/v AA solution for 15 minutes controlled phenolic oxidation and bud necrosis by 67.7%. The best disinfection treatment was achieved with a three-minute immersion in a 0.8% concentration of  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . In the establishment phase, the highest bud growth was obtained with Woody Plant Medium (WPM) containing  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP (6-Benzylaminopurine) +  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  of NAA (Naphthaleneacetic acid). Sprouting occurred 105 days after establishment in WPM medium with  $3 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP. These results constitute a contribution to the *in vitro* establishment of *Magnolia arcabucoana* for conservation purposes.

**Keywords:** biotechnology, culture medium, direct organogenesis, growth regulators, phenolic oxidation.

## RESUMEN GRÁFICO



Protocolo optimizado de las etapas de desinfección y establecimiento *in vitro* de yemas vegetativas de *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts autores.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Magnolio de Arcabuco (*Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts), es una especie endémica de Colombia, se puede encontrar en la cordillera Oriental entre Santander y Boyacá y al oriente de Cundinamarca; su distribución comprende un rango altitudinal entre 2000 y 2250 m.s.n.m, las poblaciones se encuentran separadas por más de 60 km de distancia, es posible que por su distribución se encuentre en los Santuarios de Fauna y Flora (SFF) de Guanentá Alto Río Fonce e Iguaque y en el Parque Nacional Natural (PNN) Chingaza (Calderón et al., 2014). Esta especie esta categorizada en peligro (EN), esto implica que el taxón se enfrenta a un riesgo de extinción alto en su estado de vida silvestre (IUCN, 2022).

La especie pertenece a la familia Magnoliaceae, constituida por árboles y arbustos distribuidos en bosques templados y tropicales del sudeste y este de Asia, América del Norte, las Antillas, América Central y del Sur, con mayor riqueza en el Neotrópico (Rivers et al., 2016; Palmarola et al., 2020; Restrepo-Cossio et al., 2024). La familia está conformada por 350 especies (Aguilar-Cano et al., 2018; Chávez-Cortázar et al., 2021; Guzmán-Díaz et al., 2022), de estas cerca del 70% se encuentran con alguna categoría de amenaza (Gutiérrez-Lozano et al., 2020). Las magnoliáceas presentan un patrón de distribución gregario, con un bajo número de individuos, siendo aquello característico de especies con requerimientos ambientales estrictos (Hernández et al., 2020); a causa de factores antrópicos como la ampliación de la frontera agrícola, la ganadería y la deforestación (Serna-González y Velásquez-Ruiz, 2017; Avendaño et al., 2022), se genera una disminución del flujo genético, baja producción de frutos y baja regeneración natural por semillas, aumentando drásticamente la vulnerabilidad de las poblaciones a eventos de extinción (Gutiérrez-Lozano et al., 2020; Serna-González et al., 2022)

Colombia cuenta con la mayor diversidad de Magnolias del Neotrópico, teniendo un total de 40 especies (Serna-González et al., 2022), de estas, 32 especies son endémicas (Vázquez-García et al., 2017; Rodríguez-Duque et al., 2023). El 95 % de las especies endémicas tienen alguna categoría de amenaza de extinción debido principalmente a: la fragmentación y degradación de los hábitats, distribución geográfica restringida, poblaciones reducidas y aisladas, aprovechamiento no sostenible de las maderas y dificultades de propagación natural (Serna-González y Velásquez-Ruiz, 2017; Serna-González et al., 2022).

La biotecnología vegetal y las técnicas para el cultivo de tejidos *in vitro*, son una alternativa eficaz para la propagación de especies amenazadas que requieren estrategias concretas para su conservación (Coelho et al., 2020; Kulak et al., 2022). En el caso de las magnoliáceas se han aplicado técnicas como organogénesis directa, empleando medios de cultivo como Murashige y Skoog modificado (MS), concentración media de Murashige y Skoog ( $\frac{1}{2}$  MS) o Woody Plant Medium (WPM), más la adición de reguladores de crecimiento como 6-bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) principalmente (Cui et al., 2019; Kang et al., 2020), obteniendo resultados positivos. Sin embargo, para que el método de propagación *in vitro* sea exitoso deben ajustarse a los limitantes endógenos y exógenos de cada especie (Luo et al., 2023).

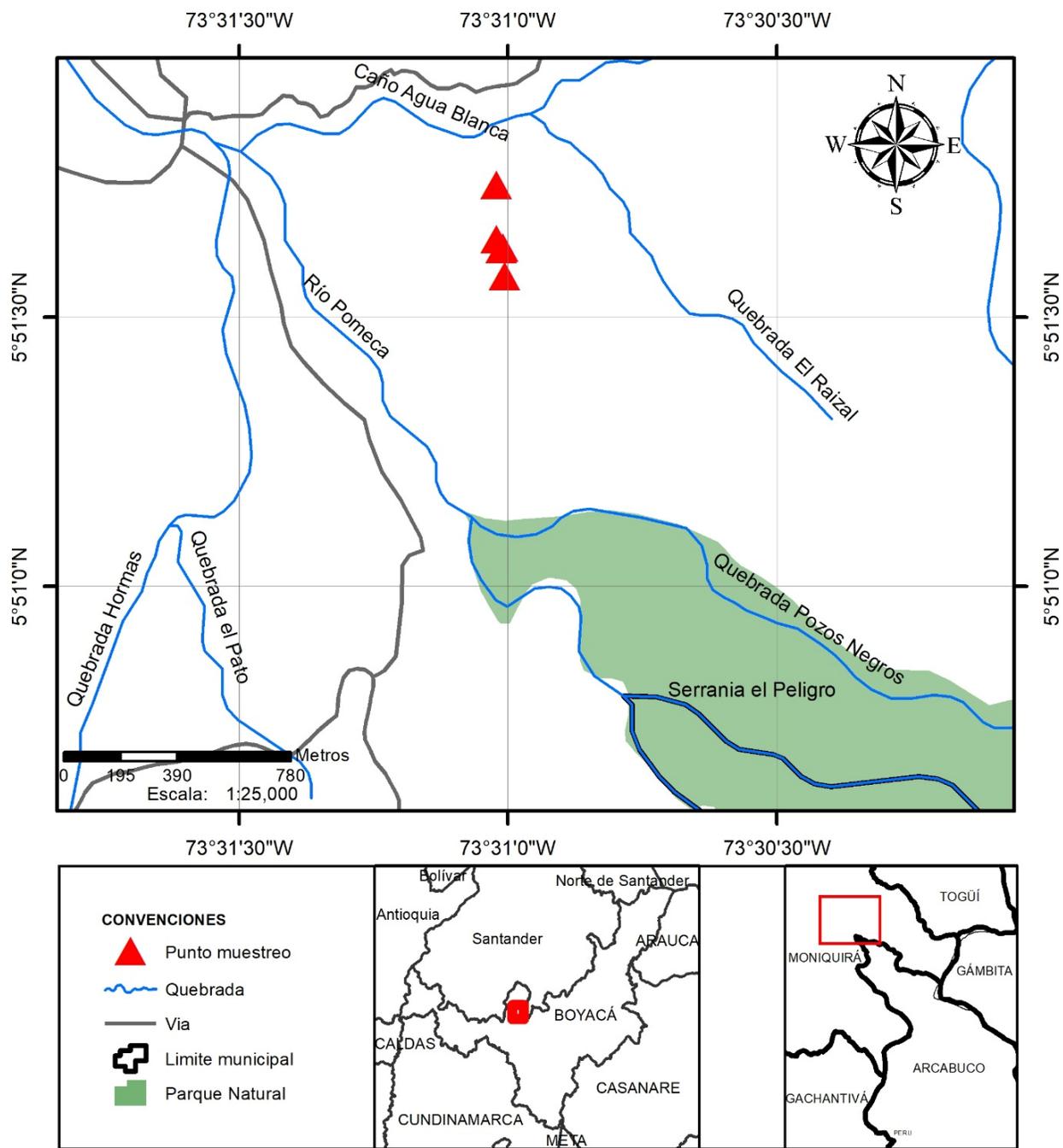
En el establecimiento *in vitro* de plantas leñosas, incluidas especies de la familia Magnoliaceae, como limitante endógena se han reportado problemas asociados a la secreción de polifenoles oxidados que afectan la viabilidad del explante (Azofoifa-Delgado, 2008). Los principales compuestos fenólicos que se han observado son el magnolol y el honokiol (Lee et al., 2011), que liberados durante el proceso de establecimiento *in vitro* constituyen unas de las principales limitantes (Parris et al., 2012). Dentro de las limitantes exógenas se tiene el estrés oxidativo o nitrosativo, el cual puede estar relacionado principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, el tipo de corte realizado, la formulación del medio de cultivo, los niveles de luz o incluso la acumulación de etileno en el frasco debido a la forma de sellado, la producción de radicales libres y procesos de oxidación de membranas celulares (Hernández y González, 2010; Wojtania et al., 2020). Por esta razón, se recomienda el uso de soluciones que contengan antioxidantes como el ácido ascórbico (AA) o absorbentes como el carbón activado (CA), como también, reducir la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante al igual que la sustitución o disminución de las concentraciones y tiempos de inmersión en el agente desinfectante (Ahmad et al., 2013; Amente y Chimdessa, 2021).

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de la investigación fue optimizar un protocolo para la desinfección y el establecimiento *in vitro* a partir de yemas vegetativas para la especie *Magnolia arcabucoana* (Lozano Govaerts, como contribución en la propagación y conservación de esta especie en peligro de extinción y endémica de Colombia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación y colecta de muestras

La colecta de muestras vegetales de individuos de *M. arcabucoana* se realizó en el municipio de Moniquirá, vereda Ajizal, predio El Rubí, localizado en la zona de amortización del Parque Regional Natural Serranía del Peligro (PNR) y en el municipio de Arcabuco, sector Peñas blancas (Figura 1).



**Figura 1.**  
Mapa de localización puntos de colecta de muestras  
autores.

Los trámites para obtener los permisos de colecta se realizaron durante el año 2020, a través de la Corporación Autónoma Regional de Boyacá (Corpoboyacá), mediante el formulario FGP-73, documentos con los cuales se abrió el expediente PEFI-00002-20 al que se adjuntó el formato FGP-75. Se obtuvo el permiso a través de la resolución No. 2197 del 04 de diciembre de 2020 y concepto técnico CR- 0005-2020.

Se tomaron segmentos de tallo con hojas de aproximadamente 5 cm de individuos adultos, cada segmento con un promedio tres o cuatro yemas, los explantes se transportaron en frascos de 100 ml que contenían una solución al 25 % p/v de ácido ascórbico (AA), hasta el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la secretaria de Agricultura de la Gobernación de Boyacá, en donde se realizaron los ensayos de la fase de laboratorio.

Para todos los protocolos se hizo acondicionamiento del material vegetal siguiendo la metodología descrita por Cardozo et al. (2017) con modificaciones. Se realizó lavado de los explantes con agua corriente por 10 minutos, luego se sumergieron en solución de detergente comercial  $1 \text{ g L}^{-1}$  y jabón líquido  $10 \text{ ml L}^{-1}$  por 10 minutos, se enjuagó y agitó de manera constante hasta eliminar el detergente, posteriormente, se llevó a cabo reducción a cada explante, eliminando la base lignificada de cada yema, por último, se lavaron en agua destilada y fueron reservados en frascos de 100 ml con solución antioxidante de ácido ascórbico al 25 % p/v, luego, se llevaron a la cámara flujo laminar para continuar el proceso de desinfección. Tanto para el protocolo de desinfección como para el protocolo de agentes antioxidantes, la selección de los tratamientos se basó en ensayos previos con mayor número de concentraciones y tiempos de inmersión (datos no presentados), tomando como criterio el porcentaje de viabilidad de los explantes.

#### **Protocolo de desinfección**

Para la desinfección superficial de los explantes se realizó un lavado con alcohol etílico al 70% por 30 segundos, seguido de una desinfección con solución de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) y diferentes tiempos de inmersión, el proceso se realizó en cámara de flujo laminar. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el primer factor correspondió a las concentraciones de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  (0,6 %, 0,8 %, 1,0 % y 1,2 %) y el segundo factor al tiempo de inmersión (1 min, 3 min y 5 min), con un resultado de 12 tratamientos y un tratamiento de control sin desinfección, con seis repeticiones, para un total de 78 unidades experimentales.

#### **Protocolo agentes antioxidantes**

Se estableció un protocolo para la inhibición de la oxidación por fenoles pre-establecimiento. Para lo cual se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el primer factor correspondió a concentraciones de 5 %, 15 % y 25 % de ácido ascórbico (AA) y el segundo factor a tiempos de inmersión de 10, 15 y 20 minutos aplicados al explante después de realizar el proceso de desinfección y antes de la siembra, dando un resultado de nueve tratamientos y un control, con tres repeticiones, para un total de 30 unidades experimentales. Se tomaron datos de necrosis en el medio de cultivo y viabilidad cada tres días durante 21 días.

Para establecer el protocolo para la inhibición de la oxidación por fenoles en el establecimiento, se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial en el que el primer factor correspondió a concentraciones de 0,2, 0,5 y  $1 \text{ g L}^{-1}$  de Carbono activado (CA) y el segundo factor a concentraciones de 0,2  $\text{g L}^{-1}$  y 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de ácido ascórbico (AA) aplicadas al medio MS sin hormonas, para un resultado de seis tratamientos y un control, con tres repeticiones, teniendo un total de 21 unidades experimentales. Se tomaron datos de oxidación por fenoles en el medio de cultivo y viabilidad cada tres días durante 21 días.

#### **Protocolo establecimiento**

Se sembraron yemas desinfectadas en medios Woody Plant Medium (WMP), Murashige y Skoog modificado (MS) y concentración media de Murashige y Skoog ( $\frac{1}{2}$  MS) con las siguientes concentraciones de reguladores de crecimiento:  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (Kang et al., 2020);  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA +  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de GA3 (Cui et al., 2019) y  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP modificado (Cardozo et al., 2017). Una vez realizada la siembra en recipientes de vidrio con 20 ml de medio, se incubaron en un cuarto de crecimiento con temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , bajo fotoperiodo de 12 horas luz, con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de 2000 lux aproximadamente. Para la evaluación se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con nueve tratamientos más un control, con seis repeticiones por tratamiento, para un total de 60 unidades experimentales. Se tomaron datos cada siete días durante 77 días, evaluando las variables de contaminación, necrosis del explante, oxidación de fenoles en el medio de cultivo, viabilidad y longitud de los explantes.

Para todos los ensayos la contaminación se registró como cero en caso de no presentarse y uno en caso de presentarse, ya sea por hongos o bacterias los cuales fueron identificados por caracteres macroscópicos, la necrosis en el explante se evaluó de acuerdo con las siguientes categorías: uno, si el explante presenta entre el 1 % y 25 % del tejido necrosado; dos, si el explante presenta entre el 26 % y 50 % del tejido necrosado; tres, si el explante presenta entre el 51 % y 75 % del tejido necrosado; y cuatro, si el explante presenta entre el 76 % y 100 % del tejido necrosado. La oxidación se evaluó de acuerdo con las siguientes categorías: uno, si el medio de cultivo presenta entre el 1 % y 25 % de oxidación fenólica; dos, si el medio presenta entre el 26 % y 50 % de oxidación fenólica; tres, si el medio presenta entre el 51 % y 75 % de oxidación fenólica; y cuatro, si el medio presenta entre el 76% y 100% de oxidación fenólica. La viabilidad se determinó como cero (no viable) si hay contaminación y la necrosis o la oxidación son mayores de tres, y uno (viable) si no hay contaminación y si la necrosis y la oxidación son menores o iguales a dos.

#### **Análisis estadísticos**

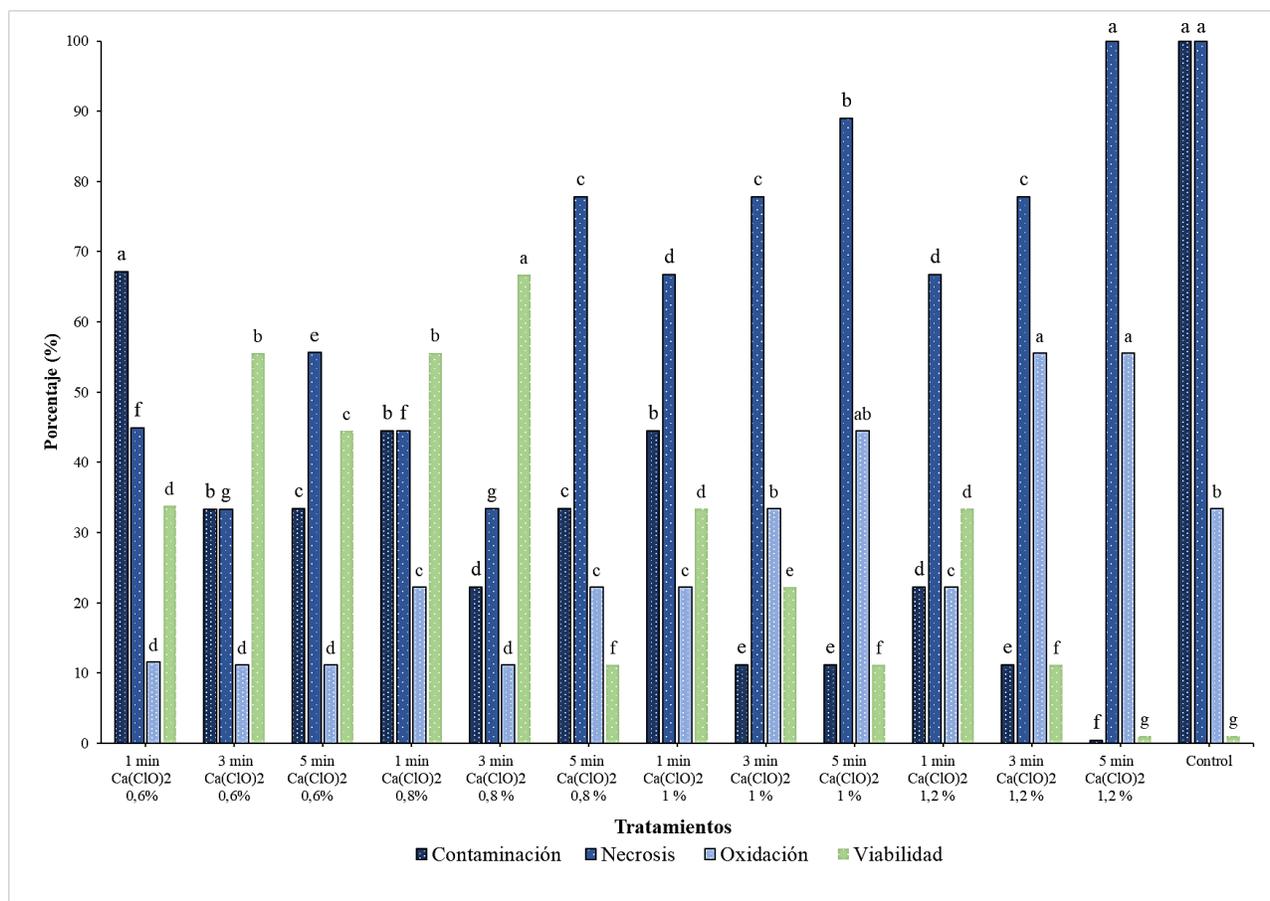
Se realizaron análisis exploratorios de los datos, debido al no cumplimiento del supuesto de normal distribución del error en todas las variables de respuesta, se realizó análisis mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ) y prueba post hoc de comparación múltiple de tratamientos por medio del criterio de diferencia menos significativa de Fisher y ajuste del valor p por el método de Dunn-Bonferroni, esto mediante el paquete estadístico "Agricolae" del software R Core Team (2022).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Protocolo de desinfección**

Se observó una tendencia de disminución del porcentaje de contaminación a medida que aumentó la concentración de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ , sin embargo, esto ocasionó un aumento del porcentaje de oxidación y necrosis (Figura 2). La concentración de 0,8% de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  y tres minutos de inmersión fue el mejor tratamiento con un porcentaje de viabilidad del 66,7 % de explantes viables a los 21 días del establecimiento, con una contaminación del 23,3 %, una necrosis del explante del 33,4 % y una oxidación del 11,2 % (Figura 2).

No fue posible controlar la oxidación y la necrosis de las yemas al 100%, probablemente debido a la respuesta de otras variables no controladas en este estudio tales como tamaño del explante o la acumulación de etileno en el recipiente (Azofeifa-Delgado, 2008; Cuba-Díaz et al., 2014), o a factores asociados con la naturaleza del explante como la edad fisiológica y su capacidad regenerativa (Cui et al., 2019).



**Figura 2.**

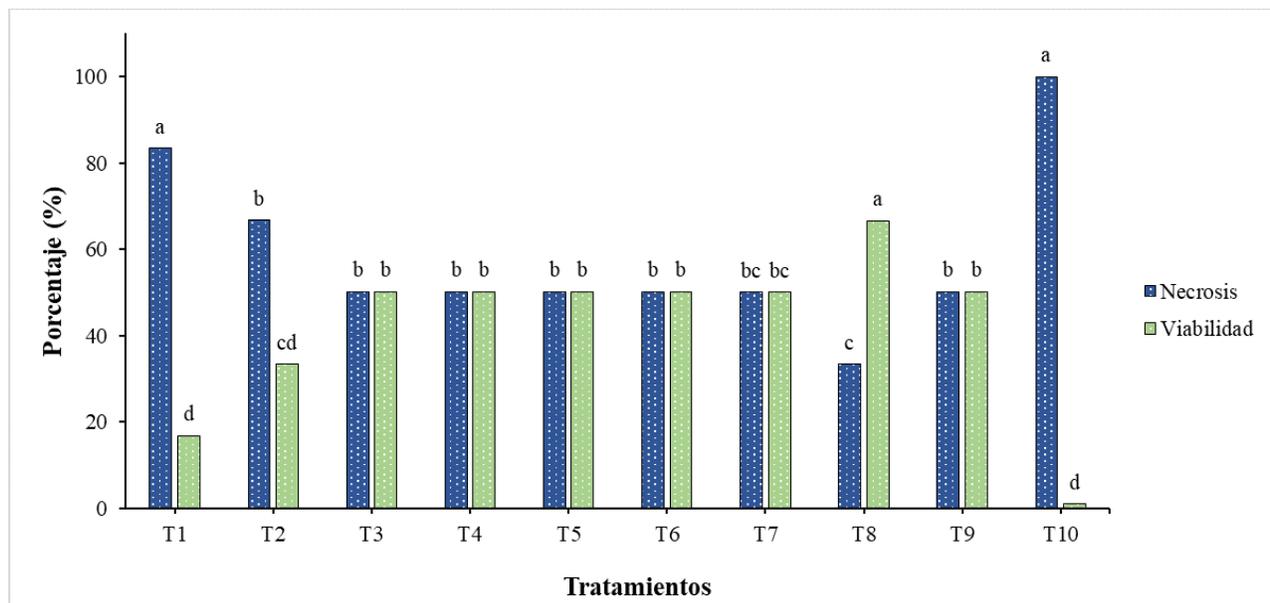
Porcentaje de viabilidad, contaminación, necrosis y oxidación de yemas vegetativas de *Magnolia arcuibucoana*, sometidas a diferentes concentraciones de Hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) y tiempos de inmersión, a los 21 días del establecimiento. Letras diferentes en cada serie indican diferencias significativas según el método de Dunn-Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ) autores.

En relación con el protocolo de desinfección, autores como Kang et al. (2020) indican que la oxidación por fenoles y la necrosis del explante, más que en la contaminación, fueron determinantes en el número de explantes viables por tratamiento, a medida que aumentó la oxidación y la necrosis, la viabilidad de las yemas disminuyó. De acuerdo con Radomir (2012), el uso de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) al 6 % por 20 minutos para la desinfección de meristemos con uno o dos primordios foliares tomados de yemas apicales o axilares de *Magnolia stellata* (Siebold y Zucc.) Maxim., fue adecuado. Durante los ensayos previos realizados en el presente estudio (datos no publicados), concentraciones superiores a 1,5 % de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  y 10 minutos de inmersión, causaron 100 % de necrosis y 0 % de viabilidad de yemas.

El desarrollo de este limitante está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado *in vitro*, principalmente a causa del agente desinfectante (Azofeifa-Delgado, 2008). Los EROS (especies reactiva de oxígeno) y/o ERN (especies reactivas de nitrógeno), generados en el proceso de desinfección, son capaces de oxidar varios componentes celulares y pueden conllevar a una destrucción oxidativa de la célula (Amente y Chimdesa, 2021).

### Protocolo agentes antioxidantes

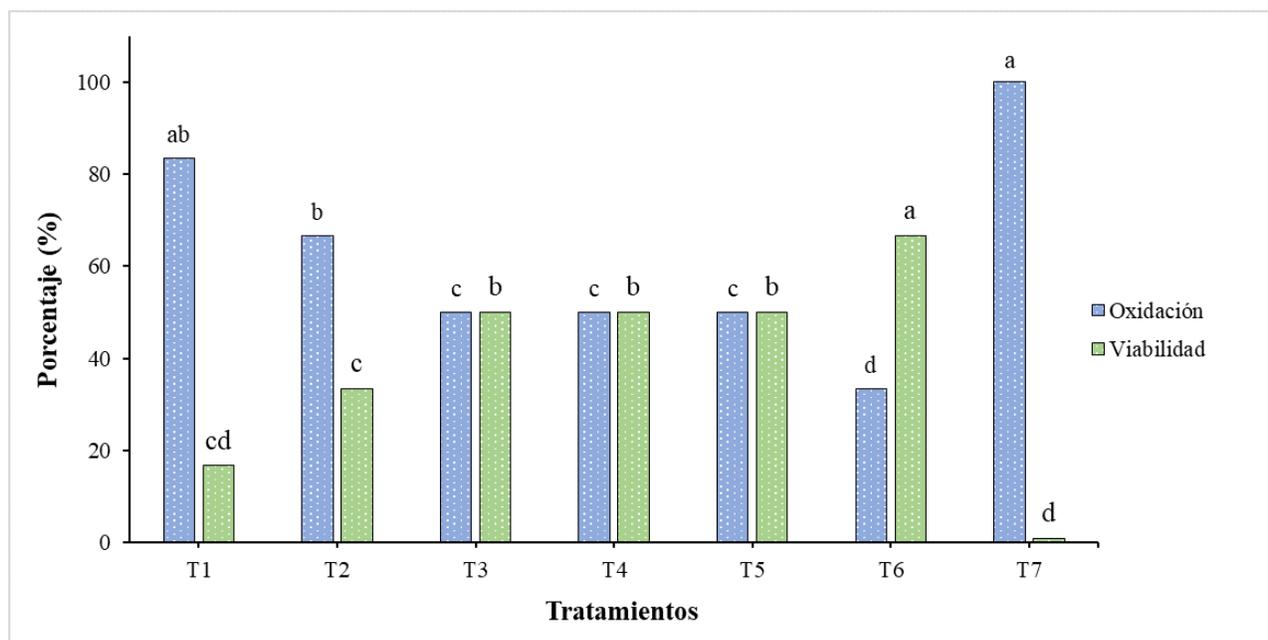
La inhibición de la oxidación por fenoles pre-establecimiento se obtuvo con la aplicación de una solución de ácido ascórbico (AA) al 25 % p/v durante 15 minutos de inmersión (tratamiento T8), este presentó un porcentaje de viabilidad de yemas del 66,7 % y una necrosis del 33,3 % frente al tratamiento testigo en el que se presentó una necrosis el 100% (Figura 3).



**Figura 3.**

Porcentaje de necrosis y viabilidad de yemas vegetativas de *Magnolia arcabucoana*, sometidas a diferentes concentraciones de ácido ascórbico y tiempos de inmersión, a los 21 días del establecimiento. Letras diferentes en cada serie indican diferencias significativas según el método de Dunn-Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ). AA: ácido ascórbico; tiempo de inmersión: min: T1: 5 % AA, 10 min; T2: 5 % AA, 15 min; T3: 5 % AA, 20 min; T4: 15 % AA, 10 min; T5: 15 % AA, 15 min; T6: 15 % AA, 20 min; T7: 25 % AA, 10 min; T8: 25 % AA, 15 min; T9: 25 % AA, 20 min; T10: Control 0 % AA, 0 min  
autores.

Al analizar la inhibición de la oxidación por fenoles en el establecimiento, se observó que el tratamiento T6, correspondiente a la aplicación de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado (CA) y  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de AA en el medio de cultivo, presentó una viabilidad de yemas del 66,7 % y un porcentaje de oxidación por fenoles en el medio de cultivo del 33,3 %. Los demás tratamientos presentan porcentajes mayores de oxidación y menor viabilidad de las yemas (Figura 4).



**Figura 4.**

Porcentaje de oxidación y viabilidad de yemas vegetativas de *Magnolia arcabucoana*, sometidas a diferentes concentraciones de carbón activado y ácido ascórbico en el medio de cultivo, a los 21 días del establecimiento. Letras diferentes en cada serie indican diferencias significativas según el método de Dunn-Bonferroni ( $p \leq 0,05$ , DMS: 3,68). CA: carbón activado; AA: ácido ascórbico: T1:  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  AA; T2:  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  AA; T3:  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  AA; T4:  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  AA; T5:  $1 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  AA; T6:  $1 \text{ g L}^{-1}$  CA +  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  AA; T7: control  $0 \text{ CA g L}^{-1}$  AA  $0 \text{ g L}^{-1}$  autores.

De acuerdo con Amente y Chimdessa (2021), el uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o aplicados en el medio de cultivo, tales como carbón activado (CA), polivinilpolipirrolidona (PVPP) o ácido ascórbico (AA), son unas de las estrategias para minimizar la oxidación fenólica, la cual se deriva de estrés oxidativo. El CA (carbón activado) presenta una red fina de poros con una gran superficie interna en la que se pueden adsorber diversas sustancias, en los cultivos de tejidos *in vitro* se ha usado para absorber la exudación fenólica y la acumulación de exudado oscuro (Thomas, 2008; Poniewozik et al., 2022). Con la adición de CA al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos evitando o disminuyendo el deterioro del explante (Pedroza, 2009; Díaz-Lezcano et al., 2021).

Así, Parris et al. (2012) indican que microbrotes de *Magnolia 'Ann'* propagada en medios de cultivo que contenían  $1 \text{ g L}^{-1}$  de CA, produjeron hojas más verdes y mayor longitud de los brotes en comparación con medios en ausencia de CA, esto indica que la eliminación de sustancias nocivas puede mejorar el crecimiento de la planta. La presencia de sustancias fenólicas en el medio de cultivo, liberadas por el explante, tiene un efecto autocatalítico, por esta razón, la remoción o dispersión de las mismas se considera un método de control efectivo (Amente y Chimdessa, 2021).

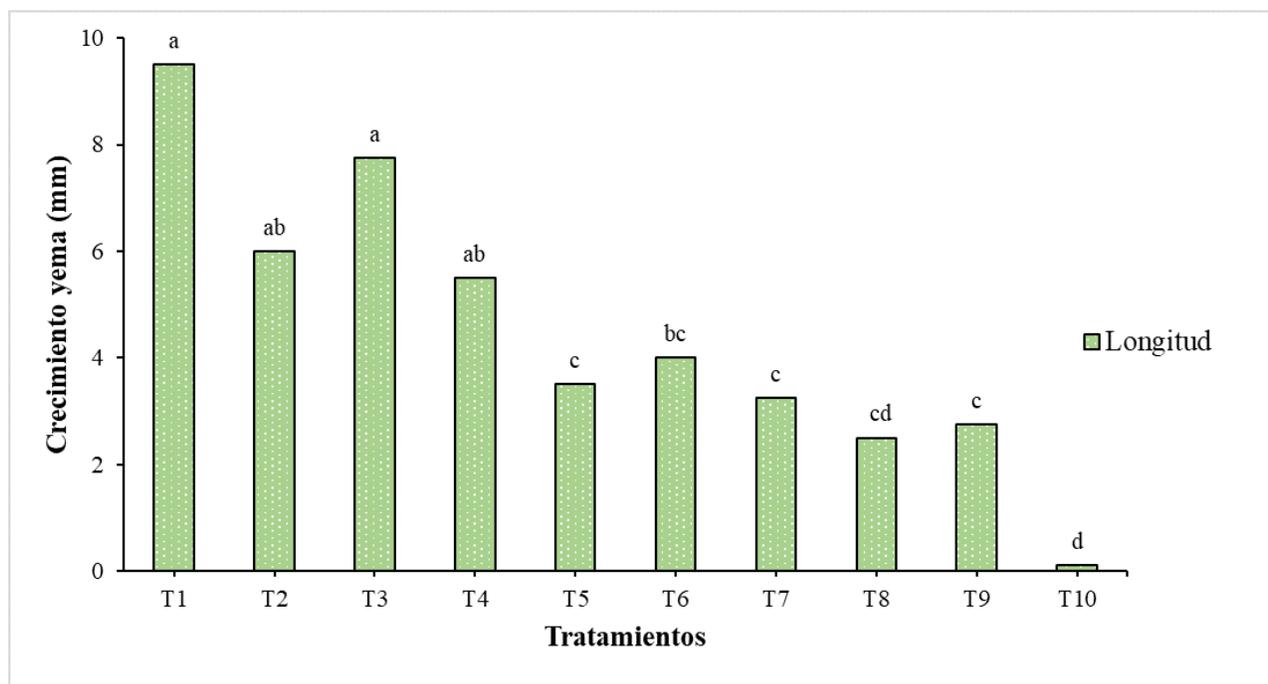
El ácido ascórbico (AA) actúa en reacciones de secuestro de especies reactivas de oxígeno (oxígeno singuete, superóxido, radical hidroxilo) y en la reducción de radicales libres, frenando las reacciones en cadena y previniendo daños a las membranas celulares (Blokhina et al., 2003). Las fenolasas oxidan a los orto-difenoles y flavonoides presentes en las células vegetales, dando lugar a orto-quinonas de color oscuro. En presencia de ácido ascórbico, estas orto-quinonas se reducen a fenoles y no tiene lugar el pardeamiento o necrosis del tejido (Maestro y Borja, 1993). Sin embargo, Cardozo et al. (2017) indican que no siempre es suficiente la adición de este compuesto ya que son variadas las causas asociadas a la oxidación por fenoles, por esto, dependiendo de la especie se deberá hacer uso de uno o varios agentes inhibidores de fenoles, en diferentes concentraciones y tiempos de inmersión para el cultivo *in vitro* de Magnolias.

De acuerdo con Azofeifa-Delgado (2008), concentraciones de 0,005 % hasta 1 % de AA aplicadas en solución a los explantes, fueron suficientes para controlar la necrosis en especies como *Cynodon transvaalensis* Burt Davy, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, *Musa textiles* (Née), *Psidium guajava* L. y *Ruscus hypophyllum* L. Sin embargo, en el presente protocolo el mayor porcentaje de viabilidad (66,7 %) de yemas vegetativas de *M. arcabucoana* se obtuvo con solución de AA al 25 % p/v, la cual es una concentración muy superior a lo indicado, esto posiblemente se debió al alto contenido fenólico reportado para especies de la familia Magnoliaceae (Borah et al., 2017).

#### **Protocolo de establecimiento**

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, se presentan diferencias significativas entre los medios de cultivo y las concentraciones de los reguladores de crecimiento aplicadas a yemas de *M. arcabucoana* en el establecimiento *in vitro*. El tratamiento T1, que corresponde al medio WPM adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (BAP) + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA), generó el mayor crecimiento en longitud de las yemas con un valor de 9,5 mm (Figura 5).

Se obtuvo un mayor crecimiento de las yemas de *M. arcabucoana* en los medios WPM en comparación con los medios MS y ½ MS (Figura 5). El medio MS tiene mayores concentraciones de macronutrientes que el medio WPM, esto es adecuado para la mayoría de las plantas, sin embargo, las especies leñosas responden mejor al medio WPM (Abdin et al., 2017), esto puede deberse a que para algunas plantas leñosas el uso de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno genera mejores resultados que la utilización de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS (Araújo et al., 2021).



**Figura 5.**

Crecimiento en milímetros de yemas vegetativas de *Magnolia arcabucoana*, sometidas a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y medios de cultivo, a los 77 días del establecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas según el método de Dunn-Bonferroni ( $p \leq 0,05$ , DMS: 9,37). WPM: Woody Plant Medium;  $\frac{1}{2}$  MS: concentración media de Murashige y Skoog; MS: Murashige y Skoog modificado; BAP: 6-N-Bencilaminopurina; ANA: ácido  $\alpha$ -naftalenacético; GA<sub>3</sub>: ácido giberélico. T1: WPM + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2: WPM + 2 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; T3: WPM + 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4: MS + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA; T5: MS + 2 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; T6: MS + 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7:  $\frac{1}{2}$  MS + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA; T8:  $\frac{1}{2}$  MS + 2 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; T9:  $\frac{1}{2}$  MS + 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T10: Control + 0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>

autores.

En relación al protocolo de establecimiento, Kang et al. (2020) indican que el medio modificado de Murashige y Skoog adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> BAP y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA generó una tasa de inducción de brotes al 95,5% en el establecimiento *in vitro* de *Magnolia lucida* (B.L. Chen y S.C. Yang) V.S. Kumar. No obstante, para el establecimiento de *M. arcabucoana* fue efectiva la combinación de reguladores de crecimiento y concentraciones, mas no el medio, ya que el medio WPM fue en el que se observaron los mejores resultados (Figura 5). Esto puede explicarse debido a que la respuesta *in vitro* de las especies de Magnolias es de tipo genotipo-específica, esto implica que los regulares de crecimiento, los agentes inhibidores de fenoles o los medios de cultivo a pesar de ser los mismos, deberán probarse dosis y concentraciones específicas para cada especie (Sokolov et al., 2014; Borah et al., 2017; Wojtania et al., 2020).

En estudios realizados por Cui et al. (2019), concentraciones  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de GA<sub>3</sub>, indujeron brotes en *Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin a partir de yemas laterales. Por su parte, Wojtania et al. (2015) indican que la concentración de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP generó brotes en *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod. a partir de yemas apicales y axilares establecidas *in vitro*. En la presente investigación fueron necesarios  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, para lograr la brotación de yemas de *M. arcabucoana*, luego de 105 días después del establecimiento en el medio de cultivo (Figura 5).

#### 4. CONCLUSIONES

A través de la presente investigación se logró establecer y optimizar el protocolo de desinfección ( $0,8 \%$  de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  por tres minutos de inmersión) y establecimiento inicial (medio WPM +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA), así como el protocolo para disminuir la oxidación causada por fenoles tanto en el pre-establecimiento inicial (AA al  $25 \%$  p/v durante 15 minutos de inmersión) y el pos-establecimiento inicial ( $1 \text{ g L}^{-1}$  CA y  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  AA) *in vitro* de yemas vegetativas de *Magnolia arcabucoana*, obteniendo una brotación a los 105 días del establecimiento del cultivo en el medio WPM +  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Esto constituye un aporte importante para el establecimiento *in vitro* de *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts con fines de conservación, en Colombia.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología vegetal de la secretaria de Agricultura de la Gobernación de Boyacá y a la Asociación Hijos del Monte, Moniquirá-Boyacá.

## LITERATURA CITADA

- Abdin, M. Z., Kiran, U., Kamaluddin, & Ali, A. (2017). Plant biotechnology: Principles and applications. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5>
- Aguilar-Cano, J., Mendoza-Cifuentes, H., & Ayala-Joya, M. (2018). Dos nuevas especies de árboles molinillo (Magnolia: Magnoliaceae) de la Serranía de los Yariguíes, departamento de Santander, Colombia. *Biota Colombiana*, 19(s1), 27–42. <https://doi.org/10.21068/c2018.v19s1a04>
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafes, M., Maryam., Rafay, M., & Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13(4), 539–547. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1975>
- Amente, G., & Chimdessa, E. (2021). Control of browning in plant tissue culture: A review. *Journal of Scientific Agriculture*, 5, 67–71. <https://doi.org/10.25081/jsa.2021.v5.7266>
- Araújo, M. da C. da R., Chagas, E. A., Vendrame, W., Ribeiro, M. I. G., Moura, E. A. de, Taveira, D. L. L., Chagas, P. C., & Grigio, M. L. (2021). Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21(3), e25442131. <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21n3a40>
- Avendaño, D. M., Pinzón, E. H., y Serrano, P. A. (2022). Aspectos biotecnológicos en la propagación in vitro de magnoliáceas. *Ciencia y Agricultura*, 19(3), 116–131. <https://doi.org/10.19053/01228420.v19.n3.2022.15195>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Borah, R., Kumaria, S., & Choudhury, H. (2017). In vitro plant regeneration of magnolia punduana: An endemic and threatened plant species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(2), 153–159. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v27i2.35020>
- Calderón, E., Cogollo, A., Velásquez-Rua, C., Serna-González, M. & García, N. (2014). Magnolia arcabucoana. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T193902A2290179. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T193902A2290179.en>
- Cardozo, S., Marin, B. S., Godoy, J., y Suárez, S. (2017). Propagación in vitro de Magnolia Hernandezii (Molinillo) a partir de hojas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 29, 80–85.
- Chávez-Cortázar, A., Oyama, K., Ochoa-Zavala, M., Mata-Rosas, M., Veltjen, E., Samain, M. S., & Quesada, M. (2021). Conservation genetics of relict tropical species of Magnolia (section Macrophylla). *Conservation Genetics*, 22(2), 259–273. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01334-5>
- Coelho, N., Gonçalves, S., & Romano, A. (2020). Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. *Plants*, 9, 345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>

- Cuba-Díaz, M., Acuña, D., Cordero, C., & Klagges, M. (2014). Optimización de parámetros para la propagación in vitro de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Gayana. Botánica*, 71(1), 58-67. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432014000100009>
- Cui, Y., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X., & Xi, R. (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46050-w>
- Díaz-Lezcano, M., Rodas-Ramírez, J., González-Segnana, L., y Ortiz, M. (2021). Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones in vitro. *CEDAMAZ*, 11(1), 1–5.
- Gutiérrez-Lozano, M., Sánchez-González, A., Vázquez-García, J. A., López-Mata, L., & Octavio-Aguilar, P. (2020). Population morphological differentiation of *Magnolia rzedowskiana* (Magnoliaceae): Endemic species in danger of extinction of the Sierra Madre Oriental, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e913101. <https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2020.91.3101>
- Guzmán-Díaz, S., Aldaba Núñez, F. A., Veltjen, E., Asselman, P., Larridon, I., & Samain, M. S. (2022). Comparison of Magnoliaceae Plastomes: Adding Neotropical *Magnolia* to the Discussion. *Plants*, 11(3), 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants11030448>
- Hernández, M., Palmarola, A., Testé, E., Veltjen, E., Asselman, P., Larridon, I., Samain, M. and González-Torres, L. (2020). Population structure and genetic diversity of *Magnolia cubensis* subsp. *acunae* (Magnoliaceae): Effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *Oryx*, 54, 451–459. <https://doi.org/10.1017/S003060531900053X>.
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58–69.
- IUCN. (2022). *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*. IUCN Standards and Petitions Committee. <https://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.
- Kang, L., Zheng, K., Xie, Y., Deng, Y., Yu, Y., Zhu, M., Xi, R., & Deng, X. (2020). Efficient tissue culture protocol for *magnolia lucida* (Magnoliaceae) and confirmation of genetic stability of the regenerated plants. *Plants*, 9(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/plants9080997>
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., & Saxena, P. (2022). In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants*, 11(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants11040503>
- Lee, Y. J., Lee, Y. M., Lee, C. K., Jung, J. K., Han, S. B., & Hong, J. T. (2011). Therapeutic applications of compounds in the *Magnolia* family. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 157–176. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.010>
- Luo, Y., Zheng, K., Liu, X., Tao, J., Sun, X., Deng, Y., & Deng, X. (2023). In Vitro Propagation and Genetic Uniformity Assessment of *Manglietiastrum sinicum*: A Critically Endangered Magnoliaceae Species. *Plants*, 12(13), 2500. <https://doi.org/10.3390/plants12132500>
- Maestro, R., y Borja, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites*, 44(2), 107–111. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i2.1106>
- Palmarola, A., Simón, R., Testé, E., Hernández, M., Sosa, A., Molina, Y., & González-Torres, L. R. (2020). Distribution and conservation of *Magnolia* (Magnoliaceae) in cuba. *Botanical Sciences*, 1(1), 300–313. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2868>

- Parris, J. K., Touchell, D. H., Ranney, T. G., & Adelberg, J. (2012). Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence in vitro growth and ex vitro establishment of Magnolia 'Ann.' *HortScience*, 47(11), 1625–1629. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.11.1625>
- Pedroza, J. A. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17–32.
- Poniewozik, M., Parzymies, M., & Szot, P. (2022). Effect of activated charcoal and ascorbic acid on in vitro morphogenesis and o-dihydroxyphenols content in *Paphiopedilum insigne*. *Horticultural Science*, 49(1), 48–51. <https://doi.org/10.17221/68/2020-HORTSCI>
- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Radomir, A.-M. (2012). Comparative study on the in vitro multiplication potential of *Magnolia stellata* and *Magnolia x soulangiana* species. *Journal of horticulture, forestry and biotechnology*, 16(2), 39–44.
- Restrepo-Cossio, L. V., López-Álvarez, N., Taborda-Arboleda, M. M., & Muriel-Ruíz, S. B. (2024). Seed germination and seedling development of *Magnolia guatapensis* (Lozano) Govaerts (Magnoliaceae): an endangered tree species from Colombia. *Botanical Sciences*, 102(1), 128–143. <https://doi.org/10.17129/botsoci.3349>
- Rivers, M., Beech, E., Murphy, L., & Oldfield, S. (2016). *The Red List of Magnoliaceae - revised and extended*. In The Red List (BGCI. Rich, Issue March). BGCI. Richmond, UK.
- Rodríguez-Duque, D. L., Escobar-Alba, M., García-González, J. D., Carvajal-Cogollo, J. E., & Aymard-Corredor, G. A. (2023). A New andean species of *Magnolia* (Section Talauma, Magnolioideae, Magnoliaceae), and a key to the species found in Colombia. *Harvard Papers in Botany*, 27(2), 3350. <https://doi.org/10.3100/hpib.v27iss2.2022.n1>
- Serna-González, M., Urrego-Giraldo, L. E., Santa-Ceballos, J. P., & Suzuki-Azuma, H. (2022). Flowering, floral visitors and climatic drivers of reproductive phenology of two endangered magnolias from neotropical Andean forests. *Plant Species Biology*, 37(1), 20–37. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12351>
- Serna-González, M., & Velásquez-Ruiz, C. (2017). Pollen of colombian magnolias. *Caldasia*, 39(1), 59. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v39n1.64315>
- Sokolov, R. S., Atanassova, B. Y., & Iakimova, E. T. (2014). Physiological response of in vitro cultured *Magnolia* Sp. to nutrient medium composition. *Journal of Horticultural Research*, 22(1), 49–61. <https://doi.org/10.2478/johr-2014-0006>
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Vázquez-García, J. A., Neill, D. A., Azanza, M., Pérez, Á. J., Dahua-Machoa, A., Merino-Santi, E., Delgado-Chaves, A. F., & Urbano-Apraez, S. M. (2017). *Magnolia mindoensis* (subsect. Talauma, Magnoliaceae): Una especie nueva del Chocó biogeográfico premontano en Colombia y Ecuador. *Brittonia*, 69(2), 197–208. <https://doi.org/10.1007/s12228-016-9449-x>
- Wojtania, A., Dziurka, M., & Skrzypek, E. (2020). In vitro rooting response of yellow-flowered magnolia in relation to the phenolic acids content. *Agronomy*, 10(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121880>

Wojtania, A., Skrzypek, E., Gabryszewska, E., & Sci Pol, A. (2015). Effect of cytokinin, sucrose and nitrogen salts concentrations on the growth and development and phenolics content in *Magnolia × soulangiana* 'Coates' shoots *In vitro*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(3), 51–62.

## INFORMACIÓN ADICIONAL

**FINANCIAMIENTO:** No aplica.

**ÁREA:** AGRÍCOLA

**CÓMO CITAR:** Avendaño, D., y Pinzón-Sandoval, E. H. (2025). Optimización de protocolo de establecimiento *in vitro* de *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts. (Magnoliaceae) como una herramienta de conservación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 16(1), 103 - 122. <https://doi.org/10.22490/21456453.7651>

**CONTRIBUCIÓN DE LA AUTORÍA:** **Diana Milena Avendaño Torres:** metodología, investigación, análisis de datos, conceptualización, escritura, borrador original. **Elberth Hernando Pinzón-Sandoval:** metodología, análisis de datos, escritura, revisión y edición.

**CONFLICTO DE INTERESES:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## ENLACE ALTERNATIVO

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/7651> (html)

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/7651/7592> (pdf)

## AmeliCA

### Disponible en:

<https://portal.amelica.org/amei/amei/journal/130/1305272005/1305272005.pdf>

[Cómo citar el artículo](#)

[Número completo](#)

[Más información del artículo](#)

[Página de la revista en portal.amelica.org](#)

AmeliCA

Ciencia Abierta para el Bien Común

Diana Milena Avendaño Torres,  
Elberth Hernando Pinzón-Sandoval  
**OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO in vitro DE *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts. (Magnoliaceae) COMO UNA HERRAMIENTA DE CONSERVACIÓN**  
**OPTIMIZATION THE in vitro ESTABLISHMENT PROTOCOL OF *Magnolia arcabucoana* (Lozano) Govaerts. (Magnoliaceae) AS A CONSERVATION TOOL**

*Revista de Investigación Agraria y Ambiental*  
vol. 16, núm. 1, p. 103 - 122, 2025  
Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia  
[riaa@unad.edu.co](mailto:riaa@unad.edu.co)

**ISSN:** 2145-6097

**ISSN-E:** 2145-6453

**DOI:** <https://doi.org/10.22490/21456453.7651>

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/about>



**CC BY-NC-SA 4.0 LEGAL CODE**

**Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.**