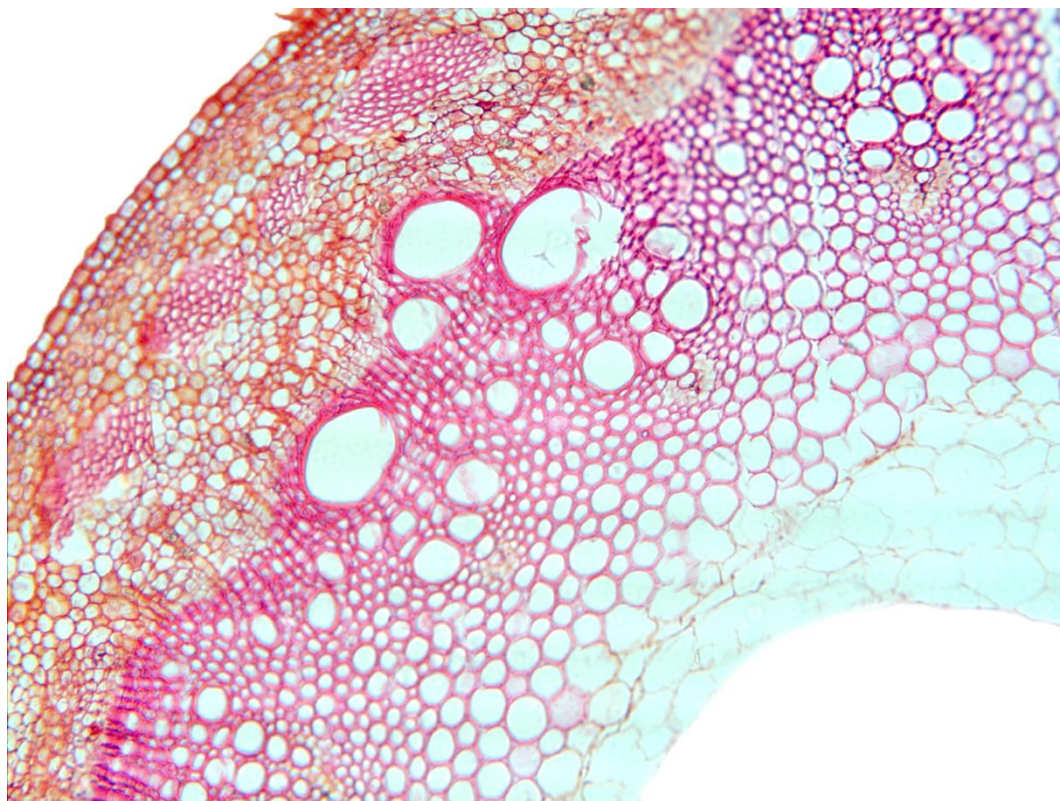


# *Steviana*



*Passiflora caerulea* L., corte transversal de tallo.



**Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales**  
**Departamento de Biología**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Asunción**



*Steviana* es una publicación de investigación primaria que cubre todas las líneas de trabajo en el campo de la Ciencias Botánicas y áreas relacionadas. Las secciones temáticas son: Conservación, Ecología, Etnobotánica y Botánica Económica, Ficología, Fisiología, Biotecnología, Fitoquímica, Flora y Vegetación, Genética y Biología Molecular, Micología, Morfoanatomía Vegetal, Sistemática y Taxonomía, Toxicología, entre otras.

Cuenta con dos versiones, impresa con tirada anual (ISSN 2077-8430) y on-line con publicación semestral (ISSN 2304-2907). La revista se encuentra indexada desde el 2012 al Catálogo de Latindex con N° de Folio 21767. Se publican investigaciones originales (artículos) y revisiones (reviews) sin costo para los autores.

Los artículos publicados en *Steviana*, son de interés para especialistas dentro de este campo, cuyos resultados y conclusiones principales son inéditos. Los mismos pasan por una evaluación imparcial y crítica realizado por especialistas ajenos al Comité Editorial, respaldando así la calidad de los trabajos publicados. El sistema de arbitraje principalmente empleado es doble ciego.

La **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción**, agradece a los investigadores que han dedicado su tiempo y esfuerzo incondicional en el arbitraje de los artículos:

**Dr. Víctor Manuel Bandala Muñoz**

Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México.

**Dra. Larissa Trierveiler Pereira**

Universidad Estadual de Maringa, Brasil.

**Dra. Natalia Dolce**

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Argentina. Instituto de Botánica del Nordeste, (UNNE-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina.

**Dr. Ricardo Daniel Medina**

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Argentina. Instituto de Botánica del Nordeste, (UNNE-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina.

**Dr. Enrique Zamorano-Ponce**

GENOTOX – Facultad de Ciencias, Universidad del Bio Bio, Chile.

**Dr. Gerardo Lucio Robledo**

Laboratorio de Micología – Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**Dr. Nicolás Niveiro**

Instituto de Botánica del Nordeste, Argentina

**Dr. Luis Diorio**

Dpto. de Biodiversidad y Biología Experimental – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

**Dra. Laura L. Villalba**

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

**Dr. Gerardo Cebrian Torrejon**

Grupo de Bioinorganica e Sistemas Nanometricos – Universidade Federal Fluminense, Brasil.

**Dra. María Daniela Rodríguez**

Instituto de Biotecnología de Misiones – Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

**Dr. Pablo Daniel Postemsky**

Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (CERZOS-CONICET-UNS) - Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.

**Agr. Luis Jorge Oakley**

Cátedra de Botánica. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario, Argentina

**Dr. Mario Saparrat**

INFIVE-CONICET, La Plata, Argentina.

**Dr. Orlando Popoff**

Instituto de Botánica del Nordeste, Argentina.

**Dra. Graciela Ponessa**

Instituto de Morfología Vegetal, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION**

**RECTOR**

Prof. Lic. Abel Bernal Castillo, M.Sc.

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**DECANO**

Prof. Lic. Constantino Nicolás Guefos K., MAE

---

**CUERPO EDITORIAL**

**Editor**

Bonifacia Benítez de Bertoni (FACEN-UNA)

**Co-editor**

Claudia Pereira Sühsner (FACEN-UNA)

**Asistentes de edición**

Claudia Mancuello (FACEN-UNA)

Fidelina González (FACEN-UNA)

Michelle Campi (FACEN-UNA)

**Diseño y diagramación**

Claudia Pereira Sühsner

**Fotografía de la tapa**

Claudia Pereira Sühsner

**Revisión de escrito en Inglés**

Nidia Beatriz Benítez Candia (FACEN-UNA)

**Comité Científico**

Christian Vogt (FACEN-UNA)

Gloria Yaluff (FACEN-UNA)

Juana de Egea (Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica - CEDIC)

María Fátima Mereles H. (Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica - CEDIC)

María Vera (FACEN-UNA)

Pastor Arenas (CEFYO-CONICET, UBA, Argentina)

---

**Revista *Steviana*:** Indexada al Catálogo de Latindex, N° de Folio 21767

**DIRECCIÓN OFICIAL**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UNA

Teléfono-fax: (595-21) 585 600

Dirección Postal: 1039

Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay

Página web: [www.facen.una.py](http://www.facen.una.py)

---



CONTENIDO POR SECCIONES

**Micología**

59 - 67 Evaluación del crecimiento de macrohongos de interés biotecnológico en residuos agroindustriales y maderero  
*Campi, M.; Grassi, E.; Armoa, J.; Campuzano, E.; López, T.; Mancuello, C.; Martínez, M.*

68 - 74 *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (Agaricaceae-Basidiomycota), hongo de interés medicinal y gastronómico, nueva cita para el Paraguay  
*Campi, M.; Miranda, B.; Maubet, Y.*

**Morfo-anatomía Vegetal**

75 - 83 Morfo-anatomía foliar y caulinar de *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae)  
*Pereira Sühsner, C.D.; Ferrucci, M.S.; Honfi, A.I.*

84 - 91 Morfo-anatomía de los órganos vegetativos y arquitectura foliar de *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd. (Asteraceae) de uso medicinal en Paraguay  
*González, F.; Pereira Sühsner, C.D.; Benítez, B.; Soria, N.*

**Toxicología**

92 - 101 Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*  
*Gayozo, E.; Rivarola, C.; Núñez, C.; Marín Insfrán, L.*



# Evaluación del crecimiento de macrohongos de interés biotecnológico en residuos agroindustriales y maderero

Campi, M.<sup>1</sup>; Grassi, E.<sup>4</sup>; Armoa, J.<sup>1</sup>; Campuzano, E.<sup>3</sup>; López, T.<sup>2</sup>; Mancuello, C.<sup>3</sup>; Martínez, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Área Micología, Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Industrial y Bioprocesos, Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

<sup>3</sup>Área Química Orgánica de los Productos Naturales, Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

<sup>4</sup>Laboratorio de Micología Experimental, Aplicaciones de Hongos ligninolíticos-INMIBO, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

E mail del autor: geraldinecampi@gmail.com

---

**Evaluación del crecimiento de macrohongos de interés biotecnológico en residuos agroindustriales y madereros.** Se evaluó la capacidad de crecimiento de cepas de macrohongos nativos del Paraguay de interés biotecnológico: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Schizophyllum commune* en medios de cultivo enriquecidos con residuos agroindustriales y madereros. Se prepararon medios con las siguientes combinaciones: Pino/Paja, Pino/Caña, Lapacho/Paja, Lapacho/Caña. Para las cepas *T. versicolor* y *P. ostreatus*, el medio de cultivo óptimo de crecimiento fue el enriquecido con la combinación Pino/Paja, la cepa *S. commune* mostró similar crecimiento en los diferentes medios utilizados. Los medios enriquecidos con lapacho presentaron efecto inhibitorio sobre las cepas *T. versicolor* y *P. ostreatus*, probablemente debido al compuesto naftoquinónico (lapachol) con propiedades antifúngicas reportadas en la literatura. La cepa *S. commune* creció favorablemente en medios enriquecidos con lapacho, lo que sugiere que esta cepa posee complejos multienzimáticos capaces de bloquear el efecto inhibitorio del lapachol. El presente trabajo experimental es el primer antecedente relacionado con cepas de macrohongos del Paraguay.

**Palabras Claves:** biotecnología, degradadores de madera, hongos, residuos

**Growth assessment of macrofungi with biotechnological interest in agro-industrial and timber waste.** The growth capacity of native fungal strains from Paraguay and of biotechnological interest: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Schizophyllum commune* were evaluated in various culture media enriched with agroindustrial waste (Straw and Bagasse) and wood (sawdust Pine and Lapacho). Culture media were prepared with the following combinations: Pine/Straw, Pine/Reed, Lapacho/Straw, Lapacho/Reed. For both *T. versicolor* and *P. ostreatus* strains, the optimum growth culture medium was enriched with Pine/Straw combination, but the strain *S. commune* showed similar growth in all the different culture media used. Media enriched with Lapacho had inhibitory effect on *T. versicolor* and *P. ostreatus* strains, probably due to naphthoquinone compound (lapachol) with antifungal properties reported in the literature. *S. commune* strain grew favorably in Lapacho enriched culture media, suggesting that this strain has multienzyme complexes capable of blocking the inhibitory effect of lapachol. This experimental work is the first Macrofungi antecedent related with strains of Paraguay.

**Keywords:** biotechnology, wood degraders, mushrooms, wastes

---

*Steviana*, Vol. 8(2), 2016 pp. 59–67.

Original recibido el 8 de agosto de 2016.

Aceptado el 28 de noviembre de 2016.

## INTRODUCCIÓN

La degradación de los compuestos lignocelulósicos es un proceso muy importante a nivel ecológico. El material lignocelulósico (ramas, troncos, hojas) mantiene en su estructura componentes como carbono y nitrógeno que durante su degradación son liberados haciéndolos nuevamente biodisponibles para la flora, fauna y demás organismos del ambiente (Nordén *et al.*, 2004). Los hongos de pudrición blanca crecen y degradan una gran cantidad de desechos agrícolas y forestales (lignocelulósicos) y atacan los diferentes polímeros de la madera (celulosa, hemicelulosa, lignina) (Hammel, 1997). Por esto el principal rol de los hongos en los ecosistemas se centra en el reciclado del carbono y otros elementos. (Robledo y Urcelay 2009).

Durante el proceso de degradación de la madera, la lignina, polímero fenólico, es degradada por la interacción de diversas enzimas extracelulares, principalmente peroxidasas: lignina-peroxidasa (LiP), Mn-peroxidasa (MnP) y fenoloxidasas (lacasas). Estas enzimas ligninolíticas son de particular relevancia biotecnológica debido a su falta de especificidad y alto potencial redox, que les permite actuar sobre una gran variedad de compuestos aromáticos. Se ha comprobado que numerosas enzimas ligninolíticas son capaces de degradar compuestos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, cloroanilinas, nitrotoluenos, bencenos policlorados y tinturas industriales (Grassi *et al.*, 2011), considerados todos contaminantes ambientales producidos a escala industrial (Pointing, 2001). No solo los hongos degradadores de madera acaparan el interés por sus potenciales

aplicaciones biotecnológicas, los esporocarpos de muchos macrohongos son consumidos como alimento.

Cabe destacar que la mayoría de las investigaciones ligadas a aplicaciones biotecnológicas de hongos de pudrición blanca se realizaron para especies del Hemisferio Norte (Hatakka *et al.*, 1994). Esto contrasta con la diversidad de hongos ligninolíticos que han sido descritos en el Hemisferio Sur, sobre los cuales son escasos los estudios acerca de los sistemas enzimáticos implicados. Paraguay posee zonas en las cuales se estima una alta diversidad de hongos degradadores de madera con potencial biotecnológico. Es necesaria la búsqueda de nuevas cepas nativas con potencialidad y alternativas para su cultivo utilizando fuentes de sustrato propias de la región donde es aislado el hongo.

El objetivo del presente trabajo fue realizar un relevamiento en la zona del Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo-Paraguay de especies de hongos degradadores de la madera, realizar aislamientos axénicos de estos para luego evaluar el crecimiento de los mismos en medios de cultivo sólidos, enriquecidos con residuos agroindustriales y materiales orgánicos lignocelulósicos, procedentes de *Pinus elliottii* Engelm. y del árbol nativo *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Lapacho).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección e identificación de macrohongos

Los hongos degradadores de madera fueron colectados en el PARAGUAY; Departamento Central; Ciudad San



Lorenzo; Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción (26°20'08"S; 57°31'14"O). Para la identificación taxonómica de cada material colectado, se realizaron cortes a mano alzada, tratados posteriormente en el orden mencionado: disolución de KOH al 5% (m/v), Floxina al 10%, Solución al 1% de rojo congo en amoniaco y reactivo de Melzer para las observaciones microscópicas y descripción de las características relevantes (Robledo y Urcelay, 2009; Wright y Albertó, 2002).

Las colecciones fueron depositadas en el herbario FACEN de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

#### Materiales de referencia

*Trametes versicolor* (L.) Lloyd; PARAGUAY; Departamento Central, Ciudad San Lorenzo, Campus Universitario; 25°20'22,96"S - 57°31'16,82"O; 30-XII-2015; Campi, M. 22 (FACEN).

*Ganoderma australe* (Fr.) Pat.; PARAGUAY; Departamento Central, Ciudad San Lorenzo, Campus Universitario; 25°20,1'1,88"S - 57°30'59,25"O; 27-IV-2016; Díaz, F. 16 (FACEN).

*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.; PARAGUAY; Departamento Central, Ciudad San Lorenzo, Campus Universitario; 25°19'39,79"S - 57°31'12,16"O; 24-II-2016; Campi, M. 90 (FACEN).

*Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill.; PARAGUAY; Departamento Central, Ciudad San Lorenzo, Campus Universitario; 25°20,1'1,88"S - 57°30'59,25"O; 05-II-2016; Campi, M. 89 (FACEN).

*Schizophyllum commune* Fr.; PARAGUAY; Departamento Central, Ciudad San Lorenzo, Campus Universitario; 25°19'52,19"S - 57°31'13,54"O; 02-IV-2016; Campi, M. 81 (FACEN).

#### Aislamiento

Las muestras de hongos frescas de *Trametes versicolor*, *Ganoderma australe*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Schizophyllum commune* fueron aisladas colocando secciones del basidioma en placas de Petri con extracto de Malta (12,7 g.L<sup>-1</sup>, agar 20 g.L<sup>-1</sup>) suplementado con cloranfenicol (200 mg.mL<sup>-1</sup>) para evitar el crecimiento bacterial. Las cepas aisladas con éxito fueron depositadas en el Cepario de FACEN (FACEN Cult.), Área Micología, Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción.

#### Preparación de medios de cultivo enriquecidos

Se prepararon 4 medios de cultivo enriquecidos con combinaciones de los distintos componentes utilizados (Fig. 1). En la Tabla 1 se muestran las proporciones por placa de Petri de los componentes lignocelulósicos utilizados. Además, se agregó a cada placa 500 mg de CaCO<sub>3</sub> como regulador de pH del medio. Se utilizaron dos medios controles, Malta y Sabouraud (grado microbiológico), autoclavados a una temperatura de 121°C por un periodo de 20 minutos.

Los ensayos se realizaron por triplicado.

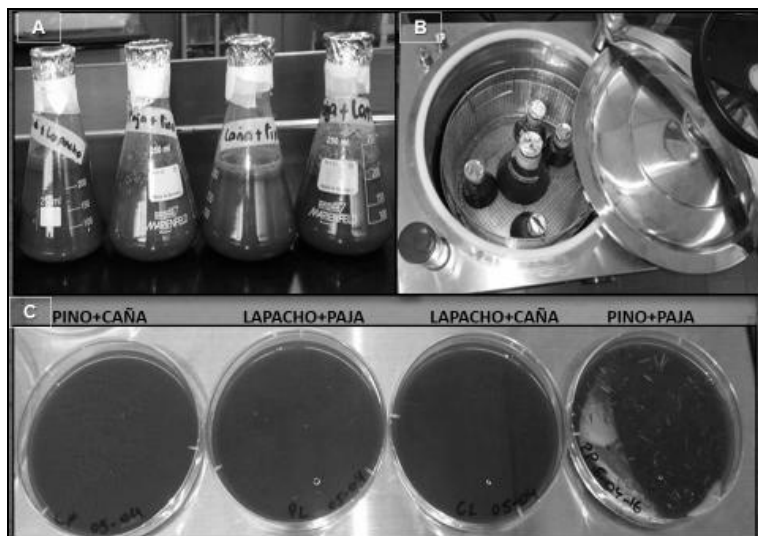


Fig. 1: A. Medios enriquecidos, B. Autoclavado de los medios, C. Medios sólidos enriquecidos.

Tabla 1. Composición de los medios agarizados suplementados con residuos agroindustriales.

Sustratos	Bagazo de caña	Paja de trigo	Aserrín de pino	Aserrín de lapacho
PP	-	20 gr.L <sup>-1</sup>	20 gr. L <sup>-1</sup>	-
PC	20 gr.L <sup>-1</sup>	-	20 gr. L <sup>-1</sup>	-
LP	-	20 gr. L <sup>-1</sup>	-	20 gr. L <sup>-1</sup>
LC	20 gr. L <sup>-1</sup>	-	-	20 gr. L <sup>-1</sup>

### Análisis de la velocidad de crecimiento

Se seleccionaron 3 aislamientos: *Trametes versicolor* (FACEN Cult. 01), *Pleurotus ostreatus* (FACEN Cult. 11) y *Schizophyllum commune* (FACEN Cult. 13), correspondientes a la categoría de hongos de pudrición blanca con reconocidas aplicaciones biotecnológicas. Una sección de 0,4 cm de diámetro de cada una de las cepas mencionadas fue inoculada en los diferentes medios de cultivo, siempre en el centro de la placa. Las muestras fueron incubadas a 28°C en una estufa bacteriológica modelo DHF-9162B (Heating Incubator) durante un periodo comprendido entre 10-24 días.

El crecimiento de los hongos fue estimado en base al diámetro de

crecimiento de la colonia fúngica. Se midieron los diámetros cada 24 horas, en diferentes ángulos, tomando como intersección el centro del inóculo. Se realizaron las medidas hasta cubrir el diámetro máximo de placa de Petri (9 cm. de Ø). Se calculó la velocidad de crecimiento y los valores obtenidos fueron expresados en cm.día<sup>-1</sup>, según la siguiente expresión matemática:

$$VC = \frac{\varnothing \text{ (cm)}}{t \text{ (días)}}$$

Dónde: VC es la velocidad de crecimiento; Ø el diámetro de crecimiento y t el tiempo.

La velocidad promedio se calculó utilizando los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento (Martínez

*et al.*, 2015). El estudio de los resultados se realizó mediante un análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal Wallis). Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

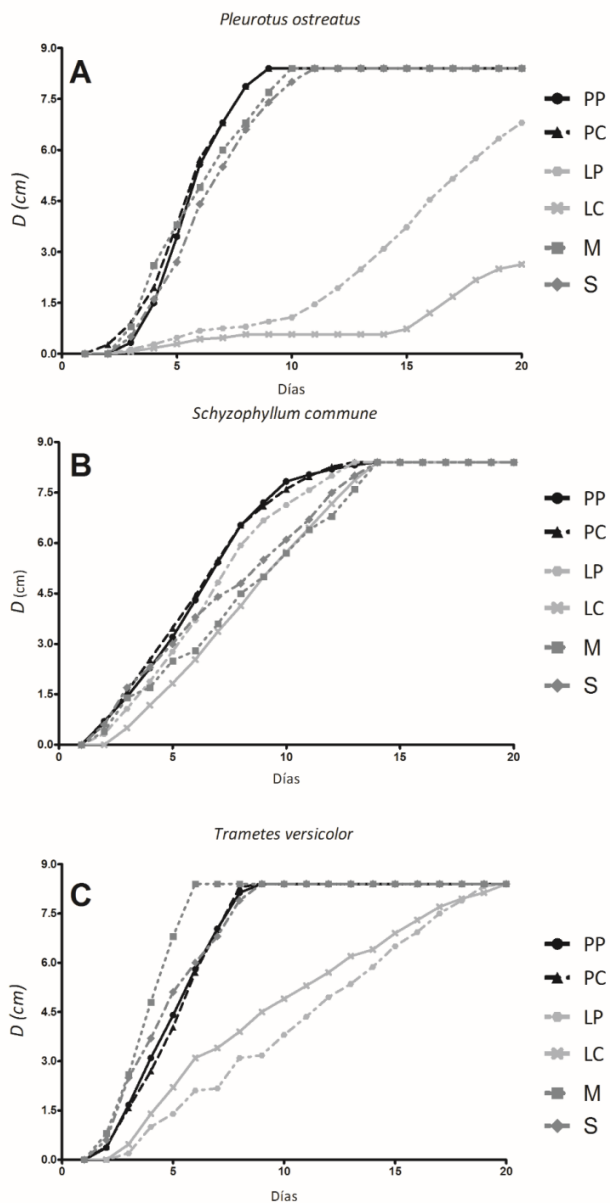
Las cepas axénicas fueron aisladas con éxito de *Trametes versicolor*, *Ganoderma australe*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Schizophyllum commune* e ingresadas al Cepario de FACEN (FACEN Cult.), bajo los rótulos: FACEN Cult. 01, FACEN Cult. 05, FACEN Cult. 08, FACEN Cult. 11, y FACEN Cult. 13 respectivamente.

Para el ensayo de crecimiento en medios de cultivo enriquecidos fueron seleccionadas 3 de las 5 cepas de hongos degradadores basadas en referencias bibliográficas, que las mencionan como cepas de elevado potencial biotecnológico. Las 3 cepas seleccionadas fueron: *Trametes versicolor* FACEN Cult. 01 (Amaral *et al.*, 2004; Krastanov, 2013), *Schizophyllum commune* FACEN Cult. 13 (Tang *et al.*, 2011; Li y Jia *et al.*, 2008) y *Pleurotus ostreatus* FACEN Cult. 11 (Yildirim, 2012; Asgher, 2012). *Pleurotus ostreatus* es mundialmente conocido como “Gírgola” siendo uno de los hongos comestibles de mayor cultivo (Ruilova y Hernández, 2014).

Las curvas de crecimiento micelial de las colonias de las cepas estudiadas sobre los diferentes medios (Fig. 2), mostraron un buen ajuste al modelo característico del

desarrollo microbiano (Madigan *et al.*, 2004), en donde se evidencia una primera fase de latencia que estaría asociada a la adaptación al medio y la síntesis de enzimas que permiten la degradación y utilización de los nutrientes del medio, una segunda fase exponencial en la que se obtiene la velocidad máxima de crecimiento y una tercera fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye. Cabe destacar que en nuestro trabajo el límite físico de la placa de Petri impide determinar si la cepa ha llegado a su estado estacionario. Este tipo de cinética de crecimiento está de acuerdo con Sarikaya y Ladisch (1997).

A partir de las cinéticas de crecimiento podemos determinar que en los medios agarizados, enriquecidos con residuos agroindustriales compuestos por aserrín de lapacho, la cepa de *P. ostreatus* no logró alcanzar el máximo de crecimiento en los 20 días de cultivo, además, se observó una fase de latencia de 10 días en el medio LC y 15 días para LP (Fig. 1A); mientras que en los medios con aserrín de pino y los medios control logró colonizar la placa al día 10. En todos los medios, la cepa de *S. commune* logró colonizar la caja totalmente a partir de los 14 días de cultivo (Fig. 1B), y para la cepa de *T. versicolor* se observó una fase de adaptación corta, de menos de 5 días en los medios con lapacho, pero logró colonizar la caja de Petri recién a los 20 días de cultivo, mientras que en los restantes medios logró alcanzar el máximo crecimiento al día 9 de cultivo. (Fig. 1C).



**Fig. 2:** Desarrollo micelial de las cepas, **A.** *Pleurotus ostreatus*, **B.** *Schizophyllum commune*, **C.** *Trametes versicolor*, en los siguientes medios de cultivo sólido en placa: PP (Aserrín de pino + Paja de trigo), PC (Aserrín de pino + Bagazo de caña), LP (Aserrín de lapacho + Paja de trigo), LC (Aserrín de lapacho + Bagazo de caña), M (Malta), S (Sabouraud).

En base a la fase de crecimiento exponencial se calculó la velocidad máxima de crecimiento obtenida por las cepas. Para *T. versicolor* el medio enriquecido con aserrín de pino fue el más eficiente tanto con el suplemento de paja de trigo ( $0,93 \pm 0,10$  cm. día<sup>-1</sup>) como con el bagazo de caña ( $0,85 \pm 0,18$  cm. día<sup>-1</sup>), frente a los tratamientos con aserrín de lapacho en donde se evidenció un efecto inhibitor de crecimiento,  $0,39$  cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,06$  con paja y  $0,46$  cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,04$  con caña. (Tabla 2). El medio sintético control Malta fue el mejor ( $1,21 \pm 0,18$ ).

El hongo comestible *P. ostreatus* creció significativamente mejor en el medio con aserrín de pino suplementado con paja de trigo ( $0,81$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,12$ ) o con bagazo de

caña ( $0,77$  cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,09$ ), en comparación con los medios suplementados con aserrín de lapacho, tanto con paja de trigo ( $0,20$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,09$ ) como con bagazo de caña ( $0,09$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,03$ ) (Tabla 2).

*S. commune* creció con velocidades entre  $0,51$  cm. día<sup>-1</sup> y  $0,71$  cm. día<sup>-1</sup> en los distintos tratamientos. En los medios con aserrín de pino fue donde se obtuvieron los más altos valores de velocidad de crecimiento:  $0,66$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,14$  con paja y  $0,71$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,09$  con bagazo de caña, pero sin mostrar diferencias significativas en el medio con aserrín de lapacho y paja de trigo ( $0,63$ cm. día<sup>-1</sup>  $\pm 0,12$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Velocidad de crecimiento (cm. día<sup>-1</sup>) de las cepas FACENcult. 01, 11 y 13 en los diferentes medios. Para cada cepa las medias con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Sustratos	Cepas		
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Pino/Paja	$0,93 \pm 0,10^b$	$0,66 \pm 0,14^a$	$0,81 \pm 0,12^b$
Pino/Caña	$0,85 \pm 0,18^b$	$0,71 \pm 0,09^a$	$0,77 \pm 0,09^b$
Lapacho/Paja	$0,39 \pm 0,06^c$	$0,63 \pm 0,12^{a,b}$	$0,20 \pm 0,09^a$
Lapacho/Caña	$0,46 \pm 0,04^c$	$0,51 \pm 0,11^b$	$0,09 \pm 0,03^a$
Malta	$1,21 \pm 0,18^a$	$0,53 \pm 0,11^b$	$0,80 \pm 0,08^b$
Sabouraud	$0,95 \pm 0,06^b$	$0,61 \pm 0,09^{a,b}$	$0,71 \pm 0,15^b$

El aserrín de lapacho utilizado como enriquecedor del medio de cultivo, posee un metabolito secundario mayoritario conocido como lapachol, que ha sido estudiado en otras especies de Bignoniaceas, el cual se ha logrado demostrar que posee propiedades insecticidas, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias, contra úlceras y gastritis, entre otras (Velásquez *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de cinco especies de hongos bacidiomicetos, *Trametes versicolor*, *Ganoderma australe*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* y *Schizophyllum commune*, de las mismas se obtuvieron cepas axénicas, las cuales fueron ingresadas al Cepario de FACEN (FACEN Cult.).

En la evaluación de los medios de cultivos enriquecidos con materiales lignocelulósicos, las combinaciones de aserrín de Pino con Bagazo de Caña y con Paja de trigo constituyen una buena alternativa para el crecimiento de los hongos seleccionados, ya que se obtuvieron valores similares o incluso mayores de velocidad de crecimiento que los medios comerciales semi-sintéticos utilizados; por otro lado, la combinación de aserrín de Lapacho con los residuos agroindustriales mostró una inhibición en el crecimiento de las cepas estudiadas excepto para *S. commune* el cual tuvo un crecimiento favorable en los medios enriquecidos con dicho sustrato.

La actividad inhibitoria que se observó en dos de las cepas trabajadas amerita profundizar con el estudio de los compuestos biológicamente activos y su posible aplicación como fungicida natural. De la misma manera resulta interesante el aislamiento de *S. commune* FACEN Cult. 11 que logró crecer favorablemente sobre este sustrato suponiendo que debe poseer una batería enzimática adaptada para degradar este compuesto naftoquinónico (lapachol). Son estas enzimas degradadoras de compuestos fenólicos las de interés biotecnológico para su aplicación.

Este trabajo supone el primer paso para la formación de un cepario de organismos fúngicos para el Paraguay. La conservación de estas y futuras colecciones es necesaria para realizar investigaciones, actividades de divulgación, intercambios de especímenes con instituciones nacionales e internacionales, además de ser un reservorio de la micobiota del Paraguay con potenciales aplicaciones en

alimentación, biotecnología, medicina, entre otras.

La bioprospección de hongos para su utilización en biotecnología, implica conocer sus necesidades nutritivas para el buen crecimiento de las mismas. Este trabajo plantea la posibilidad de utilizar residuos de la industria agraria y la maderera para el cultivo de hongos de interés biotecnológico, disminuyendo los problemas ambientales que suponen los residuos en la actualidad.

## REFERENCIAS

- Amaral, P.F.F.; Fernandes, D.L.A.; Tavares, A.P.M.; Xavier, A.B.M.R.; Cammarota, M.C.; Coutinho, J.A.P.; Coelho M.A.Z. 2004. Decolorization of dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. *Environmental Technology* 25: 1313-1320.
- Asgher, M.; Jamil, F.; Iqbar, H.M.N. 2012. Bioremediation potencial of mixed white rot culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Coriolus versicolor* IBL-04 for textile industry wastewater. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. S1:007
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Grassi, E.; Scodeller, P.; Filieil, N.; Carballo, R.; Levin, L. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 635–643.

- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology.13:125-135.
- Hammel, K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. Driven by nature: Plant litter quality and decomposition. Cab internacional. Ed. G. Cadish y K.E. Giller. 33-45.
- Krastanov, A.; Koleva, R.; Alexieva, Z.; Stoilova, I. 2013. Decolorization of industrial dyes by immobilized mycelia of *Trametes versicolor*. Biotechnology & Biotechnological Equipment 27: 4263-4268.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2004. "BROCK Biología de los microorganismos"; 10° edición; Pearson Educación; Madrid. 1096p.
- Nordén, B.; Ryberg, M.; Gotmarck, F.; Olausson, B. 2004. Relative importance of coarse and fine woody debris for the diversity of wood-inhabiting fungi in temperate broadleaf forests. *Biological Conservation* 117:1-10.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:20-33.
- Robledo, G.; Urcelay, C. 2009. Hongos de la madera en árboles nativos del centro de Argentina. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 224p.
- Ruilova, M.B.; Hernández, A. 2014. Evaluación de residuos agrícolas para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 48: 54-59.
- Sarikaya, A.; Ladisch, M. 1997. An unstructured mathematical model for growth of *Pleurotus ostreatus* on lignocellulosic material in solid-state fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (1): 71-85.
- Tang, W.; Jia, R.; Zhang, D. 2011. Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Schizophyllum* sp. F17 in a novel system. *Desalination* 265: 1-3.
- Velásquez, J.; Toro, M.E.; Rojas, L.; Encinas, O. 2006. Actividad antifúngica in vitro de los extractivos naturales de especies latifoliadas de la Guayana Venezolana. *Madera y Bosques* 12: 51-61.
- Li, X.; Jia, R. 2008. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-*Schizophyllum* sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. *Bioresource Technology* 99: 6885-6892.
- Yildirim, N.; Tanyol, M.; Dere, T.; Cumurcu, A.; Yildiz, A. 2012. The investigation on physic-chemical parameters of the textile effluents after treatment by white rot fungus *Pleurotus djamor*. *New Biotechnology* 29: S184.
- Wright, A.; Albertó, E. 2002. Hongos Guía de la Región Pampeana. Hongos con laminillas. Editorial LOLA. 1a Edición. Buenos Aires. 279p.

# ***Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (Agaricaceae-Basidiomycota), hongo de interés medicinal y gastronómico, nueva cita para el Paraguay**

Campi, M.<sup>1</sup>; Miranda, B.<sup>2</sup>; Maubet, Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área Micología, Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción  
E mail del autor: geraldinecampi@gmail.com

---

***Coprinus comatus* (Agaricaceae-Basidiomycota), hongo de interés gastronómico y medicinal, nueva cita para el Paraguay.** Se cita a *Coprinus comatus* como nuevo registro para el Paraguay. Las características morfológicas distintivas de la especie son la forma del basidioma, láminas deliquescentes, las escamas pronunciadas del píleo y las esporas oscuras con poro germinativo. Se proporcionan datos sobre las características morfológicas de la especie, su distribución, ecología y una discusión en torno a su taxonomía. Además se ilustran los caracteres microscópicos distintivos. Se anexan fotografías del basidioma en fresco y de las estructuras microscópicas como basidios y basidiosporas.

**Palabras clave:** diversidad de hongos, micobiota, Tati Yupi, taxonomía.

***Coprinus comatus* (Agaricaceae-Basidiomycota), mushroom of gastronomic and medicinal interest, new record from Paraguay.** *Coprinus comatus* is cited as new record from Paraguay. The distinctive morphological characteristics of the species are the shape of the basidiome, deliquescent gills, pileal scales and dark spores with germinal pore. Data on the morphological characteristics of the species, its distribution, ecology and a discussion about its taxonomy are provided, additionally distinctive microscopic characters are illustrated. The photographs of fresh basidiome and microscopical structures like basidia and basidiospores are also presented.

**Keywords:** fungal diversity, mycobiota, Tati Yupi, taxonomy

---

## **INTRODUCCIÓN**

El género *Coprinus* Pers. se caracteriza por poseer basidiomas con píleo cónico o campanulado, plicado estriado, cubierto por escamas flocosas firmemente sujetas a la superficie, láminas anexas, adnatas y deliquescentes. Las esporas son oscuras con poro germinativo, lisas a raramente rugosas o equinuladas. (Batista y Putzke, 1989). El desarrollo secuencial de los basidios y esporas son del tipo “inaequihymeniiferous”, caracterizado por cuatro generaciones de basidios de tamaños distintos a fin de facilitar la liberación de esporas en el himenio. Este

*Steviana*, Vol. 8(2), 2016 pp. 68–74.  
Original recibido el 6 de julio de 2016.  
Aceptado el 29 de noviembre de 2016.

patrón de desarrollo es único para *Coprinus*, pero no se encuentra dentro de todas las secciones (Buller, 1909). *Coprinus* es considerado un grupo polifilético (Hopple y Vilgalys, 1999; Pawlik *et al.*, 2015) y ha sido bien estudiado mundialmente, presenta distribución cosmopolita (Moreno, 1976; Orton, 1957; Bi *et al.*, 1993, Cheesman y Gibbs, 1908).

*Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. y *Coprinus sterquilinus* (Fr.) Fr. forman un clado dentro de Agaricaceae Fr. junto al género *Agaricus* L. y otros grupos que incluyen varios géneros lepiotáceos (Redhead *et al.*, 2001). *C. comatus* se



caracteriza por presentar píleo cónico al comienzo del desarrollo, abriéndose desde el margen. En la última etapa de maduración las hifas que forman las laminillas del basidioma se licuan debido al carácter autolítico de la trama himenoforal y producen tinta de color negruzco característico de la especie.

Con el fin de contribuir con el registro de la micobiota del Paraguay se cita por primera vez la especie *Coprinus comatus* describiendo sus caracteres macroscópicos y microscópicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó un ejemplar colectado en el Refugio Biológico Tati Yupi, Departamento Alto Paraná (25°21'59.5"S - 54°34'47.2"W). El Refugio Biológico Tati Yupi (RBTY) se encuentra localizado en el Departamento Alto Paraná, asentado en pleno Bosque Atlántico (BAAPA). La vegetación predominante en la ecorregión es de bosque subtropical semi-decídúo; se caracteriza por presentar clima subtropical (Placi *et al.*, 2003).

Las descripciones macroscópicas se basaron en material fresco, siguiendo los lineamientos propuestos por Wright y Albertó (2002) y Lodge *et al.* (2004). Las características microscópicas se describieron a partir de cortes del material montado en KOH al 5%, y teñido con floxina al 1%, rojo Congo Amoniacal, reactivo de Melzer y analizados en microscopio óptico (Wright y Albertó, 2002).

Se utilizaron las siguientes notaciones al realizar las medidas de las basidiosporas: Q= cociente entre la longitud y el ancho de las basidiosporas, indicado como rango de variación; n=

número de esporas medidas, N= número de basidiomas. (Niveiro *et al.*, 2012). El ejemplar estudiado fue depositado en el herbario FACEN de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Coprinus comatus* (O.F: Müll.) Pers., *Tent. disp. Meth. Fung.* (Lipsiae): 62, 1797  
= *Agaricus comatus* O.F. Müll. 1780

Basidioma estipitado, anual, de hasta 150 mm de longitud. Píleo de 24 -45 mm de diám. x 40 -120 mm de longitud, elipsoidal a ovoide cuando inmaduro, fusionado con el pie por el margen cuando joven cubriendo hasta 2/3 del mismo, expandiéndose y licuándose a medida que madura el basidioma, cubierto en el ápice por escamas a modo de disco de coloración parda. Cutícula blanca, fibrilada, con escamas amplias verticales, escuarrosas, blanquecinas cuando joven, castañas cuando maduran. Himenio laminar, laminas apretadas blanquecinas a grisáceas cuando joven, delicuescentes y de coloración negruzca en la madurez. Estípite central, hueco, de 50 mm de longitud x 15 mm de diám., ensanchándose hacia la base, blanquecino, cubierto de escamas concoloras cuando joven oscureciéndose al madurar. Rizomorfos basales presentes en forma de fibras blanquecinas. Anillo quebradizo, concoloro al píleo. Contexto grueso en la porción apical del píleo adelgazando hacia los márgenes, de color blanquecino. Basidiosporas 10-11 x 7-9  $\mu\text{m}$  Q= 1,3; n= 30; N=1, elipsoidales a ovadas, con poro apical germinativo, de paredes simples, lisas, de color castaño oscuras. Basidios de

22-32 x 10-14  $\mu\text{m}$ , tetrasporados, fusiformes. Pileipellis formada por células cilíndricas de 12-29 x 9-18  $\mu\text{m}$ . Estipitipellis conformado por hifas de 5-16  $\mu\text{m}$  de diám., delgadas, con pared gruesa, lisas, con septos fibulados.

Writhg y Albertó (2002) afirman que el *C. comatus* es reconocible por la forma característica del sombrero, por la que se conoce como “apaga velas”, Moreno y Majón (2011) comentan que es muy fácil identificar por sus basidiocarpos blanquecinos de gran porte y delicuescencia de las láminas, también aclaran que *C. comatus* es muy próximo a *C. sterquilinus*, pero éste tiene un hábitat coprófito (estiércol), los basidiomas son de menor tamaño y las esporas de 17-23 x 10-13  $\mu\text{m}$  de diám., García y Sánchez (2009) citan como especie próxima a *Coprinus atramentarius* (Bull.) Fr. también conocido como coprino entintado, se diferencia por su hábito gregario mientras que el *C. comatus* crece en forma aislada o en pequeños grupos.

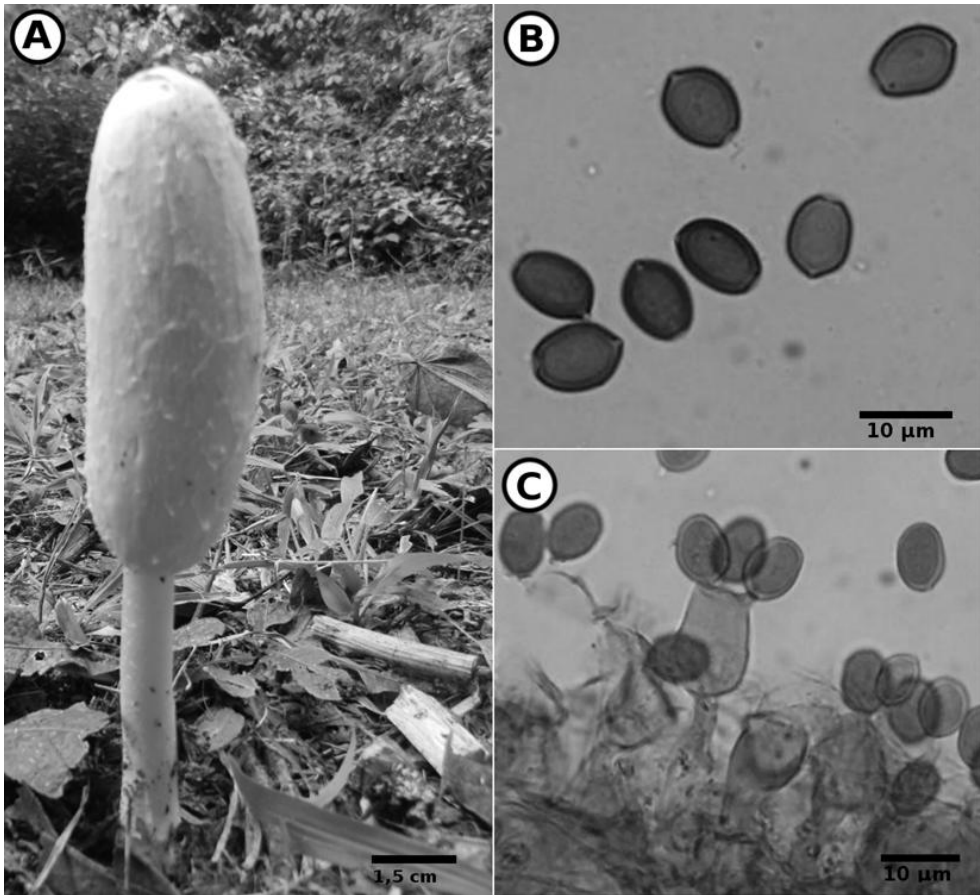
En cuanto a las propiedades medicinales Gu y Leonard (2005) reportan actividad antitumoral del extracto del *C. comatus in vitro*. Rogers (2011) comenta que en China es conocido como “Maotouguisan” y se utiliza como digestivo y para el tratamiento de hemorroides, también menciona las propiedades antibióticas de los especímenes jóvenes. Li *et al.* (2010) cita

propiedades antioxidantes del extracto alcohólico y acuoso del pie y píleo. Otra propiedad interesante es la de actuar como insecticida de nematodos (Luo *et al.*, 2004).

**Hábitat:** Nitrófilo, saprófito, solitario o en pequeños grupos. En primavera y otoño en zonas ruderales.

**Material Estudiado:** PARAGUAY; Departamento Alto Paraná; Ciudad Hernandarias; Refugio Biológico Tati Yupi; 25°21'59.5"S 54°34'47.2"W; 10-IV-2015; Campi, M. FACEN 3382.

**Distribución:** *C. comatus* es considerado una especie cosmopolita. Para América del Sur se cita en Colombia para los departamentos de Antioquía y Tolima (Franco-Molano *et al.*, 2010) y; en Chile para la Región de Los Ríos y Magallanes (Valenzuela *et al.*, 1996; Furci, 2013). En Argentina se registra para las provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, Entre Ríos, Santa Fé, Córdoba, Buenos Aires, Mendoza, Neuquén, Río Negro y Jujuy (Bruno *et al.*, 1970; Farr, 1973; Horak, 1967; Raithlhuber, 2004; Ramadori, 1985, 1992; Singer, 1953, 1954, 1969; Spegazzini 1880, 1887, 1889, 1909, 1919, 1926a, 1926b; Writhg y Albertó, 2002; Carrillo, 2003) y en Brasil, se cita para el estado de Rio de Janeiro (Capelari *et al.*, 2015). En Paraguay se encuentra en el Departamento Alto Paraná, siendo el primer registro para el país.



**Fig. 1:** *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers., **A.** Basidioma, **B.** Basidiosporas con poro germinativo, montado en KOH, **C.** Basidio tetraspórico y basidiosporas teñidas con Rojo Congo.

## CONCLUSIONES

Las características observadas en los especímenes estudiados y comparadas con las descritas por los autores mencionados tales como las láminas delicuescentes, escamas marcadas en el píleo y las esporas oscuras con poro germinativo, concluimos que el material estudiado de Paraguay corresponde al *C. comatus*. La especie es citada por primera vez para el Paraguay en el Departamento Alto Paraná, constituyendo así el primer registro para el país.

## REFERENCIAS

- Batista, A.; Putzke, J. 1989. Familias e géneros de fungos Agaricales (Cogumelos) no Río Grande do Sul. Livraria Editora da FISC. 188p.
- Bi, Z.; Zheng, G.; Taihui, L. 1993. The Macrofungus Flora of China's Guangdong Province. Hong Kong, China. Chinese University Press. 389-392p.
- Bruno, L.; Frías, L.; Rovetta, G.; Veltri, L. 1970. Las especies en Buenos Aires del

- Género *Coprinus* (Basidiomycetes, Agaricales). *Kibernetes* 1: 1-26.
- Buller, A.H.R. 1909. *Researches on Fungi*, Vol. I., Longman's Green, London.
- Campi, M.; De Madriagnac, B.; Flecha, A.; Niveiro, N. 2015. El género *Leuocoprinus* Pat. (*Agaricaceae-Agaricomycetes*) en el norte de Argentina y Paraguay. *IHERINGIA*, Serie Botánica. 70(2): 309 – 320.
- Capelari, M.; Cortez, V.; Neves, M.; Baseia, I.; Wartchow, F.; Menolli Júnior, N.; Karstedt, F.; Oliveira, J.; Urrea-Valencia, S. 2015. Agaricales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB125508>.
- Carrillo, L. 2003. Macromicetos de Jujuy. Jujuy, Argentina. Universidad Nacional de Jujuy. 36-37p.
- Cheesman, N.; Gibbs, T. 1909. Contribution to the Mycology of South Africa. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 38: 408–417 p
- Farr, M.L. 1973. An Annotated list of Spegazzini's Fungus Taxa. *Biblioth Mycology*. 35(2): 1-1620.
- Flecha, A.; De Madriagnac, B.; Campi, M.; Ortellado, A. 2013. Nuevo Registro de *Leucoagaricus lilaceus* Singer (*Agaricomycetes - Agaricaceae*) para Paraguay. *Reportes Científicos* 4(2): 100-110.
- Franco-Molano, A; Corrales, A.; Vasco-Palacio, A. 2010. Macrohongos de Colombia II. Listado de especies de los órdenes Agaricales, Boletales, Cantharellales y Russulales. (*Agaricomycetes, Basidiomycota*). *Actualidades Biológicas*. 32 (92) 89-114.
- Furci, G. 2013. *Guía de Campo, Hongos de Chile*. Santiago de Chile, Chile. Fundación Fungi. 255p.
- García, A; Sánchez, J. 2009. *Setas de la Península Ibérica y de Europa*. León, España. Editorial Everest, S.A. 837p.
- Hopple, J; Vilgalys, R. 1999. Phylogenetic Relationships in the Mushroom Genus *Coprinus* and Dark-Spored Allies Based on Sequence Data from the Nuclear Gene Coding for the Large Ribosomal Subunit RNA: Divergent Domains, Outgroups, and Monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(1): 1-19.
- Horak, E. 1967. *Fungi Austroamerici IV. Revisión de los Hongos Superiores de Tierra del Fuego o Patagonia en el Herbario de C. Spegazzini en La Plata*. *Darwiniana* 14(2-3): 355-385.
- Li, B; Lu, F.; Suo, X. 2010. Antioxidant Properties of Cap and Stipe from *Coprinus comatus*. *Molecules*.15 (1): 1473-1486.
- Lodge, D.; Ammirati, J.; O'Dell, T.; Mueller, G. 2004. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Londres, Reino Unido. Academic Press. 127-158p.
- Luo, H.; Mo, M.; Huang, X.; Li, X., Zhang, K. 2004. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode. *Mycologia*. 96(6):1218-1225.
- Moreno, G. 1976. Contribución al estudio micológico de Andalucía (Agaricales nuevos o raros para España peninsular). *Acta Botanica Malacitana*. 2(1): 5-20.
- Moreno, G; Manjón, J. 2010. *Guía de Hongos de la Península Ibérica*. Barcelona, España. Editorial Omega. 1417p.

- Niveiro, N.; Popoff, O.; Albertó, E. 2012. Presence of *Leucocoprinus cretaceus* and *L. fragilissimus* in Argentina. *Mycotaxon*. 121(1) 265-273.
- Orton, P. 1957. Notes on British Agarics 1-5 (observations on the genus *Coprinus*). *Transactions of the British Mycological Society*. 40(2): 263-276.
- Pawlik, A.; Malinowska, A.; Siwulski, M.; Frac, M.; Rogalski, J.; Janusz, G. 2015. Determination of biodiversity of *Coprinus comatus* using genotyping and metabolic profiling tools. *Acta biochimica Polonica*. 62(4): 683-689.
- Plací, G.; Dietz, L.; Bitetti, M. 2003. Una visión de biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un paisaje para la conservación de la biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación. Washington, Estados Unidos: World Wildlife Found. 199-201p.
- Raithelhuber, J. 2004. Nueva Flora Micológica Argentina. Stuttgart, Mycosur
- Ramadori, E.A. 1985. Flora micológica de Bahía Blanca. *Metrodiana* 11(1): 27-28.
- Ramadori, E.A. 1992. Fungos Flora de Sierra de la Ventana. *Metrodiana* 20(3): 111-138.
- Redhead, S.; Vilgalys, R.; Moncalvo, J.; Johnson, J.; Hopple, J. 2001. *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon*. 50(1): 203-224.
- Reyes, R.; López, L.; Kumakura, K.; Kalaw, S.; Kikukawa, T.; Eguchi, F. 2009. *Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines. *Journal of Agricultural Technology*. 5(2): 299-316.
- Rogers, R. 2011. *The Fungal Pharmacy*. Berkeley, Estados Unidos. North Atlantic Books. 591p.
- Singer, R. 1953. Type studies on Basidiomycetes IV. *Lilloa* 26:57-159.
- Singer, R. 1954. Agaricales von Nahuel Huapi. *Sidowia* 8:100-157.
- Singer, R. 1969. *Mycoflora australis*. Beih. Nova Hedwigia 29:1-405.
- Spegazzini, C.L. 1880. Fungi Argentini. Pugillus 2. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 9(6): 278-285.
- Spegazzini, C.L. 1883a. Fungi Guaranitici Pugillus I. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 16(5): 242-248.
- Spegazzini, C.L. 1887. Fungi Patagonici. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Córdoba* 11(1): 5-64
- Spegazzini, C.L. 1883b. Fungi Guaranitici. Pugillus I. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 16(6): 272-284.
- Spegazzini, C.L. 1899. *Mycetes Argentinenses*. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 47(6): 262-279.
- Spegazzini, C.L. 1909. *Mycetes Argentinenses*. Series 4. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires Ser. 3* 19(12): 257-458
- Spegazzini, C.L. 1919. Los Hongos del Tucumán. *Primera Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencias Naturales de Tucumán* 254-274.
- Spegazzini, C.L. 1926. Observaciones y adiciones a la micología Argentina. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Córdoba* 28: 267-406.
- Spegazzini, C.L. 1926. Contribución al conocimiento de la flora micológica de las Sierras de Córdoba. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Córdoba* 29 (2-3): 113-190
- Valenzuela, E.; Ramírez, C.; Moreno, G. 1996. Agaricales más comunes

***Campi, M. et al. Coprinus comatus hongo de interés medicinal y gastronómico***

recolectados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile. Bosque. 17(1): 51-63.

Wright, J.; Albertó, E. 2002. Hongos. Guía de la Región Pampeana, Tomo I. Hongos con laminillas. Buenos Aires, Argentina. Editorial L.O.L.A. 279 p.

# Morfo-anatomía foliar y caulinar de *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae)

Pereira Sühsner, C.D.<sup>1</sup>; Ferrucci, M.S.<sup>2</sup>; Honfi, A.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales. Dpto. Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción

<sup>2</sup>Instituto de Botánica del Nordeste, nodo Posadas (UNNE-CONICET), Casilla de Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina

<sup>3</sup>Laboratorio de Citogenética Vegetal, Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal, Instituto de Biología Subtropical (UNaM-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones, Rivadavia 2370, 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

E mail del autor: claudinha\_7@hotmail.com

---

**Morfo-anatomía foliar y caulinar de *Passiflora caerulea* (Passifloraceae).** Se estudió la morfo-anatomía foliar y caulinar de *P. caerulea* con el objeto de identificar caracteres que permitan reconocer a la especie. El material vegetal fue colectado en el Distrito Félix Pérez Cardozo, Dpto. Guairá. Se realizaron observaciones directas y al microscopio estereoscópico de las partes vegetativas y reproductivas para la caracterización botánica. Los cortes transversales foliares y caulinares se realizaron con micrótopo rotatorio manual y se aplicó tinción directa con safranina (1%), posteriormente se montaron en Bálsamo de Canadá. *P. caerulea* es una liana con tallo pentagonal, zarcillos con torsiones descomprimidas, hojas simples, alternas, tri- a pentalobada; peciolo con glándulas estipitadas, flores solitarias y axilares. Los caracteres anatómicos que la distinguen están dados por las células epidérmicas de ambas superficies con paredes celulares onduladas, estomas y aparatos estomáticos anomocíticos y parasíticos restringidos a la superficie abaxial, mesófilo dorsiventral, las drusas se localizan en el parénquima de la vena media y en la vaina de los haces vasculares, medula hueca, entre otros. Los detalles anatómicos permiten distinguir a *P. caerulea*.

**Palabras clave:** hoja, morfo-anatomía, *Passiflora*, tallo

**Leaf and stem morpho-anatomy of *Passiflora caerulea* (Passifloraceae).** We studied the leaf and stem morphoanatomy of *P. caerulea* order to identify species specific characters. The plant material was collected in the Felix Perez Cardozo District, Department of Guairá, Paraguay. Direct and stereoscopic microscope observations of the vegetative and reproductive parts were carried out for the botanical characterization. The leaf and stem cross sections were performed with a manual rotary microtome and direct staining with safranin (1%), was applied. *P. caerulea* is a liana with pentangular stem, tendrils with decompressed twisting; simple leaves, alternate, tri- to penta lobed; petiole with stipitate glands; solitary and axillary flowers. The anatomical characteristics found were: adaxial and abaxial epidermis with wavy edge, anomocytic and parasitic stomata type in the abaxial face; bifacial mesophyll with dorsiventral symmetry; drusen located at the middle vein parenchyma and at the sheath of vascular hooks; hollow medulla, and others. Anatomical details allow ti distinguish *P. caerulea*.

**Keywords:** leaf, morpho-anatomy, *Passiflora*, stem

---

## INTRODUCCIÓN

*Passiflora* L. cuenta con más de 500 especies y es uno de los géneros más importantes de la familia Passifloraceae por sus múltiples aplicaciones (Killip, 1938; Baillon, 1886; Ulmer & MacDougal, 2004).

*Passiflora caerulea* L. es conocida vernáculamente como “mburucuja” o “mburucuya”. Habita en bordes de bosques, montes y pastizales, creciendo generalmente en asociación con acacias y prosopis (Deginani, 2001; Pereira Sühsner, 2015).

En Paraguay, *P. caerulea* se cita para los Departamentos: Alto Paraguay, Boquerón, Caaguazú, Central, Cordillera, Guairá, Misiones, Ñeembucú, Paraguari, Presidente Hayes (Deginani, 2001; Zuloaga, 2009).

Este trabajo tiene como objetivo de estudiar la morfo - anatomía foliar y caular de *P. caerulea* para identificar caracteres de valor diagnóstico y contribuir con la caracterización morfo-anatómica del género *Passiflora*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colecta del material*

Los ejemplares fueron coleccionados en PARAGUAY, Departamento Guairá, Distrito Félix Pérez Cardozo, específicamente en las localidades Potrero Melgarejo (25°44'28''S - 56°31'38''W), Cerrito (25°46'10''S - 56°31'50''W), Cocuere Guasu (25°46'11''S - 56°30'17''W), Estación Costa (25°44'17''S - 56°31'8''W) y Área Urbana (25°44'44''S - 56°31'20''W), cuyos ejemplares se encuentran depositados en el herbario FACEN.

Fitogeográficamente, Cabrera y Willink (1980), consideran al Distrito Félix Pérez Cardozo como parte de la Provincia Paranense, Dominio Amazónico de la Región Biogeográfica Neotropical de América del Sur, que se caracteriza por la presencia de serranías que van elevándose hacia el este y la vegetación predominante es la selva subtropical o selva Paranense.

Para estudios anatómicos se tomaron muestras de ejemplares vivos (hoja, tallo, frutos, semillas) fijados y conservados en FAA (Formol - Acido acético - Alcohol; 9:5:5).

### *Identificación taxonómica*

La especie fue identificada a través de claves dicotómicas, de acuerdo con la propuesta taxonómica del género *Passiflora* L. de Killip (1938) y revisiones posteriores.

### *Caracterización morfológica*

Se realizaron observaciones directas y al fotomicroscopio estereoscópico binocular, de los órganos vegetativos y reproductivos.

### *Caracterización anatómica*

Los cortes transversales foliares y caulinares se realizaron con micrótopo rotatorio manual con 16 micrones de espesor y se aplicó tinción directa con safranina (1%) y, posteriormente se montaron en Bálsamo de Canadá (D'Ambrogio, 1986). Los preparados histológicos están depositados en el Laboratorio de Recursos Vegetales (LAREV) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción con número seriado L7/2015, CT Hoja, VS Hoja, CT Pecíolo, CT Tallo, CL Tallo.



Para determinar la naturaleza de los cristales se colocaron unas gotas de HCl 1N sobre cortes transversales de hoja, peciolo y tallo, y luego de unos minutos se observó en un microscopio óptico BH2, marca Olympus. La disolución de los cristales indica que están constituidos por Carbonato de Calcio, caso contrario son de Oxalato de Calcio.

### **Fotografías**

Las fotomicrografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

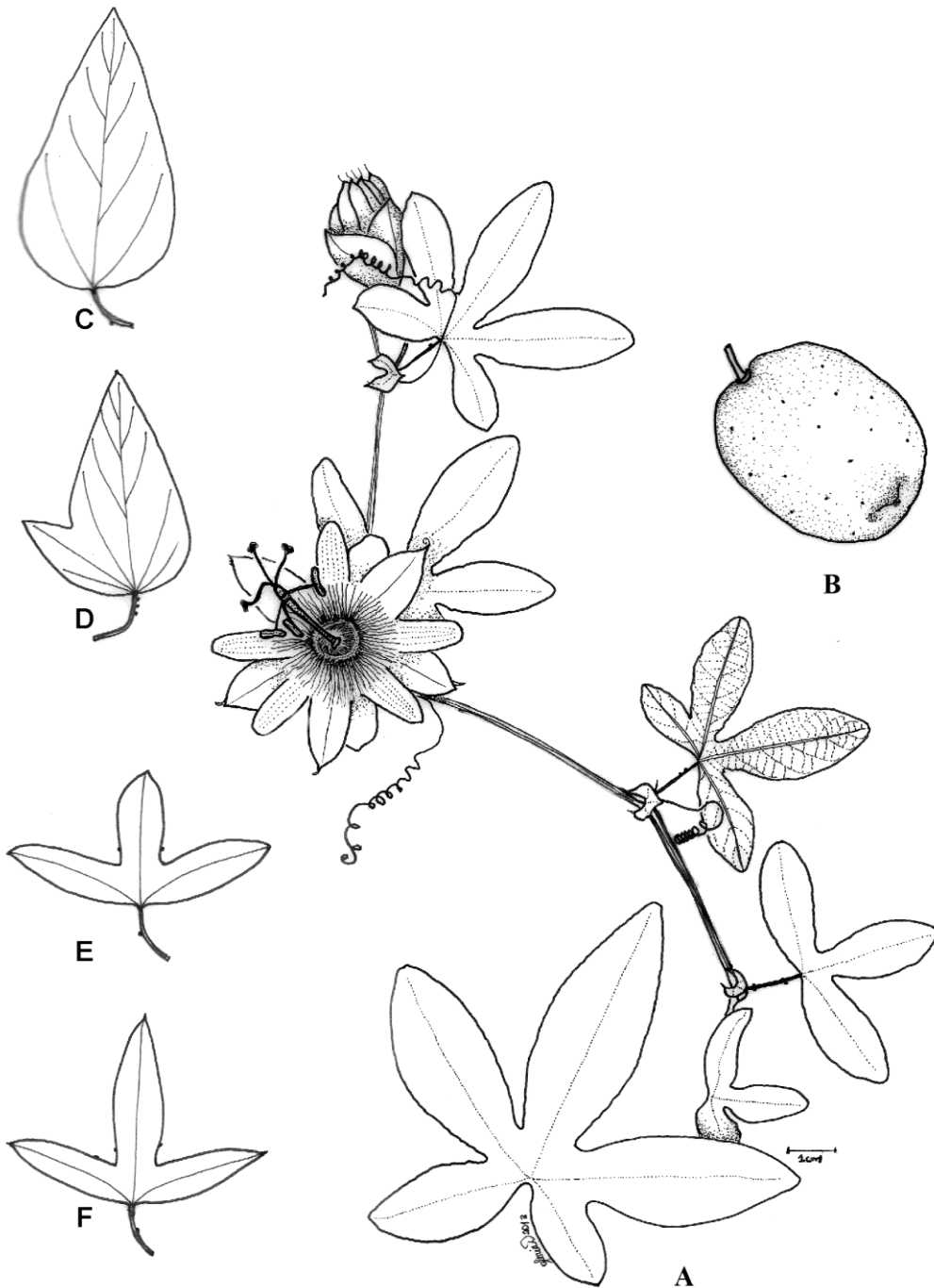
*Passiflora caerulea* L., Sp. Pl. 2. 1753.

Hábito liana, generalmente glabra (Fig. 1). Tallo subangular con entrenudos 40 - 80 mm de long. Zarcillos solitarios y axilares, mitad basal recta y con torsiones descomprimidas en la mitad superior. Hojas simples, alternas, tri - a pentalobada, margen entero, tri - a pentanervada. Lóbulos oblongos de 33 - 67 mm de largo y 11 - 28 mm de ancho, ápice agudo o en ocasiones mucronado. Hojas jóvenes generalmente simples, no lobadas, margen entero, oblongas a ovadas. Estípulas foliares reniformes. Pecíolo de 18 - 30 mm de long., con presencia de 2 a 4 glándulas estipitadas, generalmente en posición alterna, en ocasiones opuestas. Flores solitarias, axilares, pedúnculo de 12 - 52 mm de long. Sépalos oblongo-lanceolados, verde - claros en el envés y blanquecinos en el haz, mucronado. Pétalos oblongos y blanquecinos. La corola con *radii* en dos series, filamentos radiados, largos, de color lila hacia el ápice, blancos en la parte

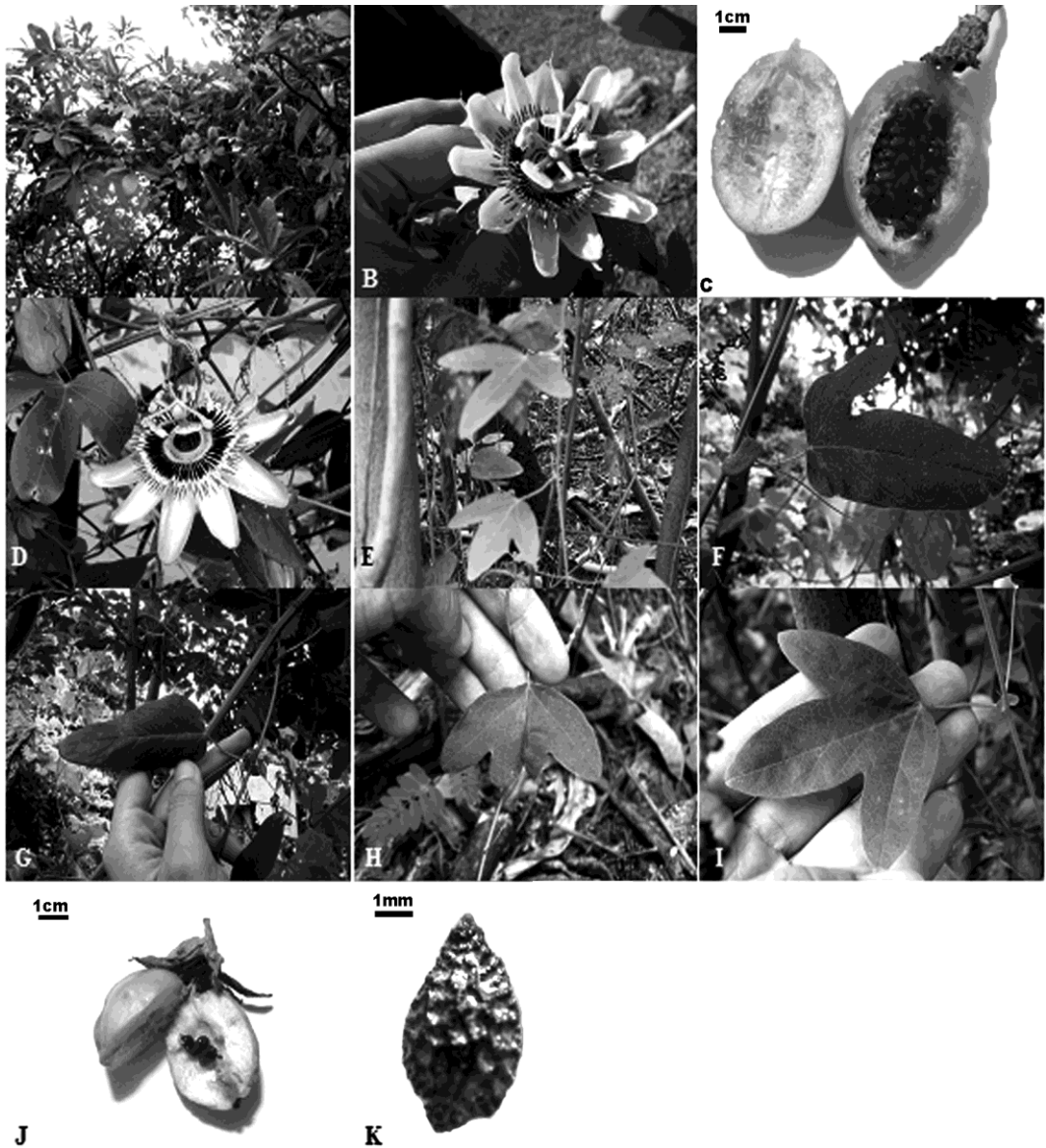
media y violeta oscuro en la base; *pali* con dos serie de filamentos cortos, erectos y capitados, blancos hacia la base y violeta hacia el ápice. Opérculo membranoso. Androginóforo de color verde, ovario de color verde y forma ovoide, estilo verde claro con máculas moradas, estigma morado y capitado, antera amarilla y filamento verde con máculas moradas (Figs. 2B-C). Fruto baya, ovoide,  $\pm 11$  cm de diámetro, verde en la inmadurez y naranja a la madurez, mesocarpo corchoso y blanquecino (Figs. 1B, 2C). Semillas numerosas ( $\pm 208$  semillas/fruto), castaño oscuro en la madurez, ovado con foveas de contorno variable en la superficie, rodeada por un arilo rojizo (Fig. 2K).

En ciertos ejemplares se han observado hojas trilobadas, en ocasiones bilobadas y enteras, este última presente en hojas juveniles (Fig. 2A). Presencia de un par glándulas esféricas sésiles, por lo general opuestas en el borde hacia la base del lóbulo medio, ocasionalmente se observa la presencia de tres glándulas ubicadas hacia la base de los lóbulos, un par se localiza en el lóbulo medio y otra en unos de los lóbulos laterales (Figs. 1C-F, 2E-I). Fruto con mesocarpo corchoso, grueso y blanquecino, el número de semillas reducidas a ninguna por fruto (Fig. 2J).

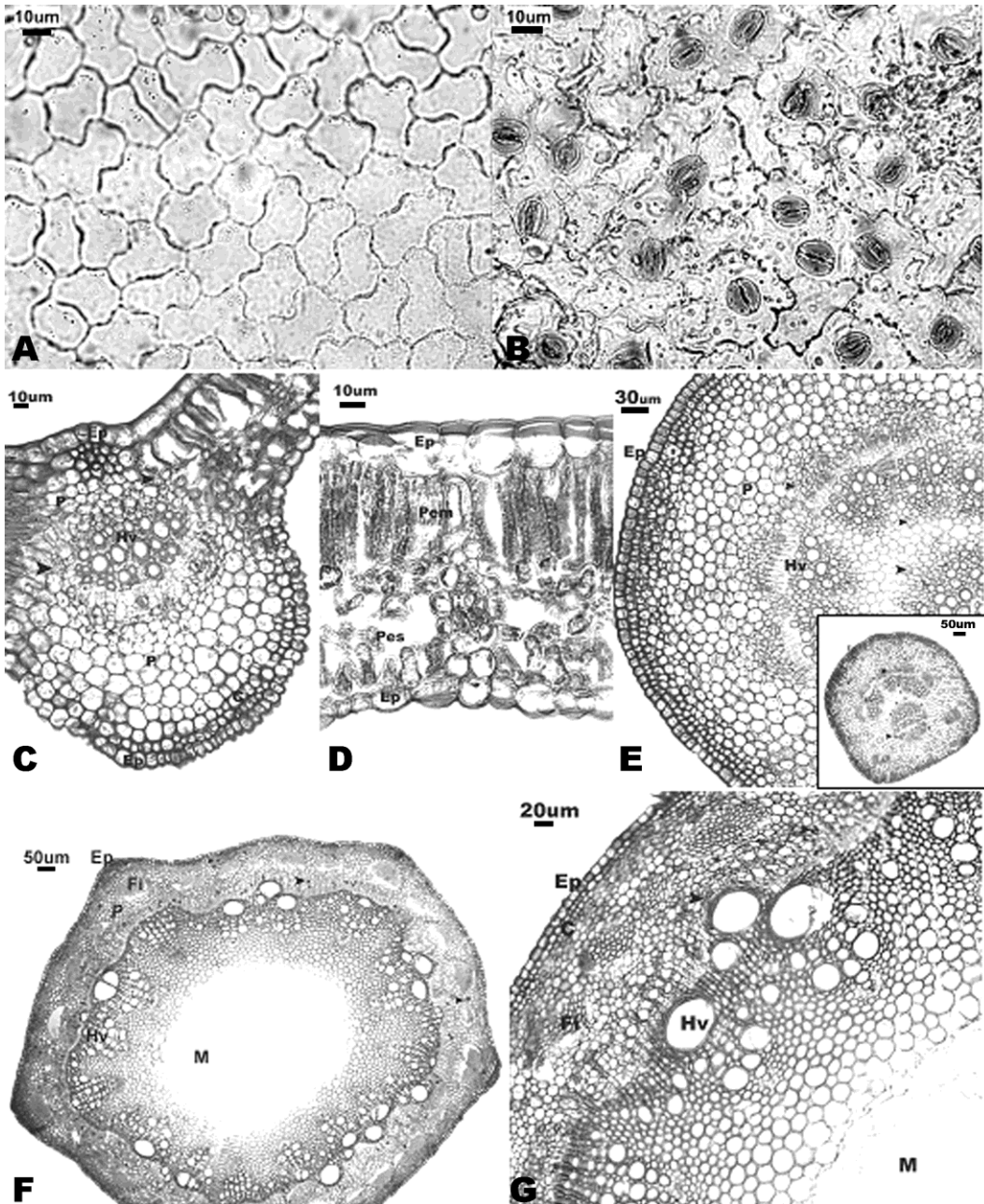
Un individuo presenta heterofilia, es decir que hojas juveniles y adultas pueden ser morfológicamente diferentes (Deginani, 2001; Feuillet y MacDougal, 2003). Las variaciones en los caracteres foliares observados, coinciden con lo mencionado para *P. caerulea* por Da Costa (1980), Cervi (1997), Deginani (1999; 2001), Pereira Sühsner (2013), así como la presencia de glándulas sésiles en la base y borde de los lóbulos (Cervi, 1997; Pereira Sühsner, 2013).



**Fig. 1:** *Passiflora caerulea* L. A. Porción de rama florífera y detalle de lámina, B. Fruto, C-F. Variantes de la lámina foliar.



**Fig. 2:** *Passiflora caerulea* L. **A.** Hábito, **B.** Detalle de la flor de ejemplares con hojas pentalobadas, **C.** Fruto de ejemplares con hojas pentalobadas, **D.** Flor de ejemplares con variación en la morfología foliar, **E-I.** Variantes de la lámina foliar, **J.** Fruto de ejemplares con heterofilia, nótese el mesocarpo corchoso y grueso con escasas semillas, **K.** Semilla con fóveas.



**Fig. 3:** *Passiflora caerulea*. Anatomía foliar y caulinar, **A.** Epidermis adaxial, **B.** Epidermis abaxial, **C.** Corte transversal de la lámina foliar a la altura del nervio medio, **D.** Mesófilo, **E.** Corte transversal del peciolo, **F-G.** Corte transversal del tallo. **Referencias:** **Ep**, epidermis; **Pem**, parénquima en empalizada; **Pes**, parénquima esponjoso; **P**, parénquima; **Hv**, Haz vascular, **Xi**, xilema; **Fl**, floema; **Fi**, fibras; **C**, colénquima; la flecha indica cristales de oxalato de calcio tipo drusas.

Respecto a los frutos con pocas semillas, podría deberse al número de granos de polen depositados en el estigma durante la polinización (Akamine & Girolami, 1957), es decir, para mayor número de semillas por fruto se requiere mayor número de pólenes viables depositados en el estigma.

### **Anatomía foliar**

La epidermis es unistrata, con paredes anticlinales de contorno lobulado (Figs. 3A–B). Las células epidérmicas de la superficie adaxial son de mayor tamaño con respecto a las de la abaxial, siendo la vena media más prominente hacia el envés (Fig. 3C).

Estomas anomocítico y aparato estomático paracítico están restringidos a la superficie abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática (Figs. 3A–B). Este tipo de hoja fue mencionada para otras especies del género, tales como *P. actina* Hooker (Kurtz *et. al.*, 2003), *P. palmeri* Rose (Miranda, 2007), *P. guazumaefolia* Juss. (García *et. al.*, 2008), *P. alata* Curtis, *P. edulis* Sims (Pereira Sühsner *et. al.*, 2009), *P. misera* Kunth (Pereira Sühsner, 2015).

En sección transversal de la semilámina, se observa por debajo de ambas epidermis, casquetes y/o cordones de una a dos estratos de colénquima angular.

Se registra la presencia de cristales de oxalato de calcio tipo drusas en el parénquima de la vena media, así como también en las células parenquimática de la vaina que rodea a los haces vasculares.

Se ha mencionado la presencia de cristales tipo drusas en el mesófilo de *P. palmeri* Rose (Miranda, 2007), *P. guazumaefolia* Juss. (García *et. al.*, 2008), *P. alata* Curtis y *P. edulis* Sims (Pereira

Sühsner *et. al.*, 2009), *P. misera* Kunth (Pereira Sühsner, 2015), sin embargo en *P. caerulea* las drusas están presentes en la vaina de los haces vasculares y en el parénquima de la vena media.

El haz vascular es del tipo colateral, coincidiendo con *P. actinia* Hook. (Kurtz *et. al.*, 2003), *P. palmeri* Rose (Miranda, 2007), *P. alata* Curtis y *P. edulis* Sims (Pereira Sühsner *et. al.*, 2009), *P. misera* Kunth (Pereira Sühsner, 2015).

El mesófilo es dorsiventral con simetría bilateral (Fig. 3D). El parénquima en empalizada es unistrato con células en forma de prismas rectangular y presencia de cristales tipo drusas. El esponjoso compuesto de 5 a 6 estratos de células más o menos irregulares.

El pecíolo posee contorno cilíndrico en sección transversal, con epidermis uniestratificada, subyacente a ella se disponen bi o tri estratos de colénquima angular, se observan drusas en el parénquima y asociadas al haz vascular (Fig. 3E).

### **Anatomía caulinar en sección transversal**

Tallo pentagonal, con cinco costillas redondeadas y valles intercostales convexos (Figs. 3F–G). Epidermis unistrata. Córtex constituido por colénquima angular y tejido parenquimático con casquetes de fibras esclerenquimáticas. El colénquima se observa en las costillas en tri- a pentastratos y bi- a tristratos en los valles intercostales. Presencia de abundantes drusas en el córtex. Médula parenquimática hueca (Fig. 3G).

## **CONCLUSIONES**

Los caracteres morfo-anatómicos foliares y caulinares de *P. caerulea*

permiten la diferenciación con otras especies de *Passiflora*. El contorno de las células epidérmicas, el tipo de estomas, la presencia de drusas y su localización son caracteres de valor diagnóstico y contribuyen a la caracterización de la especie.

Si bien los cristales de oxalato de calcio de tipo drusas han sido descriptos para varias especies de género (Miranda, 2007; García et al., 2008; Pereira Sühsner et al., 2009; Pereira Sühsner, 2015), la localización de la misma varía, en *P. caerulea*, pues se localizan en el parénquima de la vena media y en la vaina de los haces vasculares.

Por otra parte, el tallo de *P. caerulea* presenta medula parenquimática hueca, carácter ya descripto para otras especies del subgénero *Passiflora* L. (Pereira Sühsner, 2009), mientras que las especies del subgénero *Delacoba* (DC.) Rchb. presentan medula maciza (Pereira Sühsner, 2015). El tipo de medula podría ser un carácter de relevancia taxonómica, sin embargo, aun se requieren estudios anatómicos en especies de los subgéneros *Astrophea* (DC.) Mast. y *Deidamioides* (Harms) Killip.

## REFERENCIAS

- Akamine, E.K.; Girolami, D.G. 1957. Problems in fruit set in yellow passion fruit. *Hawaii Fram. Science* (US). 5 (4): 3 – 5.
- Baillon, H. 1886. Histoire des plantes, Monographie Des Campanulacees, Cucurbitacees, Loacacees, Passifloracees & Begoniacees. Paris, FR: Librairie Hachette & C. 515 p.
- Cabrera, A.L.; Willink, A. 1980. Biogeografía de América Latina. Segunda Edición. Washington (US): OEA. 120 p.
- Cervi, A. 1997. Passifloraceae do Brasil: Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* (ES). 45 (1): 1 - 92.
- D'Ambrogio, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur. 84p.
- Deginani, N. 1999. Passifloraceae L. *Aportes Botánicos de Salta-Ser. Flora* (AR). 6 (2): 1 - 20.
- \_\_\_\_\_. 2001. Las especies Argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* (AR). 39 (1-2): 43 - 129.
- García, M., Jáuregui, D.; Pérez, D. 2008. Anatomía Foliar de *Passiflora guazumaefolia* Juss. y *Passiflora aff. tiliaefolia* L. (Passifloraceae) Presentes en Venezuela. *ERNSTIA*, 18 (2): 165-176.
- Killip, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. *Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. ser.* 19: 1 - 613.
- Kurtz, S; Santos, C.A.; Duarte, M.; Sato, M. 2003. Morfo-anatomía de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker (Passifloraceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22 (2): 105-120.
- Miranda, R. 2007. Anatomía foliar de *Passiflora palmeri* Rose (Passifloraceae). IN: XIII Seminário de Iniciação Científica e 9a Semana de Pesquisa e Pós-Graduação da UESC Ciências Biológicas.
- Motic China Group. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopia digital.
- Pereira Sühsner, C.D. 2013. Citogenética de las especies del Género *Passiflora*

L. del Distrito Félix Pérez Cardozo,  
Dpto. Guairá, Paraguay. Tesis  
Magíster en Ciencias con énfasis en  
Biodiversidad y Sistemática. San  
Lorenzo: FACEN. 61p.

- 
- \_\_\_\_\_. 2015. Morfo-  
anatomía foliar y caular de  
*Passiflora misera* Kunth  
(Passifloraceae). *Steviana* 7: 96 – 101.
- Pereira Sühsner, C.D.; González, F.;  
Benítez, B. 2009. Evaluación de la  
morfoanatomía foliar de *Passiflora*  
*alata* Curtis y *Passiflora edulis* Sims.  
*Steviana* (PY). 1: 38 - 45.
- Ulmer, T.; Macdougall, J. 2004. *Passiflora*  
“Passionflowers of the world”. China,  
CN: Timber Press. 433 p.
- Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J.  
2009. Catálogo de Las Plantas  
Vasculares Del Cono Sur: Argentina,  
Sur de Brasil, Chile, Paraguay y  
Uruguay (En línea). Buenos Aires,  
AR. Consultado 10 oct 2012.  
Disponible en  
[http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/  
FloraArgentina/FA.asp](http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp).

# Morfo-anatomía de los órganos vegetativos y arquitectura foliar de *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd. (Asteraceae) de uso medicinal en Paraguay

González, F.<sup>1</sup>; Pereira Sühsner, C.D.<sup>1</sup>; Benítez, B.<sup>1</sup>; Soria, N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales. Dpto. Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción

<sup>2</sup>Sociedad Científica del Paraguay

E mail del autor: fidelinagonzalez78@hotmail.com

---

**Morfo-anatomía de los órganos vegetativos y arquitectura foliar de *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd. (Asteraceae) de uso medicinal en Paraguay.** *Gamochaeta americana* es una hierba nativa que se distribuye en los Departamentos de Cordillera, Alto Paraná y Central. Posee interés medicinal ya que sus hojas y tallos se utilizan como antitusígeno, desinfectante y la raíz como hemostático. El objetivo de la presente investigación es describir la morfoanatomía, arquitectura foliar y señalar caracteres de valor diagnóstico de *G. americana*, procedentes de la ciudad de Capiatá, Central, Paraguay. Las muestras fueron procesadas mediante técnicas estándares para microscopía óptica. *Gamochaeta americana* presenta hojas simples; la superficie adaxial es pilosa y la abaxial es blanquecina y lanosa. Desarrolla venación pinnada. Venas secundarias son débiles broquidrodomas. Las células epidérmicas uniestratificadas son de contorno ondulado. Presenta tricomas glandulares y eglandulares, pluricelulares con célula apical flageliforme. Estomas anomocíticos, anfiestomático. Los elementos de valor diagnóstico son: arquitectura foliar y tipos de tricomas.

**Palabras claves:** arquitectura foliar, *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd., morfoanatomía

**Vegetative organs morpho-anatomy and leaf architecture of *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd. (Asteraceae) for medicinal use in Paraguay.** *Gamochaeta americana* is a native herb distributed in the Departments of Cordillera, Alto Paraná and Central. It is of medicinal interest because its leaves and stems are used as an antitussive, disinfectant and root as a hemostatic. The aim of this research is to describe the morphoanatomy and leaf architecture, and to indicate characteristics of diagnostic value of *G. americana*, from the city of Capiatá, Central, Paraguay. The samples were processed by standard techniques for light microscopy. *Gamochaeta americana* has simple leaves; the adaxial surface is hairy and the abaxial surface is fleecy and white. It develops pinnate venation. Secondary veins are weak and brochiodromous. The epidermal cells are unistratified, with a wavy contour. It presents glandular and eglandular multicellular trichomes, with flagelliform apical cells. Anomocytic, amphistomatic stomata. Diagnostic value elements are: leaf architecture and types of trichomes.

**Keywords :** *Gamochaeta americana* (Mill.) Weed., leaf architecture, morpho-anatomy

---

## INTRODUCCIÓN

Las Asteraceas conocidas también como Compositae, están representadas por alrededor de 1600 géneros y 23.600 especies. (Panero y Funk, 2008). Esta

familia ha sido objeto de estudios morfo-anatómicos, citogenéticos, fitoquímicas y farmacológicos. (Carlquist, 1961; Metcalfe y Chalk, 1983; Dydak *et al.*, 2009, Bobek *et al.*, 2015).

*Steviana*, Vol. 8(2), 2016 pp. 84–91.

Original recibido el 14 de octubre de 2016.

Aceptado el 30 de noviembre de 2016.



El género *Gamochaeta* Wedd., con aproximadamente 47 especies, distribuidas principalmente en América del Sur. (Freire y Iharlegui, 1997). En Paraguay habitan 7 especies, constituyen hierbas anuales o perennes, presentan hojas alternas, de forma espatuladas, oblanceoladas y enteras en el margen, inflorescencias en capítulos heterógamos, pequeños, flores dimorfas, las del radio numerosas, femeninas y las del disco pocas, hermafroditas. Frutos aquenios obovados, oblongos y cubiertos de cortos pelos dobles. (Cabrera y Freire, 1998).

*Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd., es nativa de Paraguay y conocida popularmente como “vira vira”. La parte aérea es empleada en la medicina popular en infusiones y extractos contra la gastritis, neumonía, como antitusígeno, cicatrizante de heridas internas, posee además propiedad desinfectante y la raíz es utilizada como hemostática. (Cárdenas, 1989; García - Barriga, 1992; Cerón, 2006; Pin *et al.*, 2009). En Paraguay se distribuye en los Departamentos de Cordillera, Alto Paraná y Central. (Cabrera y Freire, 1998).

Entre los antecedentes relacionados a la anatomía de la familia se mencionan a Solereder (1908), Metcalfe y Chalk (1950), Uphor y Hummel (1962) que citan caracteres anatómicos como la presencia de cavidades secretoras, tipos de tricomas que por su variedad de tipología resultan útil en taxonomía y sobre todo en el control de calidad de hierbas, tipos de estomas y tallos herbáceos con un anillo de haces vasculares concéntricos cada uno protegido por un casquete de fibras. No se registran estudios referidos a la morfo-anatomía y arquitectura foliar de *G. americana*.

El estudio anatómico y la arquitectura foliar constituyen importantes instrumentos taxonómicos, que permiten la identificación y caracterización de las especies, con lo cual se establecen patrones micrográficos de identificación de las mismas.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de la presente contribución es caracterizar la morfo-anatomía, la arquitectura foliar y señalar caracteres de valor diagnóstico para *G. americana* procedente de la ciudad de Capiatá del Departamento Central, Paraguay.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño metodológico**

Observacional y descriptivo de cortes transversales de hoja, tallo, raíz y longitudinales de tallo.

### **Colecta de material testigo**

El material se colectó en PARAGUAY; Departamento Central; Ciudad Capiatá; Cuarta Compañía; 19-III-2016; colectada y determinada por González, F. El material colectado fue depositado en el Herbario FACEN de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción.

### **Identificación taxonómica**

La identificación taxonómica, se realizó utilizando claves de identificación taxonómica, se utilizó la clasificación taxonómica propuesta por Cabrera y Freire (1998), comparando con el material de herbario y base de datos disponibles en la web.

### Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se siguió la metodología estándar, basada en observación directa y al microscopio estereoscópico marca Carl Zeiss.

### Caracterización anatómica

El material vegetal fue previamente fijado en FAA (Formol, Acido acético, Alcohol; 9:5:5). Los cortes transversales foliares, caulinares y radicales se realizaron con micrótomos rotatorios manuales, posteriormente se aplicó tinción directa con safranina (1%) y se montó en Bálamo de Canadá (D'Ambrogio, 1986).

Para la arquitectura foliar se diafanizó la hoja con hipoclorito de sodio (5%), posteriormente se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada, para finalmente teñirlo con azul de metileno (D'Ambrogio, 1986; Carpano *et al.*, 1994), la descripción se realizó según la terminología de Ash *et al.* (1999).

Se tomó 10 muestras foliares, se procedió a diafanizar y eliminar la cutina, para la observación de la epidermis foliar, aplicando la técnica de Carpano *et al.* (1994). Esta técnica permitió visualizar las células y obtener valores numéricos correspondientes a los índices de empalizada y estomático.

### Índice de empalizada

Para la determinación del índice de empalizada se observó la epidermis superior delimitando cuatro células epidérmicas adyacentes, y se enfocó el parénquima en empalizada. Se realizó el recuento de las células en empalizadas en el área delimitada, posteriormente se aplicó la fórmula propuesta por Zornin y Weiss, 1925, como se indica en la siguiente:

$$IE = \frac{N^{\circ} \text{ de células en empalizada}}{4 \text{ células epidérmicas}}$$

### Índice de estomas

Para la determinación del índice de estomas, se enfocó la epidermis superior e inferior y se procedió al conteo, el cálculo se realizó utilizando la fórmula propuesta por Salisbury (1927), como se indica:

$$IS = \frac{N^{\circ} \text{ de estomas}}{N^{\circ} \text{ de estomas} + N^{\circ} \text{ de cel. epidérmicas}} \times 100$$

### Medición

Las mediciones de largo-ancho de las hojas, se realizaron con regla milimetrada y están expresadas en cm., se midieron 10 hojas de 5 individuos.

Las mediciones de los cortes histológicos se realizaron con el software MICAN versión 1.6 y están expresadas en  $\mu\text{m}$ .

### Fotografías

Las fotomicrografías fueron tomadas con cámara digital modelo HDCE – X5, marca ALLTION incorporadas al microscopio óptico marca OLYMPUS – BH2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd.

La especie se caracteriza por ser una hierba multicaule de 40cm de altura, tallo cilíndrico, ascendente y lanoso, hojas alternas, con pseudopecíolo, discoloras, verdes, pilosas en el haz y blanquecino, lanosos en el envés, las inferiores dispuestas en roseta de forma espatuladas, ápice obtuso y mucronado, base atenuada, de 8 x 2,5cm; las medianas de 4 x 1,5cm y superiores de 1,5 x 0,5cm presentan una disposición esparcida, obovadas,

levemente decurrente. Inflorescencia en capítulo formado por glomérulos en las axilas de las hojas superiores formando una especie de espiga, con flores blanquecinas, las del disco tubular y las del radio presentan estigma bifido. Estos caracteres morfológicos coinciden con lo

mencionado por Cabrera & Freire (1998), Nesom (2004), que mencionan que las especies pueden ser reconocidas por sus capítulos con brácteas internas agudas y hojas parcialmente amplexicaule o levemente decurrente.



Fig. 1: *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd., A: Hábitat B: Espécimen voucher.

### Arquitectura foliar

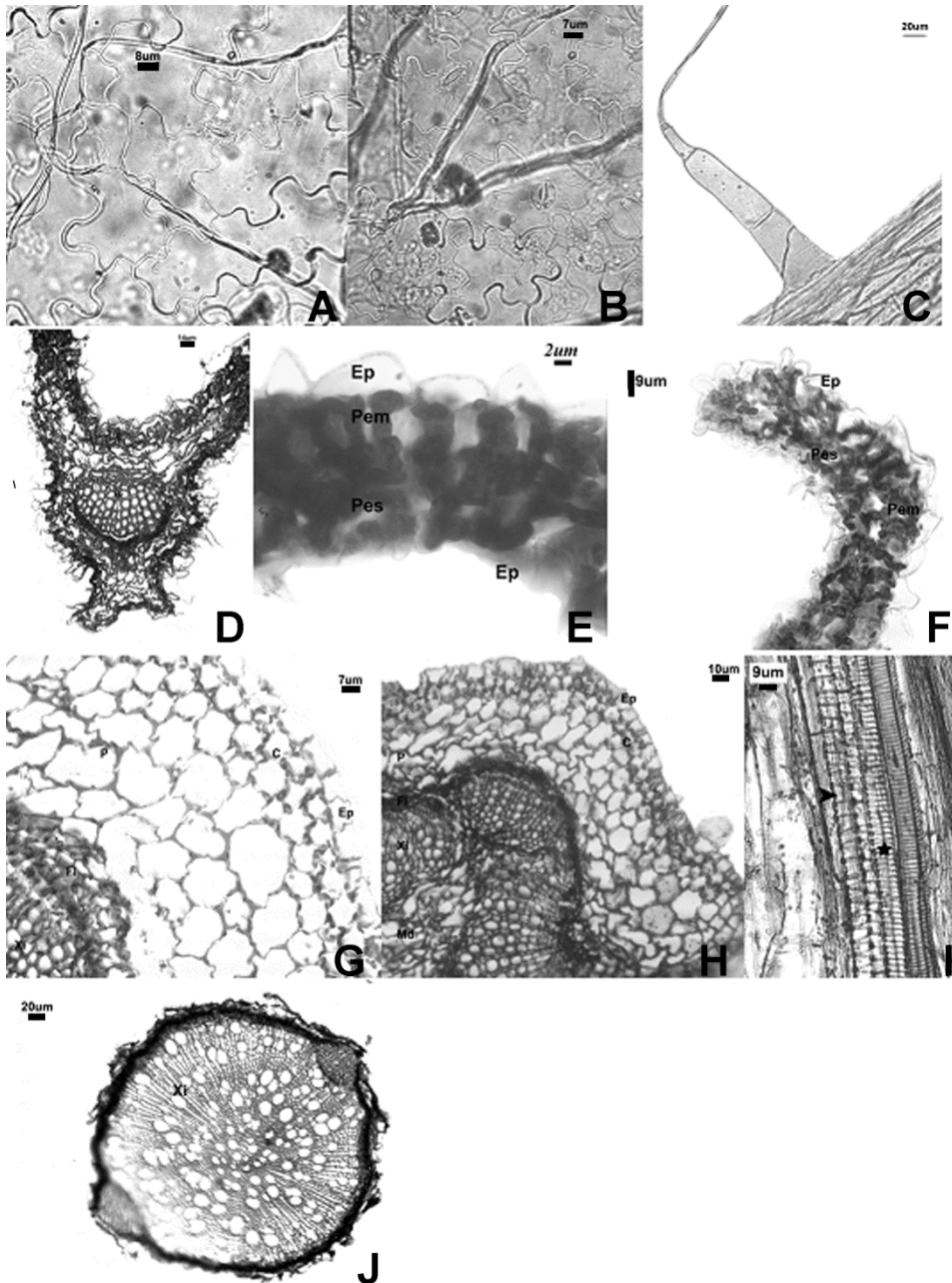
La filotaxi es decusada y alterna, cada hoja se inserta al tallo a los  $90^\circ$  de los de arriba y abajo, siendo la organización de la hoja simple, no lobada y peciolo sésil. El tamaño de la lámina (ancho x largo x  $2/3$ ) por rango de área es  $176 - 932 \text{ mm}^2$ . La forma de la lámina es obovada, pues la parte más ancha de la hoja esta en el eje axial, representando a la  $2/5$  parte de la hoja. La lámina es simétrica, presentando la misma forma a ambos sectores de la vena media.

El radio de la lámina (largo: ancho) es  $2: 1 - 2: 7$ . La longitud de la vena media ( $l_m$ ) es de  $12 - 70 \text{ mm}$ , siendo la longitud de la extensión apical ( $l_a$ ) y basal ( $l_b$ ) igual a cero, por tanto la longitud total ( $L$ ) de la hoja es igual a la longitud de la vena media.

El ápice es apiculado, con ángulo basal de la hoja agudo ( $<90^\circ$ ) y ángulo apical

obtusos ( $90^\circ - 180^\circ$ ). La base es cuneada, el margen próxima a la base y el  $0,25 L$  no presente curvaturas significativas ( $L_b = 0$ ). La forma del ápice, respecto al  $25\%$  del ápice de la lámina es convexa, el margen próximo al ápice y del  $0,75 L$ , la curvatura se encuentra distante del centro de la hoja ( $L_a=0$ ). Los márgenes son irregulares desprovistas de lobulaciones.

La vena, de primera categoría presenta una sola vena por tanto es pinnada. Las venas secundarias son débiles bronquidrodomas, debido a que estas están unidas en una serie de arcos, con intervalos irregulares de venas secundarias. Las venas intersecundarias son poco perceptibles. Las de tercera categoría de vena es dicotómica de libre ramificación. El curso de la vena terciaria es sinuosa, cambiando de dirección acorde a la curvatura.



**Fig. 2:** *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd., **A:**Epidermis adaxial, **B.** Epidermis abaxial, **C.** Tricoma eglandular, **D.** Corte transversal de la lamina foliar, detalle de la nervadura principal, **E - F.** Corte transversal de la lamina foliar, detalle del mesofilo, **G - H.** Corte transversal del tallo, **I.** Corte longitudinal del tallo, **J.** Corte transversal de la raíz. **Referencias:** **Ep,** epidermis; **Pem,** parénquima en empalizada; **Pes,** parénquima esponjoso; **Xi,** xilema; **Fl,** floema; **Fi,** fibras; **C,** colénquima, **P,** parénquima; **Md,** médula; la flecha indica: elemento de vaso helicoidal y la estrella: elemento de vaso anillado.

La variabilidad del ángulo de la tercera vena es inconsistente, los ángulos terciarios varían de forma aleatoria sobre la lámina.

### **Anatomía foliar**

Epidermis unistrata, con paredes anticlinales de contorno ondulado, presenta estomas de tipo anomocítico a nivel de las células epidérmicas en ambas epidermis, caracterizando a la hoja como anfiestomática. A nivel de familia lo que predomina son los tipos de estomas anomocíticos y anisocíticos, en donde se evidencia la predominancia del primer tipo coincidiendo por lo mencionado por Metcalfe y Chalk (1950). En tanto que en relación a la ubicación de los estomas en ambas superficies epidérmicas determina una hoja anfiestomática coincide con lo citado por Esau (1974) y Budel *et al.* (2009).

En sección transversal de la nervadura central, por debajo de la epidermis se observa de dos a tres estratos de colénquima de tipo angular. El haz vascular es colateral acompañado por casquetes de fibras esclerenquimáticas. La nervadura central es más prominente en la superficie abaxial de la hoja.

El mesófilo es bifacial con simetría dorsiventral, constituido por parénquima en empalizada y esponjoso. El primero se localiza hacia la cara adaxial, formado por 1-2 estratos de células con eje mayor perpendicular a las células epidérmicas. El parénquima esponjoso se localiza hacia la cara abaxial compuesta por 3-4 estratos de células de formas redondeadas e irregulares y con espacios intercelulares con margen levemente revoluto.

Según Metcalfe y Chalk (1950), el mesófilo dorsiventral es considerado como

el patrón usual para la familia de Asteraceae.

Están presentes en ambas superficies de la hoja dos tipos de tricomas los eglandulares y glandulares. Los tricomas glandulares son pluricelulares, biseriados con células apicales redondeada. Los tricomas eglandulares son pluricelulares, uniseriados, con un cuerpo formado por 3-4 células, la célula terminal sin septos, alargados en forma de látigo y de longitud variable.

Ambos tipos de tricomas descriptos coinciden por la mencionado por diversos autores en otras especies que pertenecen a las Asteraceae, Metcalfe y Chalk (1950); Amat (1998); Cambi et al (2006), reportan que la presencia de tricomas eglandulares con células flageliformes cubriendo la superficie de las hojas, es común en las Asteraceas e indican que los mismos constituyen importantes caracteres de valor diagnóstico.

### **Anatomía caulinar en sección transversal**

Tallo de contorno redondeado unistrato con tricomas glandulares, pluricelulares, biseriados y eglandulares, pluricelulares compuesta de 3-5 células y la apical sin septos en forma de látigo, los estomas se ubican en el mismo nivel. Por debajo de la epidermis se observa dos a tres células de colénquima angular, seguido de tres a cuatro estratos de tejido parenquimático. El cilindro vascular forma una eustela colateral abierta y separadas por células parenquimáticas, el floema en posición centrífuga está rodeado de un casquete de fibras esclerenquimáticas y centripetamente se observa el xilema. La médula se presenta parenquimática de células redondeadas, aumentando de

tamaño hacia la zona central caracterizada por la presencia de cristales. Según Nakata (2003), la presencia de cristales puede deberse a que la síntesis de oxalato de calcio en el vegetal está relacionada a la presencia de este con el medio externo. En sección longitudinal se observan parénquima axial y elementos del vaso anilladas y helicoidales.

### **Anatomía radical en sección transversal**

La epidermis o rizodermis, está formada por células alargadas, unistrata. La corteza formada por tejido parenquimático cortical pluriestratificado, centrípetamente se observa el cilindro vascular compuesto de floema y xilema.

### **Índice estomático**

El índice estomático para *G. americana* medio es 12,41; con valores oscilando entre 8,69 - 17,24 en la superficie adaxial y en la superficie abaxial el medio es de 22,56; con valores entre 12,5 – 20.

### **Índice en empalizada**

El índice en empalizada para *G. americana* medio 7,62; con valores oscilando entre 5,75 – 8,75.

### **CONCLUSIONES**

Los caracteres de valor diagnóstico para la identificación de *Gamochaeta americana* son: tricoma glandular pluricelular, biseriado con célula apical redondeada y eglandulares simples y de tipo flageliformes, venación pinnada y bronquidrodomas, que deben ser considerados para la identidad botánica del producto vegetal comercializado como “vira vira”.

Los caracteres morfo-anatómicos foliares, caulinares y la arquitectura foliar de *G. americana* son de relevancia taxonómica para el control de calidad de muestras comerciales.

### **REFERENCIAS**

- Amat, A. 1988. Uso de Caracteres Histofoliales en la Identificación de las Especies Argentinas de Género *Achyrocline* DC. (Asteraceae). Acta Farm. Bonaerense 7(2):75-83.
- Ash, A.; Ellis, B.; Hickey, L.J.; Johnson, K.; Wilf, P.; Wing, S. 1999. Manual of Leaf Architecture - morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms. 65p.
- Bobek, V. B. et al. 2015. Comparative pharmacobotanical analysis of *Baccharis caprariifolia* DC. and *B. erioclada* DC. from Campos Gerais, Paraná, Southern Brazil. Latin American Journal of Pharmacy. V. 34. n. 7. 1396-402 p.
- Budel, J. M. et al. 2009. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria – prima. Revista Brasileira de Farmacognosia. Volumen 19 (2): 545 – 552.
- Cabrera, A.L.; Freire, S.E. 1998. Compositae V. Asteroideae. Inuleae. Mutisieae. Flora del Paraguay. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Missouri Botanical Garden. Ginebra. 27:9 -100.
- Cambi, V.; Buciarelli, A.; Flemmer, A.; Hansen, P. 2006. Morfoanatomía de *Pluchea sagittalis* (Asteraceae),

- Especie Nativa de Interés Medicinal. Acta Farm. Bonaerense 25 (1), 43-49 p.
- Cárdenas, M. 1989. Manual de plantas económicas de Bolivia. Edit. Amigos del Libro. 2da. Edición, Cochabamba. 333p.
- Carlquist, S. 1961. Comparative plant anatomy. New York, Holt/Rinehart/Winston. ix, 146 p.
- Carpano, S.M.; Spegazzini, E.D.; Nájera, M.T. Nueva técnica de eliminación de cutina de órganos foliares. Rojasiana 2 (1), 9-12.
- Cerón, C. 2006. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. 285-293p.
- D'Ambrogio, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur. 84p.
- Dizeo de Stritmater, C. 1973. Nueva técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 15: 126-129.
- Dydak, M. *et al.* 2009. Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). Hereditas, v.146, n. 4. 152 – 161 p.
- Esau, K. 2008. Anatomía Vegetal. Ed. Omega, Barcelona-España. 641p.
- Freire, S.E.; Iharlegui, L. 1997. Gamochaeta lullioana (Asteraceae, Gnaphalieae), una nueva especie de los Andes de Bolivia y Perú. Novon 7: 32-34.
- García – Barriga, H. 1992. Flora medicinal de Colombia. 2da. Edición. Tercer Mundo Editores. Bogotá.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1983. Anatomy of the Dicotyledons. 2º ed. Vol. 2: 783 – 803 p. Oxford, Clarendon Press.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Vol II. Clarendon.
- Nakata, P. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. Plant Sci., Limerick. 164: 901-909p.
- Panero, J.L.; Funk, V.A. 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol.47. 757-782p.
- Pin, A; González, G; Marin, G. *et al.* 2009. Plantas medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción Paraguay: AGR Servicios Gráficos. 441p.
- Salisbury, E. 1927. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the wooldland flora. Philosophical Trancripción Royal Society of London. Ser B. 216: 1-65.
- Solereder H. 1908. Systematic. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Clarendon Press. 1104p.
- Uphof, J.; Hummer, K. 1962. Plant hairs. En: Handbook der Pflanzenanatomie 4 (5). Berlin, Gebr. Bornträger. 1 – 292.
- Zorning, H.; Weiss, G. 1925. Beiträge zur Anatomie des Laubblattes offizineller und pharmazeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen. Archiv für Pharmakologie Berlín. 263:451-470.

# Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*

Gayozo, E.<sup>1</sup>; Rivarola, C.<sup>1</sup>; Núñez, C.<sup>1</sup>; Marín Insfrán, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay  
E mail del autor: elviologo@gmail.com

---

**Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*.** *Stevia rebaudiana* (Ka'a he'e) es muy conocida en todo el mundo como edulcorante natural, es empleada de manera tradicional en decoctos e infusiones, principalmente como agente antioxidante, sin embargo, es desconocida la capacidad antimutagénica de las infusiones. El estudio es experimental con diseño completamente al azar donde se evalúa la acción antimutagénica de *S. rebaudiana* mediante el test de mutación somática y de recombinación (SMART). Se llevó a cabo administrando el extracto acuoso de hojas oralmente por 24 horas a distintas concentraciones (0,001 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> y 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) a larvas heterocigotas de *Drosophila melanogaster* obtenidas de cruza estándar. Agua destilada fue utilizada como control y Ciclofosfamida 2,61 mg.mL<sup>-1</sup> para inducir mutaciones. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el Test Kastenbaum-Bowman  $\alpha=\beta = 0,05$ , nuestros resultados indican que el extracto acuoso posee acción antimutagénica con una inhibición del 50% a 58% en la incidencia total de mutaciones inducidas.

**Palabras clave:** antimutagenicidad, *D. melanogaster*, mutación, SMART, *Stevia rebaudiana*

**Antimutagenic effect of the aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni on mutation and recombination induced in *Drosophila melanogaster*.** *Stevia rebaudiana* (Ka'a he'e) is known worldwide as a natural sweetener, which is traditionally used in decoctions and teas, mainly as an antioxidant agent. However, the antimutagenic action of the infusions is unknown. This study is experimental with completely randomized design that evaluated the antimutagenic effect of *S. rebaudiana* by using the somatic mutation and recombination test (SMART). It was carried out by administering aqueous extract of leaves orally for 24 hours at different concentrations (0,001 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, and 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) to heterozygous larvae of *Drosophila melanogaster* obtained from standard crosses. Distilled water was used as control and Cyclophosphamide 2.61 mg.mL<sup>-1</sup> to induce mutations. The data obtained were analyzed using the test Kastenbaum-Bowman  $\alpha=\beta=0.05$  and our results indicate that the aqueous extract has an antimutagenic action with inhibition of 50% to 58% in the overall incidence of induced mutations.

**Key words:** antimutagenicity, *D. melanogaster*, mutation, *Stevia rebaudiana*, SMART

---

## INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'a he'e) es una planta que crece de manera silvestre en la región de la Cordillera del Amambay (Departamento de Amambay, Paraguay), considerada nativa de la región de

Sudamerica (Bender *et al.*, 2015; Mizutani y Tanaka, 2002; Shock, 1982). Es una hierba perenne de unos 30-50 cm de altura en promedio, usualmente con brotes secundarios en la base, raíces filiformes y hojas simples, opuestas, subsésiles con borde dentado (Kinghorn, 2002). Esta

*Steviana*, Vol. 8(2), 2016 pp. 92–101.

Original recibido el 27 de junio de 2016.

Aceptado el 14 de octubre de 2016.



planta ha sido utilizada por los guaraníes como hierba dulce desde tiempos ancestrales, sus hojas también son empleadas para la preparación de tés con fines terapéuticos por sus principios curativos (Bender *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la planta posee un poder de endulzamiento de hasta 143 a 242 veces mayor que la sacarosa común, esto se debe a la presencia de un grupo de moléculas en las hojas conocidas como steviol glicósidos, los cuales con ayuda de métodos de alta resolución se lograron identificar moléculas pertenecientes a este grupo y son los Rebaudiósidos A, B, C, D, E y F, Steviolbíosido, Dulcósido A, es importante también destacar que este año se han descrito químicamente dos nuevos compuestos del mismo grupo encontrados en las hojas, son los Rebaudiósidos R y Rebaudiósidos S (Hubert *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016; Bender *et al.*, 2015; Kasai *et al.*, 1981).

Estudios *in vitro* realizados con metodologías como Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC), la Actividad Antioxidante Celular (CAA) y la lipoperoxidación han demostrado que los extractos acuosos de las hojas poseen una alta actividad antioxidante, así como también en ensayos *in vivo* llevados a cabo con ratas de laboratorio (*Mus musculus*) se ha confirmado la acción antioxidante en las hojas de esta planta con una eficacia del 25% a 30% (Bender *et al.*, 2015; Zayova *et al.*, 2013; Shivanna *et al.*, 2013).

Estudio realizado con el ensayo de Ames ha demostrado que el steviósido, a concentraciones menores, no ejerce daño mutagénico en la bacteria *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100, tampoco se reportó deterioro genético

cromosómico remarcable en células de cultivo celular sanguíneo, aunque solo se observó daños mutagénicos en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 a una dosis igual o mayor a 50 mg/placa (Suttajit *et al.*, 1993).

Además, son conocidas por poseer otras propiedades como su acción protectora contra daño hepático y nefrótico, así como también que el steviósido también induce a la vasorelajación, lo cual contribuye con la regulación de la presión sanguínea, sugiriendo su actividad hipotensora (Shivanna *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004). Otras investigaciones indican que el extracto acuoso de hojas de *S. rebaudiana*, posee un efecto hipoglicémico e hipolipidémico (Assaei *et al.*, 2016; Ritu & Nandini, 2016).

Este estudio se realizó con el fin de poder determinar la acción antimutagénica del extracto acuoso de hojas de *S. rebaudiana* en *Drosophila melanogaster* mediante el test de mutación somática y recombinaciones (SMART), ya que la mayoría de los investigadores consideran y sugieren que las hojas de *S. rebaudiana* no son tóxicas, ni mutagénicas, ni carcinógenas (Shivanna *et al.*, 2013; Smirnova, 2000; Takahashi *et al.*, 2001).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de muestras vegetales e identificación

Las muestras vegetales fueron colectadas en la propiedad privada: *Melgarejo-Rodríguez*, en el distrito de 25 de Diciembre, departamento de San Pedro, Paraguay (24°44'33" S, 56°38'12" W). Se colectaron ejemplares fértiles (en estado de floración), que fueron prensados *in situ* tomándose notas del hábitat y los

caracteres morfológicos de la planta. La identificación taxonómica de este material se realizó por un especialista del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la FACEN (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

### Preparación del extracto acuoso

Las muestras vegetales fueron secadas a temperatura ambiente ( $19^{\circ}$ - $21^{\circ}$  C), sin exposición directa a luz solar ni sobreexposición al oxígeno (Hostettmann *et al.*, 2008). Se trituraron 50 gramos de hojas secas, y fueron mezcladas con 500 mL de agua destilada, llevándose a ebullición durante 5 minutos para la obtención de una solución stock de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . La solución se filtró con un equipo filtrador con bomba de vacío XZ-1B. Se realizaron las disoluciones seriadas ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ;  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) las cuales fueron refrigeradas a  $4^{\circ}$  C hasta su utilización.

### Tratamiento Crónico de larvas. Test de Mutación Somática y de Recombinación (SMART)

Se realizó el cruce estándar entre hembras vírgenes de la cepa *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>9</sup>sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> &Bd<sup>S</sup>* con machos de la cepa *mwh/mwh* en proporción de 2:1, con condiciones normales de temperatura ( $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C), en medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984). Pasadas 72 horas se extrajeron larvas de segundo estadio, que fueron distribuidas en cinco grupos de 100 larvas por unidad experimental para ser tratadas durante 24 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados cada uno con 5 mL de cada extracto acuoso (concentraciones de 0,1; 0,01 y 0,001  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), 5 mL de agua destilada como control y 5 mL de

Ciclofosfamida  $2,61 \text{ mg.mL}^{-1}$  para inducir las mutaciones (Graf *et al.*, 1984).

Pasadas 24 horas de tratamiento, las larvas pre-tratadas fueron transferidas a otros medios instantáneos rehidratados, cada uno con 5 mL de Ciclofosfamida  $2,61 \text{ mg.mL}^{-1}$ , excepto el control. Este post-tratamiento se realizó por 72 horas hasta la eclosión de los individuos adultos.

Se seleccionaron al azar individuos trans-heterocigotas *mwh+/+flr<sup>3</sup>* de cada tratamiento (5 individuos de cada sexo) de los cuales se extrajeron las alas y fueron montadas con solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). Las observaciones de las alas se realizaron con un aumento de 400X con microscopios ópticos Motic®. Se analizaron las regiones A, B, C', C, D', D y E de cada ala, incluyendo los márgenes que separan estas regiones (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004).

### Análisis estadístico

Las frecuencias de las manchas encontradas por ala fueron comparadas con las de los testigos según la tabla estadística propuesta por Frei y Würzler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), con niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$  (Kastenbaum & Bowman, 1970). Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayor cantidad de clones encontrados durante el análisis microscópico de las alas correspondió al tratamiento que se realizó solo con la

Ciclofosfamida para la inducción a mutaciones, en el cual se cuantificó un total de 363 clones mutantes.

En aquellos grupos tratados previamente con el extracto acuoso, se observaron una reducción considerable en el número de mutaciones. La cantidad total de clones mutantes observados por concentración fueron los siguientes: a  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$  153 clones; a  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  un total de 182 clones y  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  sumó un total de 181 clones respectivamente (Tabla 1).

En todos los individuos tratados se encontraron los diferentes tipos de marcadores mutantes, los cuales fueron MSP (manchas simples pequeñas) los cuales se originan a consecuencia de eventos mutagénicos como delección, mutaciones puntuales, o no disyunciones, MSG (manchas simples grandes) también originados por eventos mutagénicos como no disyunciones, mutaciones puntuales y delecciones; y MG (manchas gemelas) el cual es un indicador de eventos de recombinaciones mitóticas las cuales pueden activar de forma inapropiada protooncogenes promoviendo la carcinogénesis (Marcos *et al.*, 2014; Sengstag, 1994) -**Fig. 1**.

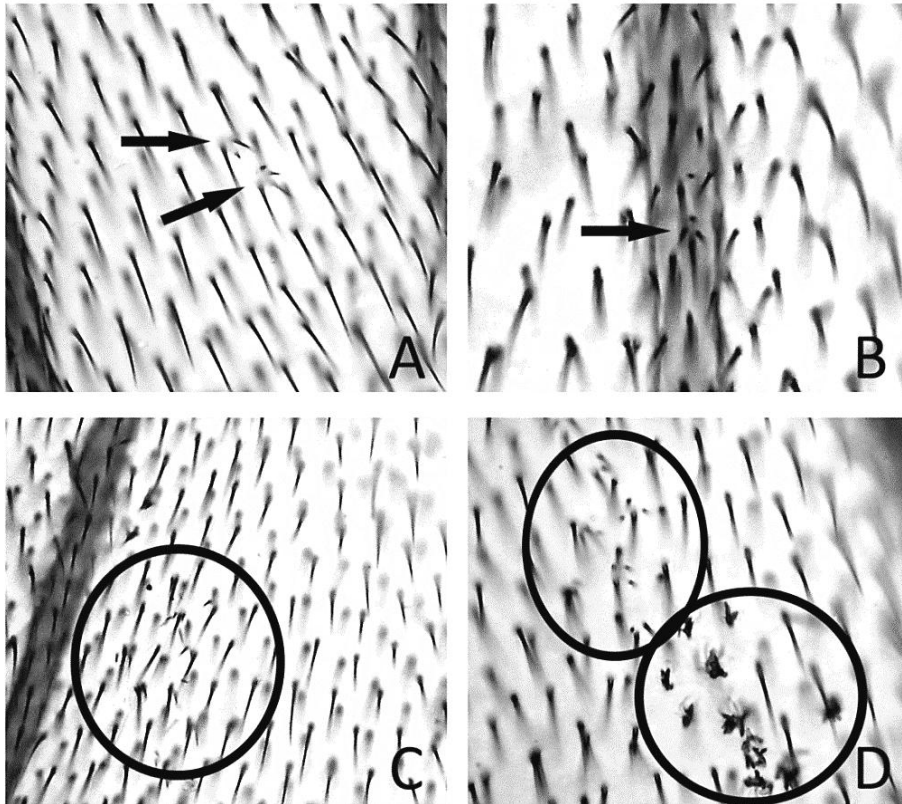
La frecuencia de aparición de clones mutantes con Ciclofosfamida fue de 36,30, una tasa muy alta en comparación con la del tratamiento con agua destilada que fue de 1,90. El tratamiento con el extracto a  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$  fue de 15,30 con una reducción de 58% de la inducción mutagénica; el extracto al  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  y el de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  con frecuencias de 18,20,

y 18,10 respectivamente, presentaron una reducción de 50%, lo que representa una disminución considerable en el número de clones mutantes. Estos porcentajes de inhibición fueron mayores que las encontradas en especies como *Capsicum annum*, *Piper nigrum*, *Ravensara aromatica* y *Ledum groenlandicum* conocidas por poseer propiedades antimutagénicas, y concuerdan con lo observado con extractos metanólicos de hojas, flores y raíces de *Stevia eupatoria* y *Stevia pilosa* en los cuales mediante el test de Ames y el método DPHH se evidenciaron acciones antimutagénicas y antioxidantes respectivamente (El Hamss *et al.*, 2003; Idaomar *et al.*, 2002; Cariño-Cortés *et al.*, 2007) -**Fig. 2**.

El rendimiento óptimo del extracto acuoso se observó a menores concentraciones siendo las frecuencias de clones tipo MSP 14,30, 15,70 y 16,20 para los tratamientos con el extracto acuoso  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente, las cuales fueron mínimas comparadas con la frecuencia del tratamiento con Ciclofosfamida (32,10). Esta disminución también se observó en los clones MSG donde las frecuencias fueron de 0,90, 2,00 y 1,60 para los tratamientos  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente. Sin embargo en los clones MG se observaron semejanzas entre las frecuencias de los grupos experimentales y testigos siendo 0,10, 0,50 y 0,30 las frecuencias para los tratamientos ( $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente).

**Tabla 1.** Número total de clones mutantes por tratamiento.

Tratamiento	Cantidad de alas	MSP	MSG	MG	TM
Control	20	10	7	2	19
Ciclofosfamida 2,61mg.mL <sup>-1</sup>	20	321	36	6	363
0,001mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61mg.mL <sup>-1</sup>	20	143	9	1	153
0,01 mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61mg.mL <sup>-1</sup>	20	157	20	5	182
0,1 mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61mg.mL <sup>-1</sup>	20	162	16	3	181



**Fig. 1:** Clones encontrados en alas de *Drosophila melanogaster* en tratamiento crónico, **A.** Manchas Simples Pequeñas (MSP), **B.** Mancha simple pequeña en el margen entre dos regiones del ala. **C.** Manchas Simples Grandes (MSG), **D.** Manchas Gemelas (MG). En **A-C.** se observan manchas del tipo *mwh*, **D.** Se observan manchas de tipo *mwh* (círculo superior) y manchas de tipo *flr<sup>3</sup>* (círculo inferior). Aumento (400X).

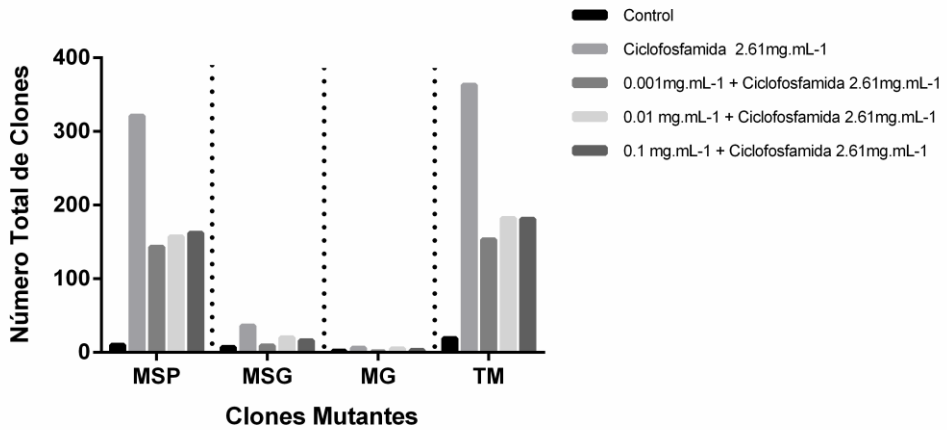


Fig. 2: Número total de clones mutantes encontrados en las alas de *Drosophila melanogaster*.

Las frecuencias de clones mutantes tipo MSP y el total de manchas (TM) en individuos tratados con las diluciones del extracto foliar de *S. rebaudiana*, son mayores que los encontrados en el control debido a que la Ciclofosfamida es un agente fuertemente mutagénico. También se observó lo mismo con clones tipo MSG, excepto en aquellas que fueron tratadas

con el extracto acuoso 0,001 mg.mL<sup>-1</sup>, donde se contabilizaron números similares de mutaciones. En los clones tipo manchas gemelas (MG) fueron observados cantidades semejantes de mutaciones a las del control, sin que pueda evidenciarse diferencias estadísticas significativas - **Tabla 2.**

**Tabla 2:** Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) en adultos trans-heterocigotas *mwh+/+flr<sup>3</sup>*.

Tratamiento	Cant. de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
Control	20	1,00 (10)	0,70 (07)	0,20 (02)	1,90 (19)	—
Ciclofosfamida 2,61 mg.mL <sup>-1</sup>	20	32,10 (321) +	3,60 (36) +	0,60 (06) i	36,30 (363) +	—
0,001mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL <sup>-1</sup>	20	14,30 (143) +	0,90 (09) i	0,10 (01) i	15,30 (153) +	58
0,01 mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL <sup>-1</sup>	20	15,70 (157) +	2,00 (20) +	0,50 (05) i	18,20 (182) +	50
0,1 mg.mL <sup>-1</sup> + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL <sup>-1</sup>	20	16,20 (162) +	1,60 (16) +	0,30 (03) i	18,10 (181) +	50

- Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$
- Incluso las manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.
- Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Los eventos antimutagénicos y antioxidantes se deben principalmente a la presencia de moléculas del tipo fenólicas, estos son productos del metabolismo secundario y se encuentran distribuidas en casi todos los órganos vegetales (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual el extracto acuoso de las hojas de *S. rebaudiana* puede actuar sobre el mutágeno antes de que éste pueda afectar al ADN, es a consecuencia de la presencia de sustancias que poseen actividades antioxidantes y por ende son considerados desmutágenos, esto concuerda con resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados con hojas de *Stevia rebaudiana*, así también con especies emparentadas como *Stevia eupatoria* y *Stevia pilosa* (Cariño-Cortés *et al.*, 2007; Kada *et al.*, 1985; Shivanna *et al.*, 2013; Zayova *et al.*, 2013).

En el caso de la *S. rebaudiana* podría atribuirse a la presencia de polifenoles, que se encuentran presentes en las hojas de la mismas, encontrándose en mayores concentraciones los derivados de Ácido hidroxibenzoico (Ácido 4-O-cafeoilquínico, Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico y Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico), Ácido clorogénico, quercetin 3-o-xylosido, Apigenin-7-O-glucosido, Ácido 3,4-Dimetoxicinámico, Luteolin 7-O-rutinosido, los cuales una vez disueltos a altas temperaturas en solvente acuoso, tienen la propiedad de interaccionar con radicales libres y moléculas mutágenas reduciendo de esta manera la actividad y el daño que puedan ocasionar al material genético (Bender *et al.*, 2015; Shivanna *et al.*, 2013; Bailey & Bailey, 1998; Kuroda & Hara, 1999).

## CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados nos sugieren que la decocción de las hojas de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones genera una interferencia sobre la acción mutagénica de la Ciclofosfamida constituyéndose de esta manera en desmutágeno de buena eficacia, sustentado así los resultados encontrados por Shivanna *et al.* (2013) y Zayova *et al.* (2013) quienes demostraron mediante bioensayos en ratas de laboratorio (*Mus musculus*) y el método de malondialdehído que las hojas de *S. rebaudiana* obtenidas tanto naturalmente como *in vitro* poseen actividades antioxidantes.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestros sinceros agradecimientos al Sr. Ángel Melgarejo Rodríguez, por permitirnos realizar la colecta en su propiedad, a la especialista botánica MSc. Claudia Pereira Sühsner del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la FACEN por su ayuda en la identificación de los ejemplares colectados.

## REFERENCIAS

- Assaei, R.; Mokarram, P.; Dastghaib, S.; Darbandi, S.; Darbandi, M.; Zal, F.; Akmal, M.; Omrani, G.H.R. 2016. Hypoglycemic Effect of Aquatic Extract of *Stevia* in Pancreas of Diabetic Rats: PPAR $\gamma$ -dependent Regulation or Antioxidant Potential. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 8(2): 65- 74.
- Bailey, P.S.; Bailey, C.A. 1998. Química Orgánica Conceptos y Aplicaciones.

- México. Pearson Prentice Hall. 502 - 534.
- Bender, C.; Graziano, S.; Zimmermann, B.F. 2015. Study of *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activities and cellular properties. *International journal of food sciences and nutrition*. 66(5): 553-558. doi: 10.3109/09637486.2015.1038223
- Cariño-Cortés, R.; Hernández-Ceruelos, A.; Torres-Valencia, J.M.; González-Avila, M.; Arriaga-Alba, M.; Madrigal-Bujaidar, E. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicology in vitro*. 21(4): 691-697. doi: 10.1016/j.tiv.2006.12.001
- El Hamss, R.; Idaomar, M.; Alonso-Moraga, A.; Serrano, A.M. 2003. Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food and chemical Toxicology* 41(1): 41-47. doi:10.1016/S0278-6915(02)00216-8
- Frei, H.; Würigler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203(4): 297-308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2
- Graf, U.; Würigler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.B.; Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis* 6(2): 153-188. doi: 10.1002/em.2860060206
- Hostettmann, K.; Gupta, M.P.; Marston, A.; Ferreira Quiroz, E. 2008. Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Colombia. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. 234 pp.
- Hubert, J.; Borie, N.; Chollet, S.; Perret, J.; Barbet-Massin, C.; Berger, M.; Daydé, J.; Renault, J.H. 2015. Intensified Separation of Steviol Glycosides from a Crude Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography. *Planta medica*. 81(17): 1614-1620. doi: 10.1055/s-0035-1545840
- Ibrahim, M.A.; Rodenburg, D.L.; Alves, K.; Perera, W.H.; Fronczek, F.R.; Bowling, J.; Mcchesney, J.D. 2016. Rebaudiosides R and S, Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of natural products*. 79(5): 1468-1472. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00048
- Idaomar, M.; El Hamss, R.; Bakkali, F.; Mezzoug, N.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Muñoz-Serrano, A.; Liemans, V.; Alonso-Moraga, A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 513(1): 61-68. doi: 10.1016/S1383-5718(01)00287-X
- Kada, T.; Kaneko, K.; Matsuzaki, S.; Matsuzaki, T.; Hora, Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: a case of the green tea factor. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 150(1): 127-132. doi:10.1016/0027-5107(85)90109-5
- Kasai, R.; Kaneda, N.; Tanaka, O.; Yamasaki, K.; Sakamoto, I.; Morimoto, K.; Okada, S.; Kitahata, S.; Furukawa, H. 1981. Sweet diterpene-glycosides of

- leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Synthesis and structure-sweetness relationship of rebaudiosides-A, D, E and their related glycosides. *Nippon Kagakukaishi* 5: 726–735 (In Japanese, English abstract). doi: 10.1246/nikkashi.1981.726
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027-5107(70)90038-2
- Kinghorn, A.D. 2002. Medicinal and aromatics plants- Industrial Profiles, Vol. 19. *Stevia The genus Stevia*. Taylor & Francis. 1-160.
- Liu, J.C.; Kao, P.K.; Chan, P.; Hsu, Y.H.; Hou, C.C.; Lien, G.S.; Hsieh M.H.; Chen Y.J.; Cheng, J.T. 2003. Mechanism of the antihypertensive effect of stevioside in anesthetized dogs. *Pharmacology* 67(1): 14-20. doi: 10.1159/000066782
- Marcos, R.; Sierra, L.M.; Gaivão, I. 2014. The SMART Assays of *Drosophila*: Wings and Eyes as Target Tissues. En *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, Ed. Sierra, L. M. & Gaivão, I., 283-295. Humana Press. New York.
- Mesa-Vanegas, A. M.; Gaviria, C.A.; Cardona, F.; Sáez-Vega, J.A.; Blair Trujillo, S.; Rojano, B.A. 2010. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15(2): 13-26.
- Mizutani, K.; Tanaka, O. 2002. *Stevia*, the genus *Stevia*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles. En *Use of Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. Ed. A. D. Kinghorn, 19: 178– 195. Taylor and Francis. London.
- Ritu, M.; Nandini, J. 2016. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(12):4231-4234. doi: 10.1002/jsfa.7627
- Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M.L.; Lehmann, M. 2004. Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Sengstag, C. 1994. The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Critical reviews in toxicology* 24(4): 323-353. doi: 10.3109/10408449409017922
- Shivanna, N.; Naika, M.; Khanum, F.; Kaul, V.K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications* 27(2): 103-113. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001
- Shock, C.C. 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's *Stevia* in California. *University of California Davis, Agronomy Progress Report* 122: 1-9.
- Smirnova, M.G. 2000. Study of physiological and toxic effects of a sweetening agent stevioside. *Voprosy pitaniia* 70(4): 41-44.
- Suttajit M.; Vinitketkaumnuen, U.; Meevatee, U.; Duangbuddhasukh, U. 1993. Mutagenicity and Human Chromosomal Effect of Stevioside, a Sweetener from *Stevia rebaudiana*



- Bertoni. *Environmental Health Perspectives Supplements* 101 (Suppl. 3): 53-56.
- Takahashi, K.; Matsuda, M.; Ohashi, K.; Taniguchi, K.; Nakagomi, O.; Abe, Y.; Mori, S.; Sato, N.; Okutani, K.; Shigeta, S. 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral research* 49(1): 15-24. doi:10.1016/S0166-3542(00)00134-0
- Wong, K.L.; Chan, P.; Yang, H.Y.; Hsu, F.L.; Liu, I.M.; Cheng, Y.W.; Cheng, J.T. 2004. Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat. *Life sciences* 74(19): 2379-2387. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.065
- Kuroda, Y.; Hara, Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 436(1): 69-97. doi:10.1016/S1383-5742(98)00019-2
- Zayova, E.; Stancheva, I.; Geneva, M.; Petrova, M.; Dimitrova, L. 2013. Antioxidant activity of in vitro propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. *Turkish Journal of Biology* 37(1): 106-113. doi:10.3906/biy-1204-64.





**CONTENIDO POR SECCIONES**

**Micología**

59 - 67 Evaluación del crecimiento de macrohongos de interes biotecnológico en residuos agroindustriales y maderero  
*Campi, M.; Grassi, E.; Armoa, J.; Campuzano, E.; López, T.; Mancuello, C.; Martínez, M.*

68 - 74 *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (Agaricaceae-Basidiomycota), hongo de interés medicinal y gastronómico, nueva cita para el Paraguay  
*Campi, M.; Miranda, B.; Maubet, Y.*

**Morfo-anatomía Vegetal**

75 - 83 Morfo-anatomía foliar y caulinar de *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae)  
*Pereira Sühnsner, C.D.; Ferrucci, M.S.; Honfi, A.I.*

84 - 91 Morfo-anatomía de los órganos vegetativos y arquitectura foliar de *Gamochoaeta americana* (Mill.) Wedd. (Asteraceae) de uso medicinal en Paraguay  
*González, F.; Pereira Sühnsner, C.D.; Benítez, B.; Soria, N.*

**Toxicología**

92 - 101 Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*  
*Gayozo, E.; Rivarola, C.; Núñez, C.; Marín Insfrán, L.*