

Efecto del 6-BAP y el tiempo de inmersión en la multiplicación de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl en sistemas de inmersión temporal

Yudith García Ramírez¹, Marisol Freire Seijo¹, Raúl Barbón¹, Sinesio Torres García²

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara, CP 54830, Villa Clara. Cuba

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba
✉ yudith@ibp.co.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Las plantas de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl constituyen una opción viable para generar beneficios medioambientales, sociales y económicos. Sin embargo, existen problemas para la propagación vía organogénesis de la especie, tales como el bajo coeficiente de multiplicación *in vitro*. La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la 6-bencilaminopurina y del tiempo de inmersión en la multiplicación, morfofisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* en sistemas de inmersión temporal. Se evaluaron variables morfofisiológicas y bioquímicas en los brotes cultivados bajo tres concentraciones de 6-BAP (6.6; 13.2 y 26.4 μM) y sin él, y tiempos de inmersión de uno, dos y tres minutos, durante 30 días de cultivo. En estos sistemas la menor concentración de 6-BAP (6.6 μM) y un tiempo de inmersión de dos minutos favorecieron la emisión de nuevos brotes, lo cual se asoció a un incremento en el contenido de clorofilas totales, lignina y fenoles totales en los brotes. A partir de los resultados se estableció un protocolo de propagación vía organogénesis de plantas de *B. vulgaris* en sistemas de inmersión temporal, con una alta emisión de nuevos brotes *in vitro*, el cual puede ser aplicado a otras especies de bambúes, y específicamente a *B. vulgaris*.

Palabras clave: Bambú, bioquímica, fisiología, morfología, propagación *in vitro*

ABSTRACT

Effect of BAP and immersion time on shoot multiplication of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl in temporary immersion system. Plants of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl are a viable option to generate environmental, social and economic benefits. However, there are problems in the propagation via organogenesis of this species such as the low *in vitro* multiplication coefficient, which limits its propagation. The research was aimed to determine the effect of 6-benzylaminopurine and the immersion time on the multiplication, morphophysiology and biochemistry of *B. vulgaris* shoots in temporary immersion systems. Morphophysiological and biochemical variables were evaluated in shoots grown at different BAP concentrations (0; 6.6; 13.2 and 26.4) at immersion times of one, two or three minutes, for 30 days of cultivation. In those systems, the lower concentration of BAP (6.6 μM) and immersion time of two minutes favored the emission of new shoots. It was associated with an increase in the content of total chlorophylls, lignin and total phenols in shoots. Based on these results, a protocol was established for the propagation via organogenesis of *B. vulgaris* plants in Temporary Immersion Systems, with a high emission of new shoots *in vitro*, which can be applied to other bamboo species.

Keywords: Bamboo, biochemistry, *in vitro* propagation, morphology, physiology

How to cite (Vancouver style):

García-Ramírez Y, Freire-Seijo M, Barbón R, Torres-García S. Efecto del 6-BAP y el tiempo de inmersión en la multiplicación de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnol Apl.* 2021;38(3):3201-5.

Introducción

Bambusa vulgaris Schrad. ex Wendl (*B. vulgaris*) es la especie mejor adaptada a los ecosistemas cubanos y es capaz de crecer en suelos con poca capacidad productiva. La misma aparece en la lista de especies forestales priorizadas para utilizar en las estrategias de plantaciones a escala comercial en el país [1].

No obstante, la regeneración natural de esta especie se ve afectada por la floración esporádica y por la baja viabilidad de la semilla. Del mismo modo, la propagación vegetativa por la división de los rizomas se obstaculiza por las bajas tasas de enraizamiento y la escasa disponibilidad de propágulos. Las razones anteriormente expuestas afectan la disponibilidad de posturas para la reforestación en Cuba. Como una alternativa a las limitaciones en la propagación vegetativa de esta especie, los métodos biotecnológicos

permiten obtener un mayor número de plantas en un corto período de tiempo [2].

La organogénesis es el método más abordado en las investigaciones relacionadas con la propagación *in vitro* de los bambúes. En la literatura científica se describen protocolos en diferentes especies de bambúes [3]. Sin embargo, se obtienen resultados con un bajo coeficiente de multiplicación de los brotes en condiciones *in vitro*.

En la búsqueda de posibles soluciones se han estudiado y diferentes estrategias se han puesto en práctica para elevar los coeficientes de multiplicación. En este sentido, Ramanayake *et al.* [4] evaluaron la influencia de citoquininas como la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) sola o combinada con otros reguladores del crecimiento en la multiplicación de brotes

1. MINAG. Lista oficial de variedades comerciales 2017-2018. Registro de variedades comerciales de certificación de semillas. 10. Especies Forestales. La Habana: MINAG; 2017.

2. Cordero-Miranda E. Propuesta para el manejo sostenible de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl con objetivo protector en diferentes condiciones ecológicas del río Cuyaguatete, Pinar del Río. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Ecológicas, Universidad de Pinar del Río, Pinar del Río; 2010.

3. Sandhu M, Wani S, Jiménez V. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: A review. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2018;132(1): 27- 53.



in vitro de *B. vulgaris*. Estos autores demostraron que el 6-BAP influye en la multiplicación y morfología de los brotes. Otras investigaciones informaron que el empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) favorece el incremento del coeficiente de multiplicación en otras especies de plantas [5]. A lo anterior se adiciona que las condiciones de cultivo en los SIT mejoran la morfo-fisiología y la anatomía de las plantas, previo a la transferencia a la fase de aclimatización *ex vitro* [6]. Holst Sanjuán [7] estudió el efecto del tiempo de inmersión en la multiplicación de brotes de la especie de bambú *Guadua angustifolia* Kunth en SIT tipo RITA. Este autor demostró que dicho factor influye en la morfología de los nuevos brotes multiplicados *in vitro*.

A partir de los estudios mencionados, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del 6-BAP y el tiempo de inmersión en la multiplicación, morfo-fisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* en sistemas de inmersión temporal.

Materiales y métodos

Efecto del 6-BAP

El objetivo del estudio fue determinar el efecto del 6-BAP en la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT. Para ello, se empleó el medio de cultivo de multiplicación compuesto por el 100 % de las sales MS [8]; 100 mg/L de mioinositol y 30 g/L de sacarosa, y tres concentraciones de 6-BAP (6.6; 13.2 y 26.4 μM). Se aplicó un tratamiento sin regulador del crecimiento como control negativo.

Se empleó brotes *in vitro* como material vegetal, procedentes de la fase de multiplicación en medio de cultivo líquido estático entre el sexto y octavo subcultivo. Se definió como explante a un grupo de tres brotes con al menos un par de hojas expandidas en cada brote. Los brotes cultivados *in vitro* se colocaron en cámaras de crecimiento de luz solar, temperatura de 27 ± 2 °C con un período luminoso de 13/11 h de luz/oscuridad y un rango de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre 48 y 62.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, medido con un Luxómetro Exttech 401025 (Exttech Instruments, EE.UU.).

Se empleó el SIT compuesto por dos frascos de cristal de 1.5 L de capacidad, uno utilizado como reservorio de medio de cultivo y otro como frasco de cultivo para el crecimiento del material vegetal [6]. En este experimento se colocaron 12 explantes por SIT, cuatro SIT por tratamiento y se realizaron dos repeticiones en el tiempo para las evaluaciones de las variables morfofisiológicas y bioquímicas a los 30 días de cultivo.

Para la evaluación de las variables morfo-fisiológicas se seleccionó al azar diez explantes por SIT, y los datos se obtuvieron de la evaluación de 80 explantes por tratamiento. Como variables morfofisiológicas se evaluaron el número de brotes por explante, el número de hojas expandidas por brote, la longitud del brote (cm) y el contenido de agua, así como el contenido de clorofilas totales ($\mu\text{g}/\text{g}$ MF). La longitud de los brotes se midió con un pie de rey, desde la base de estos hasta el punto de inserción de la primera hoja.

El contenido de agua (CA) se calculó mediante la fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* [9]. Como

variables bioquímicas se cuantificó el contenido de fenoles totales y lignina. Para la determinación de las variables anteriormente mencionadas y el contenido de clorofilas totales se tomó al azar 10 muestras por SIT, para un total de 80 muestras por tratamiento. Cada muestra estuvo conformada por dos explantes completos, los que se pulverizaron individualmente en nitrógeno líquido con ayuda de mortero y pistilo preenfriado hasta obtener un polvo fino. A continuación, el tejido macerado y congelado de cada muestra se mezcló en igual proporción y se conservó en tubo Falcon de 14 mL a -80 °C hasta su procesamiento. Cada tubo contenía aproximadamente 1.5 g de muestra.

El contenido de clorofilas totales se cuantificó según el protocolo propuesto según por Mahmood *et al.* [10], y el de fenoles totales se determinó acorde al procedimiento descrito por Bray y Thorpe [11]. El contenido de lignina se cuantificó según el método sugerido por Kirk y Obst [12].

Efecto del tiempo de inmersión

Se estudiaron tres tiempos de inmersión: uno, dos y tres minutos. El material vegetal, las condiciones de cultivo, el medio de cultivo, el diseño experimental y las evaluaciones de las variables morfofisiológicas y bioquímicas utilizadas fueron similares a las descritas en el acápite anterior. Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo donde se evaluó la concentración de 6-BAP.

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el Programa SPSS versión 18, para el sistema operativo Windows (Microsoft Inc., EE.UU.). Previamente se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Los análisis de las diferentes variables evaluadas se realizaron a través de una prueba ANOVA de un factor y la diferencia entre las medias de las variables en cada experimento se determinó por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Efecto del 6-BAP

Se determinó el efecto del 6-BAP en la multiplicación, morfofisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en los SIT. En el tratamiento con 6.6 μM de 6-BAP se alcanzó el mayor número de brotes por explante, con diferencias significativas respecto al resto de las concentraciones estudiadas y al tratamiento sin 6-BAP (Tabla 1).

Para las variables del número de hojas expandidas por brote y la longitud del brote (cm) los mayores valores se obtuvieron en los brotes cultivados en un medio de cultivo con la menor concentración de 6-BAP (6.6 μM), con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos evaluados. No obstante, los brotes cultivados con 13.2 μM de 6-BAP y sin 6-BAP mostraron una respuesta similar, sin diferencias significativas para ambas variables, pero con diferencias significativas en comparación con los brotes cultivados a 26.4 μM de 6-BAP.

Con la menor concentración de 6-BAP (6.6 μM) se favoreció la morfología de los brotes de *B. vulgaris*.

4. Ramanayake S, Meemaduma V, Weerawardene T. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* Striata). *Scientia Horticult.* 2006;110(1):109-13.

5. Carvalho L, Ozudogru E, Lambardi M, Paiva L. Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a Bibliographic and Systematic Review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.* 2019;47(2):269-77.

6. Quiala E. Efecto de la 6-bencilaminopurina en la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal (Tesis de doctorado, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas; 2012).

7. Holst Sanjuán A. Efecto del sistema de inmersión temporal (RITA®) sobre el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatización. (2010); pp 21-29.

8. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473-97.

9. Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K. Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of Teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2004;78(2):113-21.

10. Mahmood M, Bidabadi S, Ghobadi C, Gray D. Effects of methyljasmanate treatment on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. Berangan, AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regulation.* (2012); 68(2):161-9.

11. Bray H, Thorpe W. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Methods Biochem Anal.* 1954:27-52.

12. Kirk T, Obst J. Lignin determination. *Methods Enzymol.* 1988;161:87-10.

En cambio, con 26.4 μM de 6-BAP se observó una baja calidad morfológica, lo que podría relacionarse con lo descrito por Ramanayake *et al.* [4] para esta especie. Esta respuesta pudiera explicarse si se tiene en cuenta que los brotes inoculados en los SIT provenían de un medio de cultivo líquido estático con 13.2 μM de 6-BAP, los cuales fueron inoculados en estos sistemas con 26.4 μM de 6-BAP. En consecuencia, en dichos brotes se pudo inducir un estrés, probablemente por una sobreacumulación de citoquinina, lo cual pudo reducir la acción de las citoquininas endógenas e inhibir la formación de nuevos brotes [13]. Por lo tanto, dichos resultados podrían validar la respuesta alcanzada en los brotes cultivados con 26.4 μM de 6-BAP, ya que en estos se pudiera manifestar mayor afectación por estrés en comparación con el resto de los tratamientos estudiados.

Los resultados de este estudio difieren de los informados por Holst Sanjuán [7] en *G. angustifolia*. Dicho autor informó diferencias morfológicas cuando utilizó una concentración de 13.2 μM de 6-BAP. Además, observó la presencia de brotes cloróticos y un menor número de brotes por explante [12] en SIT tipo RITA, en comparación con los resultados alcanzados en esta investigación.

Al cuantificar el contenido de agua en los brotes de *B. vulgaris* los menores valores se obtuvieron en el tratamiento sin 6-BAP, con diferencias significativas con las restantes concentraciones de 6-BAP. No obstante, se hace necesario resaltar que en los tratamientos con 6-BAP los menores valores en la variable anteriormente mencionada se alcanzaron en los brotes cultivados con 6.6 μM de 6-BAP, con diferencias significativas con respecto a los tratamientos a 13.2 y 26.4 μM de 6-BAP. Del mismo modo, con la menor concentración de esta citoquinina se alcanzaron los mayores valores en las demás variables morfológicas evaluadas. Estos resultados ratificaron lo observado por Quiala *et al.* [14] en brotes de *Tectona grandis* L., cultivados en SIT. Ellos manifestaron que la menor concentración de 6-BAP en el medio de cultivo aumentó la calidad morfológica de los brotes.

Al analizar el contenido de clorofilas totales en los brotes de *B. vulgaris*, el mayor valor de esta variable se registró en el tratamiento con 6.6 μM de 6-BAP, con diferencias significativas en comparación con las restantes concentraciones evaluadas y el tratamiento sin 6-BAP (Tabla 1). Según Dobránszki y Mendler-Drienyovszki [15], las citoquininas juegan un papel importante en el desarrollo y la diferenciación estructural de los cloroplastos, así como en el crecimiento de los brotes *in vitro* de *Malus domestica* Borkh. Por tal motivo, esos autores resaltaron la importancia de optimizar la concentración de este regulador del crecimiento en cada especie de planta.

En tal sentido, Cortleven y Schmölling [16] revelaron que las altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo afectan el desarrollo de los cloroplastos y con ello el contenido de clorofila en diferentes especies. En correspondencia con lo anteriormente descrito, se pudiera sugerir que dicha afectación sea el resultado del efecto negativo de las altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo. Al respecto, Martins *et al.* [17] encontraron

Tabla 1. Efecto de la concentración de 6-BAP en la morfo-fisiología de brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistemas de inmersión temporal a los 30 días de cultivo*

Tratamiento con 6-BAP (μM)	Número de brotes/explante	Número de hojas expandidas / brote	Longitud del brote (cm)	Contenido de agua (%)	Contenido de clorofilas totales ($\mu\text{g/g}$ MF)
0	11.55 \pm 0.24c	14.55 \pm 0.25b	6.81 \pm 0.21b	88.21 \pm 0.69d	88.21 \pm 0.69d
6.6	24.45 \pm 0.26a	20.60 \pm 0.44a	9.39 \pm 0.33a	91.11 \pm 0.19c	91.11 \pm 0.19c
13.2	20.85 \pm 0.27b	16.05 \pm 0.38b	7.61 \pm 0.21b	92.65 \pm 0.63b	92.65 \pm 0.63b
26.4	8.71 \pm 0.23d	10.40 \pm 0.28c	4.79 \pm 0.18c	94.54 \pm 0.35a	94.54 \pm 0.35a

* Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ ($n = 80$).

en *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith que la mayor concentración de 6-BAP (20.0 μM) afectó la actividad del fotosistema II (FSII) en esa especie, lo cual podría afectar el contenido de clorofilas totales. Ello pudiera justificar los menores valores alcanzados en el contenido de clorofilas totales en los brotes de *B. vulgaris* cultivados con la mayor concentración de 6-BAP (26.4 μM) respecto al resto de los tratamientos evaluados en el presente estudio.

A su vez, los resultados obtenidos se relacionaron con los descritos por Dewir *et al.* [18] en *Spathiphyllum cannifolium* Dryand. Esos autores señalaron que la menor concentración de 6-BAP (4.4 μM) empleada en su investigación incrementó el contenido de clorofilas totales y favoreció la morfología de los brotes cuando utilizaron diferentes tipos de sistemas de inmersión. También, notificaron que en estos frascos de cultivo se logra una mejor asimilación de nutrientes por explante, lo cual posibilitó un mejor desarrollo morfológico de los brotes de la especie mencionada.

Al estudiar el efecto de la concentración de 6-BAP sobre la respuesta bioquímica de los explantes se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Figura 1A y B). Tanto para el contenido de fenoles totales como para el contenido de lignina, los mayores valores se alcanzaron cuando se empleó 6.6 μM de 6-BAP, con diferencias significativas respecto a las concentraciones de 13.2 y 26.4 μM de 6-BAP, así como el tratamiento sin 6-BAP. Quiala *et al.* [14] describieron que el 6-BAP afecta el metabolismo de los fenoles y la lignina, y que el contenido de fenoles es menor en los brotes cultivados con altas concentraciones de 6-BAP. En tal sentido, en respuesta al estrés se produce una acumulación de compuestos

13. Rosa W, Martins J, Rodrigues E, de Almeida Rodrigues L, Gontijo A, Falgueto A. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2018;133(3):339-50.

14. Quiala E, Cañal M, Mejió M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;109(2):223-34.

15. Dobránszki J, Mendler-Drienyovszki N. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. *J Plant Physiol.* 2014;171(16):1472-8.

16. Cortleven A, Schmölling T. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *J Exp Bot.* 2015;66(16):4999-5013.

17. Martins J, Santos E, Rodrigues L, Gontijo A, Falgueto A. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. *Biol Plant.* 2018;62(4):793-800.

18. Dewir Y, Chakrabarty D, Hahn EJ, Paek K. A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In Vitro Cell Develop Biol Plant.* 2006;42(3):291-7.

19. Sharma P, Jha A, Dubey R, Pesarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botany.* 2012;107(11):1811-22.

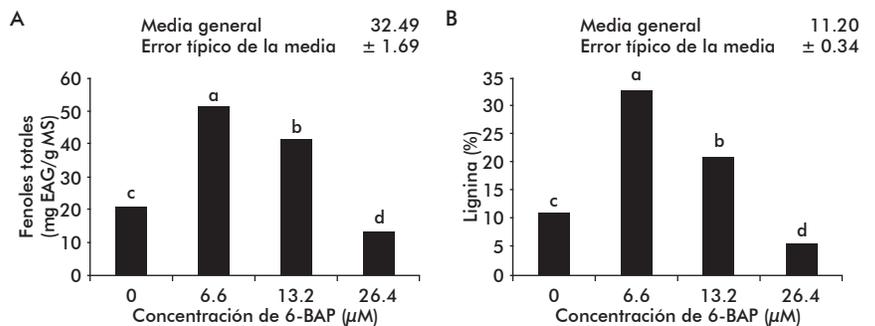


Figura 1. Contenido de compuestos en brotes *in vitro* de *B. vulgaris* cultivados en los SIT en respuesta a diferentes concentraciones de 6-BAP, a los 30 días de cultivo fenoles totales. A) Fenoles totales. B) Lignina. Barras con letras no comunes difieren significativamente entre tratamientos según la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ ($n = 80$). EAG: equivalentes de ácido gálico. MS: masa seca.

fenólicos en la planta, los cuales, dado su carácter antioxidante, desempeñan un papel protector para las células ante la peroxidación lipídica al eliminar directamente las especies reactivas de oxígeno (EROS) [19].

Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas a través de la vía fenilpropanoides, y funcionan como un mecanismo de defensa que reacciona a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico [20]. Además, se ha informado que los antioxidantes son moléculas lo suficientemente estables como para retrasar o inhibir el daño celular, principalmente a través de su propiedad de donar un electrón a un radical libre agresivo y neutralizarlo [21]. De acuerdo con lo anteriormente expuesto y los resultados obtenidos en este trabajo, se podría sugerir que los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 6.6 μM de 6-BAP pudieran alcanzar una mayor capacidad antioxidante. Ello se debería al aumento del contenido de fenoles totales en comparación con los brotes cultivados con 13.2 y 26.4 μM de 6-BAP, así como en el tratamiento sin 6-BAP.

Por otro lado, Mamedes Rodrigues *et al.* [22] determinaron en otra especie *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. (Line Bd21) que la biosíntesis de la pared celular secundaria en vasos y fibras es regulada por el 6-BAP. Por consiguiente, demostraron que esta citoquinina afecta la actividad de la Fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima involucrada en la lignificación. Por lo tanto, el mayor contenido de lignina alcanzado en los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 6.6 μM de 6-BAP pudiera revelar que la pared celular de estos brotes podría estar más lignificada por la deposición de lignina. Esto podría indicar que en dichos brotes se puede proporcionar mayor resistencia en los tejidos vasculares. Estos resultados pudieran corroborar que los brotes cultivados con la menor concentración de 6-BAP mostraron una mejor respuesta morfo-fisiológica y bioquímica, proporcionado por los mayores valores en el número de brotes por explante, contenido de clorofilas totales, fenoles totales y lignina, en comparación con el resto de los tratamientos estudiados.

En tal sentido, Quiala [6] refirió que la calidad morfo-fisiológica y bioquímica de los brotes de *T. grandis* L., cultivados en los SIT pudiera estar relacionada con la concentración de citoquinina. Este autor sugirió que el aumento de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo produce un estrés oxidativo en los brotes, lo cual pudiera inhibir la actividad enzimática dependiente del H_2O_2 y las peroxidases. Ambos factores participan en la xilogénesis y la lignificación de las paredes celulares, y a la vez juegan un importante papel en la defensa antioxidante.

Al integrar los resultados alcanzados en nuestra investigación, se podría inferir que las condiciones que se crean en los SIT en un medio de cultivo con 6.6 μM de 6-BAP, provocaron la formación de EROS en los brotes *in vitro*. Sin embargo, los niveles de EROS pudieran inducir daños oxidativos en menor medida, lo cual favorece la síntesis de clorofila y reduce la peroxidación lipídica. Estas evidencias están sustentadas por los mayores valores en el número de brotes por explante, el número de hojas expandidas por brote, la longitud del brote, el contenido de clorofilas totales, los fenoles totales y la lignina.

Por otra parte, en los brotes cultivados con 26.4 μM de 6-BAP se pudiera incrementar la formación de EROS e inducir el estrés oxidativo. Esto pudiera aumentar la degradación de la clorofila y la peroxidación lipídica de la membrana, así como reducir la capacidad antioxidante en los brotes al disminuir el contenido de fenoles totales e inhibir la actividad de enzimas que participan en la lignificación de la pared celular. Todo ello justifica los resultados obtenidos en este acápite, donde se alcanzó el mayor contenido de agua y los menores valores del resto de las variables morfofisiológicas estudiadas.

Efecto del tiempo de inmersión

Se determinó que el tiempo de inmersión influyó en la multiplicación, morfo-fisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en los SIT. Los mayores valores en el número de brotes por explante, el número de hojas expandidas por brote, la longitud del brote y contenido de clorofilas totales se obtuvieron con un tiempo de inmersión de 2 min, con diferencias significativas respecto a los tiempos de inmersión de 1 y 3 min, respectivamente (Tabla 2).

En cuanto al contenido de agua, los mayores valores se alcanzaron en los brotes cultivados *in vitro* con el mayor tiempo de inmersión (3 min), con diferencias significativas respecto a los tiempos de inmersión de 1 y 2 min. Estos dos últimos tratamientos mostraron una respuesta similar, sin diferencias significativas entre ellos. Los brotes cultivados con 3 min mostraron un 100 % de brotes hiperhídricos (BH). Es importante destacar que esta característica solo se observó en dicho tratamiento, lo cual podría indicar que el incremento del tiempo de inmersión provocó cambios en la morfología de los brotes *in vitro* de *B. vulgaris*.

Se demostró que en los brotes cultivados con un tiempo de inmersión de 2 min se lograron los mayores valores en las variables morfológicas analizadas, sin la presencia de hiperhidricidad. En cambio, con 3 min se obtuvieron los menores valores en estas variables y se observó la presencia de BH. La baja calidad morfológica alcanzada en los BH podría deberse al efecto negativo del incremento de los tiempos de inmersión en la morfología de los brotes según lo descrito por Matre *et al.* [23]. En dichos estudios se describió que tiempos prolongados de inmersión afectaron el desarrollo morfológico de los explantes, a causa de un incremento de la hiperhidricidad y el estrés oxidativo. En consecuencia, se podría sugerir que los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 3 min pudieran mostrar un mayor estrés oxidativo con relación a los brotes cultivados con 1 y 2 min.

A su vez, nuestros resultados difieren de lo informado por Holst Sanjuán [7] para *G. angustifolia*. En dicho

20. Dixon, R, Paiva N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995;7(7):1085-97.

21. Grace S. Phenolics antioxidants. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff N (Editors). London: Blackwell Publishing LTD, UK; 2005. p. 141-68.

22. Mamedes-Rodrigues T, Batista D, Napoleão T, Fortini E, Cruz A, Costa M, et al. Regulation of cell wall development in *Brachypodium distachyon in vitro* as affected by cytokinin and gas exchange. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2019;136(2): 207-19.

23. Martre P, Lacan D, Just D, Teisson C. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2001;67(1):25-35.

Tabla 2. Efecto del tiempo de inmersión sobre la morfofisiología de brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistemas de inmersión temporal a los 30 días de cultivo*

Tratamiento con 6-BAP (μM)	Número de brotes/ explante	Número de hojas expandidas / brote	Longitud del brote (cm)	Contenido de agua (%)	Contenido de clorofilas totales ($\mu\text{g/g}$ MF)
1	24.3 \pm 0.25b	16.80 \pm 0.64b	8.91 \pm 0.20b	90.96 \pm 0.14b	120.24 \pm 0.76b
2	27.9 \pm 0.30a	20.03 \pm 1.21a	10.35 \pm 0.23a	90.76 \pm 0.16b	140.87 \pm 0.78a
3	8.85 \pm 0.25c	12.15 \pm 0.41c	5.51 \pm 0.11c	92.63 \pm 0.30a	60.85 \pm 0.77c

* Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ ($n = 80$).

estudio no se encontró diferencias en el número de brotes ni en el índice de clorofila en los brotes cuando se estudió dos tiempos de inmersión (1 y 2 min) en SIT tipo RITA [17]. Sin embargo, en nuestro estudio, con un tiempo de inmersión de 2 min se alcanzaron los mayores valores para las variables anteriormente mencionadas. Al respecto, González *et al.* [24] comprobaron en *Eucalyptus globulus* L. que el número de BH se redujo en los brotes cultivados en SIT con 1 min, respecto a los brotes procedentes del tratamiento con 3 min. Esto podría estar dado por el empleo de prolongados tiempos de inmersión, los cuales favorecieron la hiperhidricidad en los brotes.

En los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 2 min de inmersión se obtuvieron los mayores valores en el contenido de clorofilas totales. No obstante, todo lo contrario ocurrió en los BH obtenidos con 3 min, los cuales mostraron una disminución significativa en el contenido de este pigmento fotosintético. En este sentido, se ha descrito que, en comparación con los brotes sin hiperhidricidad, los BH se caracterizaron por tener menor contenido de clorofilas totales, lo que podría ser provocado por los efectos nocivos de las EROS. Asimismo, se sugirió que dichas condiciones pudieran provocar una alteración de la homeostasis redox celular y daños en los cloroplastos [25].

Al respecto, Isah [26] refirió que en los BH se incrementan los niveles de EROS, los cuales pueden afectar la membrana en los componentes del sistema fotosintético II y el efecto resultante sería daños oxidativos en los cloroplastos. Por lo tanto, dicha información pudiera justificar la respuesta alcanzada en los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 3 min de inmersión, los cuales mostraron daños en los pigmentos fotosintéticos por la hiperhidricidad. Esto se relacionó además con los menores valores en la longitud, el número de brotes y hojas por explante, así como el incremento del contenido de agua en estos brotes. Por esta razón, se podría sugerir que los brotes cultivados con 3 min muestran una baja calidad morfofisiológica en comparación con los brotes obtenidos con 1 y 2 min.

Al estudiar el efecto del tiempo de inmersión sobre la respuesta bioquímica de los explantes, se observó diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Figura 2 A y B). Tanto para el contenido de fenoles totales como para el contenido de lignina, los mayores valores se obtuvieron con 2 min de inmersión, con diferencias significativas respecto a los tiempos de inmersión de 1 y 3 min. En este sentido, Kevers *et al.* [27] informaron que la hiperhidricidad induce cambios bioquímicos, dentro de ellos el metabolismo de los fenoles y la síntesis de lignina, y los brotes con un desarrollo normal. Al respecto, se ha descrito que los compuestos fenólicos forman parte del sistema de defensa antioxidante y por tanto son capaces de eliminar o inactivar de forma efectiva las EROS [21].

De acuerdo con el criterio anterior y los resultados alcanzados en este trabajo, se puede sugerir que los brotes de *B. vulgaris* cultivados durante 2 min de inmersión con 6-BAP podrían lograr mayor capacidad antioxidante, dado por el incremento en el contenido de fenoles totales en relación con los brotes cultivados con 1 y 3 min. En tal sentido, Dewir *et al.* [28] notificaron que las propiedades y la composición de la pared

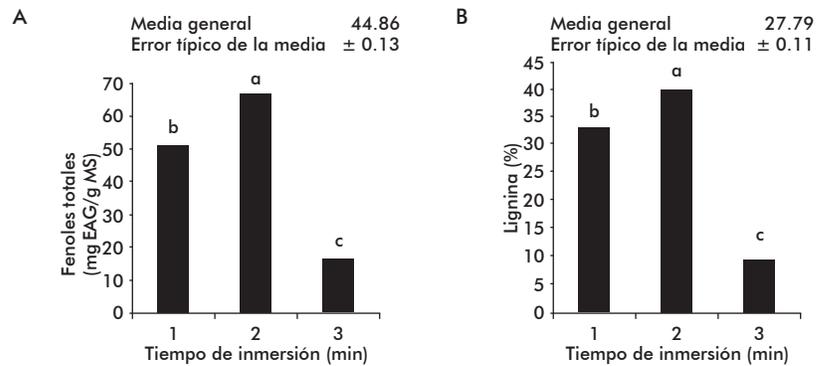


Figura 2. Contenido de compuestos en brotes *in vitro* de *B. vulgaris* cultivados en los SIT en respuesta a diferentes tiempos de inmersión, a los 30 días de cultivo fenoles totales. A) Fenoles totales. B) Lignina. Barras con letras no comunes difieren significativamente entre tratamientos según la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$ ($n = 80$). EAG: equivalentes de ácido gálico. MS: masa seca.

celular pueden considerarse uno de los factores más importantes, ya que controlan el desarrollo y la morfología de los brotes *in vitro*. Por ello, se indicó que la hipolignificación en los tejidos vasculares, como consecuencia de una reducción en la biosíntesis de celulosa y lignina, puede alterar las propiedades mecánicas de la pared celular, lo cual podría ser una de las causas de la hiperhidricidad.

En correspondencia con los resultados anteriormente descritos, se pudiera deducir que los brotes de *B. vulgaris* cultivados con 3 min de inmersión podrían mostrar un tejido vascular poco lignificado. Como consecuencia, dicho tejido sería menos eficiente para conducir el agua y los nutrientes en comparación con los brotes cultivados con 1 y 2 min de incubación. Por lo tanto, el mayor contenido de lignina obtenido en los brotes cultivados con 2 min pudiera indicar una mayor lignificación en la pared celular de estos brotes.

Como resultado de la comparación de los diferentes tratamientos evaluados en este acápite se pudiera plantear que el tiempo de inmersión indujo cambios en la morfofisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en los SIT. El tiempo de inmersión de 3 min aumentó la hiperhidricidad en los brotes, lo que provocó un estrés oxidativo en ellos y afectó la morfología, el contenido de clorofilas totales, fenoles totales y lignina. Todo lo contrario ocurrió en los brotes cultivados con 1 y 2 min de inmersión, en los cuales se favoreció los valores de las variables morfofisiológicas y bioquímicas estudiadas.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio permitieron solucionar problemas relacionados con la baja tasa de multiplicación en brotes de *B. vulgaris*. En los SIT con una concentración de 6.6 μM de 6-BAP y un tiempo de inmersión de 2 min, se logra el mayor número de brotes por explante, número de hojas expandidas por brote, longitud del brote, contenido de clorofilas totales, fenoles totales y lignina en los brotes de *B. vulgaris*. Los resultados obtenidos sientan las bases para el desarrollo de una tecnología de propagación *in vitro* para esta especie, con vistas a contribuir a los planes de reforestación del país.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

24. Gonzalez R, Rios S, Avilés F, Sánchez-Olate M. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion system. *Bosque*. 2011;32(2):147-54.

25. Tian J, Jiang F, Wu Z. The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2015;120(2):571-84.

26. Isah T. Changes in the biochemical parameters of albino, hyperhydric and normal green leaves of *Caladium bicolor* cv "Bleeding hearts" *in vitro* long-term cultures. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2019;191:88-98.

27. Kevers C, Franck T, Strasser R, Dommes J, Gaspar T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2004;77(2):181-91.

28. Dewir Y. Biochemical and physiological aspects of hyperhydricity in liquid culture system. In: Paek K-Y, Murthy HN, Zhong ZZ (Eds.). *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology*. Dordrecht: Springer; 2014. p. 693-709.