

## Multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad criolla en sistemas de inmersión temporal

### *In vitro* multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion systems

Jorge Liusvert Pérez-Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3372-7559>, Maylín Fonseca-Yero<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9566-0751>, Marisel Bahi-Arevich<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6822-2492>, Juan José Silva-Pupo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1049-5740> and Stefaan Werbrouck<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5195-7054>

<sup>1</sup> Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17,5 Peralejo, CP 85100, Bayamo, Granma, Cuba. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17,5 Peralejo, CP 85100, Bayamo, Granma, Cuba. <sup>3</sup> Laboratory of Applied In Vitro Plant Biotechnology, Ghent University. Campus Schoonmeersen C4.52 Valentin Vaerwyckweg 1, 9000 Ghent, Belgium. Correo electrónico: [jperez@udg.co.cu](mailto:jperez@udg.co.cu)

## Resumen

**Objetivo:** Evaluar la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L., variedad Criolla, en sistemas de inmersión temporal (SETIS™).

**Materiales y Métodos:** Se realizaron dos experimentos para la evaluación de tres tiempos de inmersión (1,0; 3,0; 5,0 min.) y tres frecuencias de inmersión cada cuatro, seis y ocho horas. Posteriormente, se desarrolló otro experimento para el análisis de la respuesta morfológica de los brotes, a los 28, 45 y 60 días de cultivo. Se empleó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones en todos los experimentos.

**Resultados:** Los resultados relacionados con el tiempo de inmersión mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas para  $p < 0,05$ , excepto en el número de brotes. Además, se encontró que el mayor número de yemas axilares se obtuvo en el tiempo de inmersión de tres minutos, con un valor de 4,67. Mientras, en la longitud de los brotes, el máximo valor se logró con tres minutos de inmersión (3,0 cm) con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al resto de los tratamientos. Con el empleo de los sistemas de inmersión temporal, con tres minutos de inmersión cada ocho horas, durante 45 días de cultivo, se obtuvo el mayor número de yemas axilares y 1,90 brotes; la longitud de los brotes alcanzó 9,82 cm.

**Conclusiones:** En los brotes no se observaron cambios morfofisiológicos, atribuidos a las condiciones de cultivo. Se demostró que es posible la micropropagación *in vitro* de morera, variedad Criolla, en sistemas de inmersión temporal SETIS™.

**Palabras clave:** biorreactores, cultivo de tejidos, *Morus alba*, sustancia de crecimiento vegetal

## Abstract

**Objective:** To evaluate the *in vitro* multiplication of *Morus alba* L., Criolla variety, in temporary immersion systems (SETIS™).

**Materials and Methods:** Two trials were conducted for the evaluation of three immersion times (1,0; 3,0; 5,0 min.) and three immersion frequencies every four, six and eight hours. Afterwards, another experiment was conducted for the analysis of the morphological response of the sprouts, at 28, 45 and 60 days of cultivation. A complete randomized design was used, with three repetitions in all the experiments.

**Results:** The results related to the immersion time showed significant differences in the evaluated variables for  $p < 0,05$ , except in the number of sprouts. In addition, it was found that the highest number of axillary buds was obtained in the immersion time of three minutes, with a value of 4,67. Meanwhile, in the length of the sprouts, the maximum value was achieved with three minutes of immersion (3,0 cm) with significant differences ( $p < 0,05$ ) with regards to the other treatments. With the use of temporary immersion systems, with three minutes of immersion every eight hours, during 45 days of cultivation, the highest number of axillary buds and 1,90 sprouts were obtained; the sprout length reached 9,82 cm.

**Conclusions:** In the sprouts no morphophysiological changes were observed, ascribed to the cultivation conditions. It was proven that the *in vitro* micropropagation of mulberry, Criolla variety, in temporary immersion systems SETIS™, is possible.

**Keywords:** bioreactors, tissue culture, *Morus alba*, plant growth regulators

## Introducción

*Morus alba* L. (morera) es una planta forrajera originaria del Himalaya, que ha demostrado excelentes cualidades para la alimentación de diferentes especies de animales, cuyo valor nutricional es uno de los

más altos entre los forrajes tropicales no leguminosos (Martín *et al.*, 2017). Además, constituye la fuente exclusiva para la alimentación del gusano de la seda (*Bombyx mori* L.), al contener compuestos bioquímicos únicos en sus hojas, como morin y beta-sitosterol,

Recibido: 31 de octubre de 2019

Aceptado: 08 de septiembre de 2020

Como citar este artículo: Pérez-Pérez, J. L.; Fonseca-Yero, Maylín; Bahi-Arevich, Marisel; Silva-Pupo, J. J. & Werbrouck, S. Multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad criolla en sistemas de inmersión temporal. *Pastos y Forrajes*. 43 (3):235-243, 2020.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

que le confieren una función excepcional en la biosíntesis de la seda (Sarkar *et al.*, 2018).

En algunos genotipos, es posible la propagación por semillas, pero la vía fundamental es mediante el empleo de estacas (Wani *et al.*, 2019). Aunque esta última garantiza mayor homogeneidad de las plantaciones, requiere de seis a siete meses de madurez para realizar los cortes en las plantas donantes, y su uso limita la disponibilidad de alimento para los animales (Vijayan *et al.*, 2014). Además, reduce el vigor de las plantas en las siguientes generaciones, con menor desarrollo del sistema radical, lo que conlleva a una reducida adaptabilidad de las plantas hijas y restringe el cultivo de variedades específicas de cada región (Wani *et al.*, 2019).

Con las herramientas biotecnológicas actuales es posible obtener plantas *in vitro* en medios de cultivo líquidos, considerados más efectivos que los semisólidos, al permitir a las plantas mayor accesibilidad a los componentes del medio de cultivo y mayor ganancia en biomasa. También se reduce el tiempo de propagación, es posible el escalado y su automatización, y no se requiere de gelificantes, lo que disminuye los costos de producción en los laboratorios comerciales (Carvalho *et al.*, 2019).

Entre las tecnologías que emplean medios de cultivo líquido se encuentran los sistemas de inmersión temporal (SIT), plataformas semiautomatizadas que permiten durante un período breve el contacto controlado del material a propagar con un medio líquido en un ambiente aséptico (Georgiev *et al.*, 2014). En algunas especies, se ha logrado mejorar la respuesta fisiológica de las plantas e incrementar los índices de multiplicación (Businge *et al.*, 2017; Sarkar *et al.*, 2018; Gianguzzi *et al.*, 2019).

Aunque la regeneración *in vitro* de *M. alba* ha sido descrita por diversos autores (Salas *et al.*, 2005; Gogoi *et al.*, 2017), en esta especie es limitada la información sobre el uso de metodologías con la utilización de los sistemas de inmersión temporal, que permiten el escalado a nivel comercial. Hasta la actualidad, se cuenta con el antecedente del trabajo de Salas *et al.* (2011), en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de Santa Clara, Cuba. Estos autores emplearon un biorreactor de inmersión temporal (BIT®), constituido por dos contenedores gemelos, conectados entre sí por una manguera de silicona.

Hoy se dispone de una variante comercial, conocida como SIT, denominada SETIS™ (Vervit, 2016). Se trata de una modificación de los sistemas basados en el flujo y reflujo, que constituye una simplificación del sistema de frascos gemelos (Georgiev

*et al.*, 2014). Está compuesto por dos recipientes horizontales de polipropileno, de forma rectangular, acoplados uno sobre el otro, lo que permite mayor aprovechamiento de la superficie (Vervit, 2016). Este tipo de sistema ha demostrado ser una herramienta eficaz para la micropropagación de diferentes especies vegetales de importancia económica de los géneros *Saccharum*, *Musa*, *Solanum*, *Dioscorea*, *Phalenopsis*, *Stevia* y de especies forestales como *Eucalyptus* y *Paulownia*, entre otras (Balogun *et al.*, 2017; Rosales *et al.*, 2018).

No obstante, las condiciones de cultivo no óptimas en los SIT pueden conducir a la formación de plantas hiperhídricas. Este tipo de planta desarrolla un grado de desorden morfoanatómico y fisiológico que afecta su capacidad regenerativa, la multiplicación *in vitro* y la supervivencia en determinadas condiciones ambientales (Quiala, 2012). Ello requiere del estudio de los principales indicadores que influyen en la micropropagación y su optimización en cada genotipo, para lograr su uso efectivo a escala comercial.

A partir de los elementos antes mencionados, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la multiplicación *in vitro* de *M. alba*, variedad Criolla, en sistemas de inmersión temporal SETIS™.

## Materiales y Métodos

**Localización.** La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Universidad de Granma, entre diciembre de 2018 y mayo de 2019.

**Material vegetal.** Se tomaron segmentos nodales de 1,0 cm de longitud, con una yema axilar, a partir de plantas *in vitro* en segundo subcultivo de multiplicación, en medio de cultivo semisólido de morera, variedad Criolla, según la metodología propuesta por Salas *et al.* (2005).

**Medio de cultivo.** Para la multiplicación en sistemas de inmersión temporal, se empleó el medio de cultivo propuesto por Sales *et al.* (2011). Para ello, se utilizaron las sales completas, incluidas las vitaminas en medio *Murashige* y *Skoog* (Murashige y Skoog, 1962) 4,40 g L<sup>-1</sup> (Duchefa Biochemie B.V.), que contiene mio-inositol 100 mg L<sup>-1</sup> y glicina 2,0 mg L<sup>-1</sup>; además de sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0,5 mg L<sup>-1</sup> y ácido naftalenacético (ANA) 0,5 mg L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5,8 con soluciones de NaOH (0,1N) y HCl (0,1N), previo a la esterilización.

Las mangueras de silicona, los filtros hidrofóbicos (0,22 μm, MIDISART), los frascos SETIS™ y el medio de cultivo, se esterilizaron en autoclave

vertical (BK75) a 121 °C y 1,2 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min. Después, en la cabina de flujo laminar, se añadió Vitrofurax® (116 mg L<sup>-1</sup>) cuando el medio de cultivo tenía una temperatura aproximada de 80-90 °C. Al finalizar, se agitó hasta lograr la homogenización.

**Condiciones de cultivo.** Los explantes cultivados en sistemas de inmersión temporal SETIS™, se ubicaron en cámara de crecimiento con luz solar indirecta (Salas *et al.*, 2011), con duración del fotoperíodo entre 11-12 h, densidad del flujo de fotones fotosintéticos de 60-70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y temperatura de 26 ± 2,0 °C.

Cada sistema de inmersión temporal consiste en dos frascos superpuestos: uno para el crecimiento de las plantas y otro como reservorio del medio de cultivo (abajo). Ambos están acoplados con una manguera de silicona, de 6,0 mm de diámetro y 18,0 cm de longitud, a partir de los conectores ubicados en la parte inferior delantera de cada frasco. Además, se colocaron filtros hidrofóbicos de 0,2 μm para garantizar la esterilidad del aire dentro de los frascos (figura 1).

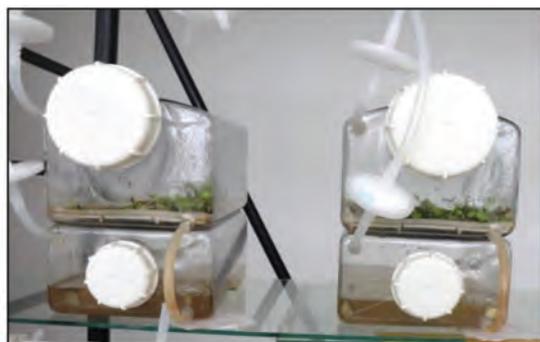


Figura 1. Sistemas de inmersión temporal SETIS™, utilizados en la multiplicación *in vitro* de brotes de morera, a los 28 días de cultivo.

El medio de cultivo circuló desde el frasco inferior al superior a través de una manguera, producto de la presión de aire emitido desde un compresor y regulado por un manómetro a 0,1 bar. Al concluir la presión de aire dentro de los frascos, el medio de cultivo retorna por gravedad al recipiente inferior. Entre inmersiones de medio de cultivo, se realiza el bombeo de aire al recipiente que contiene los tejidos vegetales para renovar la atmósfera gaseosa en su interior (Vervit, 2016; Balogun *et al.*, 2017), reducir la humedad, evitar la hiperhidricidad y la acumulación de gases tóxicos (Rocano *et al.*, 2017).

Se realizaron tres experimentos, con una secuencia consecutiva, que permitió fijar los factores

estudiados en cada caso y resultaron significativos en los experimentos que se describen seguidamente.

**Efecto del tiempo de inmersión.** Se utilizaron tiempos de inmersión de 1,0; 3,0 y 5,0 min. de duración, que conformaron tres tratamientos. A partir de la literatura científica consultada, se fijó una frecuencia de cuatro inmersiones diarias, distribuidas cada seis horas (Salas *et al.*, 2011), durante 28 días, en las condiciones y medio de cultivo antes descritos.

**Efecto de la frecuencia de inmersión.** Para el estudio se fijó el tiempo de inmersión que mejor resultó del experimento previo, que fue el de tres minutos, con diferentes frecuencias de inmersión. Se conformaron tres tratamientos: 1) tres inmersiones diarias cada ocho horas; 2) testigo, con cuatro inmersiones diarias cada seis horas, y 3) seis inmersiones diarias cada cuatro horas. Todos en condiciones y medios de cultivo similares al experimento anterior.

**Efecto del tiempo de cultivo.** Los brotes de morera se cultivaron en las mejores condiciones, determinadas en los experimentos previos. Se realizaron evaluaciones a los 28, 45 y 60 días de cultivo. Se realizó un subcultivo al medio de cultivo fresco, a los 28 días.

**Diseño experimental.** Se utilizó un total de tres sistemas de inmersión temporal SETIS™ por tratamiento y tres repeticiones, con un diseño experimental completamente al azar. Cada sistema contenía 1 000 mL de medio de cultivo de multiplicación con 30 explantes, a razón de 33,33 mL de medio de cultivo por explante de morera.

**Variables cualitativas.** Transcurrido el período de multiplicación de 28 días, se evaluaron las características cualitativas de color e hiperhidricidad de los brotes mediante la observación, y se documentaron a través de fotografías. El color se determinó según el código hexadecimal de colores ([http:// www.cvp.linnet.edu/cwis/cvp.html](http://www.cvp.linnet.edu/cwis/cvp.html)) y se consideraron brotes hiperhídricos los que presentaron una apariencia turgente y translúcida, en comparación con los brotes normales.

**Variables cuantitativas.** Se determinó el número de brotes, el número de yemas axilares y la longitud de los brotes (cm), a los 28 días de cultivo. Para la longitud de los brotes, se midió desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja, con ayuda de una regla milimetrada.

**Procesamiento estadístico.** Las variables cualitativas color e hiperhidricidad de los brotes se analizaron mediante estadística descriptiva. En el experimento uno, se evaluó el efecto del tiempo de inmersión, y en el dos la frecuencia de inmersión.

Los datos cumplieron los supuestos de normalidad, según la prueba de *Bartlett* y la homogeneidad de varianza, de acuerdo con la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. Se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, y la comparación de medias según *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en el experimento tres, donde se evaluó el efecto del tiempo de cultivo, las variables no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, por lo que se empleó la prueba no paramétrica de *Friedman*. Las diferencias entre tratamientos se determinaron según la prueba de *Wilcoxon* ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el programa estadístico *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*, versión *PASW Statistics 18* para Windows.

### Resultados y Discusión

**Efecto del tiempo de inmersión.** Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas para  $p < 0,05$ , excepto en el número de brotes. Se observó que el número de brotes de *M. alba*, variedad Criolla, en el sistema de inmersión temporal SETIS™, estuvo en correspondencia con cada una de las yemas previamente establecidas. Además, el número mayor de yemas axilares se obtuvo en el tratamiento 2 (tiempo de inmersión de tres minutos), con valor de 4,67. La longitud de los brotes en los tres tratamientos superó los 2,5 cm, pero el máximo valor se logró con dos minutos de inmersión, siendo superior a 3,0 cm, con diferencias significativas con respecto al resto (tabla 1).

La definición del tiempo de inmersión es un elemento vital para cada especie, si se pretende estandarizar una metodología que implique el uso de los sistemas de inmersión temporal. Al respecto, *Berthouly y Etienne (2005)* señalaron que la definición de este indicador contribuye a que los tejidos vegetales logren la máxima absorción de nutrientes, sin llegar a su hiperhidratación. Este es un desorden fisiológico perjudicial, que puede conducir a una pérdida irreversible de la capacidad de regeneración y multiplicación *in vitro*, debido al exceso de agua en los espacios intercelulares del tejido vegetal.

Las causas que generan la hiperhidricidad están relacionadas con varios factores del ambiente *in vitro*, como el pobre intercambio gaseoso y la alta humedad relativa en los frascos de cultivo, el bajo potencial osmótico de los medios de cultivo, así como las altas concentraciones de iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Cl}^-$  y de reguladores del crecimiento, principalmente citoquininas (*Quiala, 2012*).

En la literatura científica consultada se plantea que la inmersión no debe exceder de uno o dos minutos en especies leñosas, para evitar la presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad. Este tiempo es suficiente para producir incremento en la actividad de la superóxido dismutasa y una peroxidación de los lípidos, que desaparecen al terminar la fase de inmersión. Con ello se evita la muerte celular por estrés oxidativo, inducido por el tiempo prolongado de exposición de los explantes al medio de cultivo líquido (*Salas et al., 2011*).

El tiempo y la frecuencia de inmersión son dos factores fundamentales para lograr el mayor número de brotes y la mejor calidad de las plantas. Estos indicadores son recomendados por *Castro y González (2002)*, quienes al evaluar diferentes frecuencias y tiempos de inmersión en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden observaron que con tres minutos de inmersión, cada 12 h, se obtenía el mayor número de brotes (11,5) en comparación con frecuencias inferiores y un minuto de inmersión. Este resultado difiere del que se alcanzó en esta investigación, donde no hubo efecto del tiempo de inmersión en el número de brotes.

El número de brotes formados en este estudio también contrasta con los informados por *Rocano et al. (2017)* en *Juglans neotropica* Diels. Estos autores, con el empleo de dos minutos de inmersión cada seis horas, pero en sistemas de inmersión temporal BIT®, obtuvieron brotes de 3,37.

En un trabajo con *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, micropropagada en tres sistemas de inmersión (BIT®, SETIS™ y RITA®) con dos minutos de inmersión cada 12 h, y un volumen de medio de cultivo de

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en la multiplicación de brotes de *M. alba*, variedad Criolla, en sistema de inmersión temporal SETIS™.

Tratamiento	Tiempo de inmersión, minutos	Número de brotes	Número de yemas axilares	Longitud del brote, cm
1	1	1,40	3,27 <sup>b</sup>	2,59 <sup>b</sup>
2	3	1,47	4,67 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>
3	5	1,43	3,50 <sup>b</sup>	2,67 <sup>b</sup>
ES ±		0,0592	0,0998*	0,0514*

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de *Tukey* ( $p < 0,05$ )

10 mL por explante, se lograron plantas vigorosas con niveles bajos de hiperhidricidad, mayor número promedio de hojas y brotes y, en general, mayor tasa de multiplicación que en explantes cultivados en medio semisólido (Rosales *et al.*, 2018).

Es posible que la forma de los frascos haya tenido alguna influencia, al considerar que en los BIT® se usa un recipiente vertical, y el espacio entre los explantes y la parte superior del recipiente es mayor, en comparación con el disponible en los SETIS, lo que permite mayor disponibilidad de gases y espacio para la elongación de los explantes (Rosales *et al.*, 2018).

En esta investigación, se incluyeron en el medio de cultivo 6-BAP y ANA, como reguladores del crecimiento. Sin embargo, Rosales *et al.* (2018) solo pusieron ácido giberélico ( $AG_3$ ), el cual induce una gran variedad de efectos fisiológicos; entre ellos, la elongación de los tallos, debido a la activación de los meristemos intercalares. Además, estos autores plantearon que en las pruebas iniciales la presencia de citoquininas causó efectos negativos, lo que parece indicar que la brotación se debe al sistema de inmersión temporal.

Según Vidal *et al.* (2015) en *Castanea* spp., cultivada en sistemas de inmersión temporal RITA®, con tres minutos de inmersión cada cuatro u ocho horas, se logró un coeficiente de multiplicación de 1,16, que es comparable con los resultados de este trabajo. En *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, hubo la mejor respuesta, al emplear 15 min. de inmersión cada dos horas. En estas condiciones, no se observó hiperhidricidad y se obtuvo un coeficiente de multiplicación

0,74 veces superior al del sistema con inmersión continua (Mendonça *et al.*, 2016).

Con respecto al presente trabajo, no hubo síntomas de hiperhidricidad en los brotes formados en los diferentes tiempos de inmersión, con la mejor respuesta al emplear tres minutos de inmersión.

*Efecto de la frecuencia de inmersión.* Con el empleo de tres minutos de inmersión y diferentes frecuencias (cuatro, seis y ocho horas), se observó que los brotes mantuvieron las características típicas de la especie, con hojas expandidas de color verde, superficie lisa y borde ondulado. No fueron visibles cambios morfofisiológicos, atribuidos a las condiciones de cultivo, como presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad después de 28 días de cultivo (figura 2).

Al utilizar frecuencias de inmersión, cada seis u ocho horas diarias, con tres minutos de inmersión, se registraron valores promedio máximos en el número de yemas axilares, con diferencias significativas con respecto al tratamiento con frecuencia de inmersión cada cuatro horas (figura 3).

En la variable longitud del brote, se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Los mayores valores se lograron con el menor número de inmersiones diarias y frecuencia cada ocho horas, tratamiento que difirió estadísticamente del resto. Por el contrario, en el número de brotes por explante, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (figura 3).

En este experimento también se pudo aumentar el número de yemas por brote (de 3,69 a 5,90) y la longitud

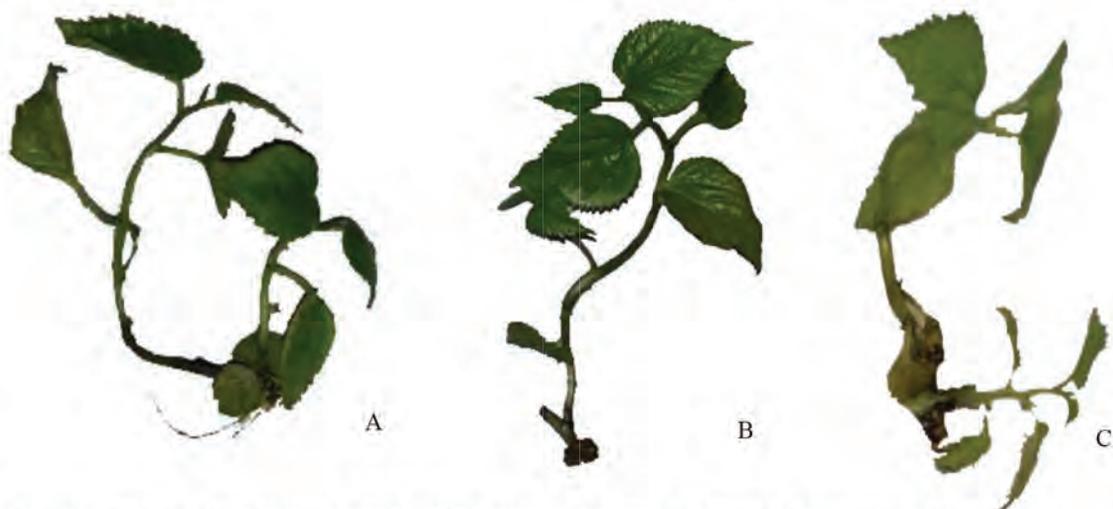


Figura 2. Brotes *in vitro* de morera, variedad Criolla, obtenidos con tres minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada ocho (A), seis (B) y cuatro (C) horas en sistema de inmersión temporal SETIS, a los 28 días de cultivo.

de los brotes (de 2,75 a 5,50 cm), al cambiar la frecuencia de inmersión, de cuatro a cada ocho horas por día. Por el contrario, al disminuir el número de inmersiones se alargan las frecuencias o intervalos entre brotes, y se origina estrés en el material vegetal, lo que pudo haber estimulado la respuesta biológica de los brotes. Durante estas condiciones de estrés, es posible que el brote pase de una nutrición heterótrofa a mixotrófica, que estimule la producción de hormonas endógenas como el ácido abscísico y acelere los procesos de división y alargamiento celular.

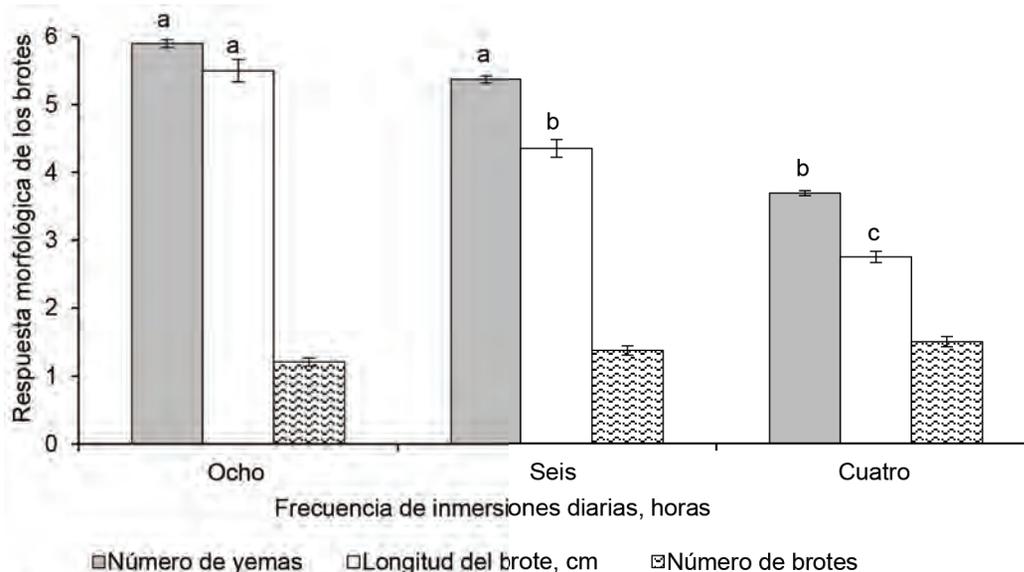
González *et al.* (2011) demostraron que al existir un contacto más frecuente de los explantes de *Eucalyptus globulus* Labill. con el medio de cultivo, se produce mayor acidificación del medio de cultivo líquido. En bajas frecuencias de inmersión, se incrementa el intercambio gaseoso en la fotosíntesis y respiración, ya que durante la inmersión las tasas de difusión de gases en el aire son superiores que en el agua.

Estos resultados difieren de los informados por Salas *et al.* (2011), quienes obtuvieron 11,02 brotes por explantes, con longitud aproximada de 11,35 cm en morera, variedad Criolla, y la utilización del sistema de frascos gemelos, con un minuto de inmersión y frecuencia cada seis horas (cuatro inmersiones diarias). Sin embargo, una de las diferencias radica en el número de explantes. Según estos autores, emplearon diez explantes en 500 mL de medio de cultivo, a razón de

50 mL de medio de cultivo por explante. Mientras, en este trabajo se triplicó el número de explantes, con 33,33 mL de medio de cultivo por explante como promedio. Cuando hay un menor número de brotes, disminuye la competencia, lo que resulta en mayor disponibilidad de luz y nutrientes. Sin embargo, no hay un aprovechamiento del espacio dentro del frasco.

Esta diferencia en la respuesta de los brotes, al variar el número de explantes por frasco, también la demostró Salas *et al.* (2011), quienes observaron que al duplicar el número de explantes (20), disminuía significativamente el número de brotes y su longitud. Por tanto, en este trabajo, la baja respuesta de los tejidos se pudiera atribuir a que se triplicó el número de explantes por frasco, lo que pudo haber causado baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno en el interior del recipiente. No obstante, existen factores que también pudieran influir en la respuesta de los tejidos, como el tipo de sistema de inmersión temporal empleado, la intensidad luminosa dentro de la cámara de crecimiento, el tamaño del explante, entre otros.

Businge *et al.* (2017), al emplear un sistema de inmersión temporal BIT® con un minuto de inmersión cada una hora, obtuvieron en el híbrido *Eucalyptus urograndis* (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden × *E. urophylla* S.T. Blake) un coeficiente de multiplicación 5,75 veces mayor que en medio de cultivo



Barras con letras diferentes en una misma variable difieren significativamente, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* $p < 0,05$

Figura 3. Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de brotes de morera, variedad Criolla, a los 28 días de cultivo

semisólido, y un valor medio de 1,75 veces superior en *Betula pendula* Roth. Más recientemente, Rosales *et al.* (2018) encontraron que en *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, variedad Morita II, al emplear el sistema de inmersión temporal BIT<sup>®</sup> se obtenían ocho brotes por planta, mientras que en los SETIS<sup>®</sup> solo tres. Estos autores observaron diferencias significativas entre los dos sistemas evaluados. Esto se pudiera deber a que la distribución del medio de cultivo es más homogénea en los BIT<sup>®</sup>, mientras que en los SETIS<sup>®</sup> la malla en que se colocan los explantes y su ligera inclinación hacia el frente, pudo haber disminuido el volumen del medio de cultivo en la parte posterior del frasco y su contacto con los explantes.

Esto corrobora que los tiempos y frecuencias de inmersión son muy variables, debido a la gran variedad de especies vegetales, los procesos de micropropagación y tipos de sistemas de inmersión temporal utilizados (Gianguzzi *et al.*, 2019). Autores como Regueira *et al.* (2018), Carvalho *et al.* (2019) y Vidal y Sánchez (2019), refieren la importancia de comparar los resultados en diferentes tipos de sistemas de inmersión temporal y ciclos de inmersión, en aras de seleccionar para cada especie el mejor equipamiento y protocolo de investigación.

También es posible que la época del año haya influido en la respuesta de los brotes, pues el período de investigación coincidió con la fructificación de esta especie, lo que conlleva a un retardo de los procesos fisiológicos de los brotes de morera. Según Gogoi *et al.* (2017), de noviembre a febrero ocurre la floración *in vitro* en explantes de morera (*Morus indica* L.), período de cultivo que es similar al utilizado en esta investigación.

La literatura científica hace referencia a diferentes tipos de explantes, como ápices, brotes, embriones somáticos, segmentos nodales, medios y basales, utilizados en sistemas de inmersión temporal. Por ejemplo, en diferentes clones de *Castanea sativa* Mill, se informó que los explantes basales con callos produjeron mayor cantidad de brotes, y de mayor longitud que los obtenidos a partir de segmentos nodales y apicales (Vidal *et al.*, 2015).

Palhares *et al.* (2018) demostraron que los mejores resultados en el híbrido *E. urograndis* se lograron cuando las plantas se cultivaron en sistemas de inmersión temporal, con alta intensidad luminosa ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), superior a la utilizada en este estudio. Según los autores, esto se atribuye a que las plantas sometidas a un alto flujo de fotones fotosintéticos reducen, significativamente, la conductancia estomática, pero no modifican la transpiración, lo que

resulta en un mayor número de estomas abiertos y en el aumento de la transpiración.

La longitud del explante inicial es otro aspecto a considerar, y que pudo haber influido en la longitud de los brotes regenerados. En este trabajo se emplearon segmentos nodales de 1,0 cm de longitud con una yema axilar, inferiores a lo informado por Salas *et al.* (2011), quienes se basaron en la metodología descrita por Salas *et al.* (2005), y utilizaron segmentos nodales de 2,0 a 3,0 cm de longitud con una yema axilar.

La integración de estos elementos se debe tener en cuenta en futuras investigaciones, por lo que al concluir este experimento se determinó que con el empleo de tres minutos de inmersión, con frecuencia diaria cada ocho horas, se logra mayor respuesta en las variables analizadas.

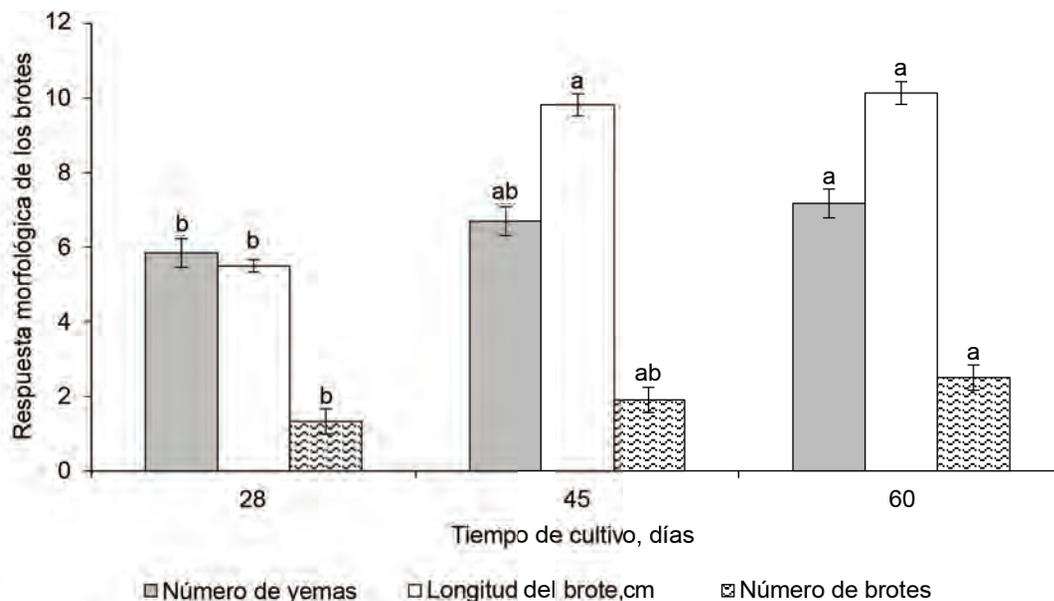
*Efecto del tiempo de cultivo.* Al analizar el efecto del tiempo de cultivo en la respuesta de los brotes de *M. alba*, variedad Criolla, cultivados en el sistema de inmersión temporal SETIS<sup>TM</sup>, se observó que, al aumentar el tiempo de cultivo, se incrementó la respuesta de los brotes en todas las variables. Los valores mínimos se alcanzaron a los 28 días de cultivo, con diferencias estadísticas significativas en la longitud de los brotes con respecto al resto de los tiempos de cultivo ( $p < 0,05$ ). No sucedió así en las evaluaciones a los 45 días de cultivo, en las variables número de brotes y número de yemas.

Aunque los mayores resultados se obtuvieron a los 60 días de cultivo, estos no mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto a los valores promedio a los 45 días de cultivo en ninguna de las variables (figura 4).

Lo anterior se pudiera deber a que durante los primeros 28 días de cultivo, el tejido vegetal inicia un proceso de recuperación, producto al estrés que ocurre posterior al establecimiento de los explantes en el medio de cultivo líquido. La transferencia de los brotes a medio de cultivo fresco, a los 28 días de cultivo, permitió mantener los brotes por mayor tiempo, con mejor nutrición. Estos comenzaron a elongar con la consiguiente formación de yemas y hojas nuevas, lo que se traduce en un incremento en el desarrollo y multiplicación de nuevos brotes.

En la literatura consultada algunos autores demostraron que los períodos prolongados de cultivo afectaron el número de brotes. Sin embargo, Castro y González (2002) obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación de brotes en *E. grandis* a las seis semanas de cultivo, un período similar al usado en este estudio.

Al concluir este experimento, se determinó que el tiempo de cultivo en el sistema de inmersión temporal



Barras con letras diferentes en una misma variable difieren significativamente según la prueba de Wilcoxon/Friedman ( $p < 0,05$ )

Figura 4. Efecto del tiempo de cultivo en la respuesta morfológica de los brotes de morera, variedad Criolla, cultivados en sistema de inmersión temporal SETIS™.

SETIS™ influyó en la multiplicación de los brotes *in vitro* de morera, variedad Criolla.

### Conclusiones

Se demostró que es posible la multiplicación *in vitro* de morera, variedad Criolla, en sistemas de inmersión temporal SETIS™. Con el empleo de tres minutos de inmersión cada ocho horas, durante 45 días de cultivo, se obtiene la mayor respuesta en el número de yemas, número de brotes y longitud de los brotes, sin diferencias estadísticas significativas en comparación con 60 días de cultivo.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del programa de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de Bélgica (VLIR), coordinado por la Universidad de Gent, en el marco del proyecto «Biotecnología *in vitro* de plantas para el incremento de la seguridad alimentaria en la región oriental de Cuba», que se desarrolla en la Universidad de Granma.

### Contribución de los autores

- Jorge Liusvert Pérez-Pérez. Trabajó en la concepción y el diseño de la investigación, participó en la adquisición e interpretación de los datos, en la redacción y revisión del manuscrito.
- Maylín Fonseca-Yero. Trabajó en la concepción y el diseño de la investigación, participó en la

adquisición e interpretación de los datos, en la redacción y revisión del manuscrito.

- Marisel Bahi-Arevich. Participó en la adquisición e interpretación de los datos y en la revisión del manuscrito.
- Juan José Silva-Pupo. Trabajó en la concepción de la investigación, en la adquisición de financiamiento, los recursos y la administración del proyecto; además participó en la revisión del manuscrito.
- Stefaan Werbrouck. Contribuyó con el financiamiento del proyecto y la adquisición de recursos; además participó en la revisión del manuscrito.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos.

### Referencias bibliográficas

- Balogun, M.; Maroya, N.; Taiwo, J.; Chukwunalu, O.; Ajayi, Adeola; Kumar, P. Lava *et al.* *Clean breeder seed yam tuber production using temporary immersion bioreactors*. Ibadan, Nigeria: IITA, 2017.
- Berthouly, M. & Etienne, H. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: A. K. Hvoslef-Eide and W. Preil, eds. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht, Netherlands: Springer Netherlands. p. 165-195, 2005.

- Businge, E.; Trifonova, Adelina; Schneider, Carolin; Rödel, P. & Egertsdotter, Ulrika. Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of Eucalyptus, birch and fir. *Forests*. 8 (6):196, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/f8060196>.
- Carvalho, Lara S. O.; Ozudogru, Aylin; Lambardi, M. & Paiva, L. V. Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. *Not. Bot. Horti Agrob.* 47 (2):269-277, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha47111305>.
- Castro, D. & González, J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agric. Téc.* 62 (1):68-78, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072002000100007>.
- Georgiev, V.; Schumann, Anika; Pavlov, A. & Bley, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* 14:607-621, 2014.
- Gianguzzi, Valeria; Inglese, P.; Barone, E. & Sottile, F. *In vitro* regeneration of *Capparis spinosa* L. by using a temporary immersion system. *Plants, Basel*. 8 (6):177, 2019 DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8060177>.
- Gogoi, G.; Borua, P. K. & Al-Khayri, J. M. Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15 (1):249-256, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.005>.
- González, R.; Ríos, Darcy; Avilés, Fabiola & Sánchez-Olate, M. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque, Valdivia*. 32 (2):147-154, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002011000200005>.
- Martín, G. J.; Pentón, Gertrudis; Noda, Yolai; Milera, Milagros; Olivera, Yuseika; Valenciaga, Nuris *et al.* Management of *Morus alba* L. (mulberry). In: Lourdes L. Savón, Odilia Gutiérrez y G. Febles, eds. *Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean*. Mayabeque, Cuba: FAO, ICA. p. 1-25, 2017.
- Mendonça, Evânia G.; Santos, B. R.; Stein, Vanessa C.; Beijo, L. A.; Carvalho, H. H. de & Paiva, L. V. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. *Ciência Florestal, Santa Maria*. 26 (4):1211-1224, 2016.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3):473-479, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Palhares, G. A.; Rodríguez-Sánchez, R.; Cid-Ruiz, Mariela; Pina-Trina, D.; Garza-García, Yolanda & González-Olmedo, J. L. Effects of photomixotropic conditions on plants of *Eucalyptus urograndis* propagated in temporary immersion bioreactors. *Int. J. Agric. Environ. Biotechnol.* 3 (2):558-566, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/3.2.33>.
- Quijala, E. *Efecto de la 6-bencilaminopurina en la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de Tectona grandis L. cultivados en sistema de inmersión temporal*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 2012.
- Regueira, M.; Rial, E.; Blanco, B.; Bogo, B.; Aldrey, A.; Correa, B. *et al.* Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*. 32 (1):61-71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1611-x>.
- Rocano, Mélida N.; Villena, Paulina G. & Peña, Denisse F. Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. *Maskana*. 8 (1):103-109, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.09>.
- Rosales, Catalina; Brenes, J.; Salas, Karla; Arce-Solano, Silvia & Abdelnour-Esquivel, Ana. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 24 (1):69-84, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.08.028>.
- Salas, J. E.; Agramonte, D.; Jiménez-Terry, F.; Pérez, Marta; Collado, R.; Barbón, R. *et al.* Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. *Bioteología Vegetal*. 11 (2):77-88, 2011.
- Salas-Barbosa, E.; Agramonte, D.; Barbón, R.; Jiménez, F.; Collado, R.; Pérez, Martha *et al.* Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. *Bioteología Vegetal*. 5 (2):81-87, 2005.
- Sarkar, T.; Mogili, T.; Gandhi Doss, S. & Sivaprasad, V. Tissue culture in mulberry (*Morus* spp.) intending genetic improvement, micropropagation and secondary metabolite production. A review on current status and future prospects. In: K. N., ed. *Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants*. Singapore: Springer. p. 467-487, 2018.
- Vervit. *SETIS*. Belgium: VERVIT. <https://setis-systems.be/about/setis-platform>, 2016.
- Vidal, Nieves; Correa, B.; Rial, E.; Regueira, M.; Sánchez, Conchi & Cuenca, B. Comparison of temporary and continuous immersion systems for micropropagation of axillary shoots of chestnut and willow. *Acta Hort.* 2015.
- Vidal, Nieves & Sánchez, Conchi. Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Eng. Life Sci.* 19:896-915, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201900041>.
- Vijayan, K.; Raju, P. J.; Tikader, A. & Saratchandra, B. Biotechnology of mulberry (*Morus* L.) - An appraisal. *Emir. J. Food Agric.* 26 (6):418-442, 2014. DOI: <http://doi.org/10.9755/ejfa.v26i5.15722>.
- Wani, M. Younus; Mir, M. R.; Baqual, M. F.; Wani, Ab Waheed; Ganie, Nisar A.; Rufaie, S. Zia-ul-Haque. Effect of seed rates on seed germination and seedling growth of mulberry (*Morus* sp.). *Indian J. Exp. Biol.* 57 (12):956-960, 2019.