


**Original****Multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal**  
**Multiplication of mulberry shoots variety Doña Betty in Temporary Immersion System**

Ing. Marisel Bahi Arevich. Instructor. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba.

[\[mbahia@udg.co.cu\]](mailto:mbahia@udg.co.cu) 

Dr.C. Jorge Liusvert Pérez Pérez. Profesor Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma Cuba. [\[jperez@udg.co.cu\]](mailto:jperez@udg.co.cu) 

**Recibido:** 24/09/2020 | **Aceptado:** 21/12/2020

**Resumen**

La morera (*Morus alba* L.) 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. Estudios realizados en Cuba, han demostrado que la morera es un alimento alternativo que permite la sustitución parcial de los concentrados comerciales, en la dieta de los monogástricos y rumiantes. Una alternativa a los métodos convencionales de propagación, es el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, sin embargo existen pocos trabajos que emplean los Sistemas de Inmersión Temporal. El objetivo de la investigación fue determinar el tiempo y frecuencia de inmersión para la multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal SETIS™. Se conformaron tratamientos con tiempos de inmersión de 1,0; 2,0 y 3,0 minutos de duración con frecuencias cada cuatro, seis y ocho horas diarias; en cada tratamiento se emplearon tres biorreactores SETIS™, con 30 explantes por frasco. A los 28 días de cultivo se determinó el número de brotes, longitud del brote, número de segmentos nodales y número de hojas. Como resultado se logró incrementar la multiplicación y calidad de los brotes de morera variedad Doña Betty, con empleo de dos minutos de inmersión cada ocho horas en sistema de inmersión temporal.

**Palabras clave:** biorreactores; cultivo *in vitro*; propagación; SETIS™

**Abstract**

Mulberry (*Morus alba* L.) is a forage plant native to the Himalayas, which has shown excellent qualities for feeding different species of animals, whose nutritional value is one of the highest among non-legume tropical forages. Studies carried out in Cuba have shown that mulberry is an alternative food that allows the partial substitution of commercial concentrates in the diet of

monogastrics and ruminants. An alternative to conventional propagation methods is the use of *in vitro* plant tissue culture techniques; however there are few works that use Temporary Immersion Systems. The objective of the research was to determine the time and frequency of immersion for the multiplication of shoots of mulberry variety Doña Betty in the SETIS™ Temporary Immersion System. Treatments with immersion times of 1.0; 2.0 and 3.0 minutes of duration with frequencies every four, six and eight hours daily; Three SETIS™ bioreactors were used for each treatment, with 30 explants per flask. At 28 days of culture, the number of shoots, length of the shoot, number of nodal segments and number of leaves were determined. As a result, it was possible to increase the multiplication and quality of the Doña Betty variety mulberry shoots, employing two minutes of immersion every eight hours in a temporary immersion system.

**Keywords:** bioreactors; *in vitro* culture; spread; SETIS™

## Introducción

La morera (*Morus alba* L.) 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, Montejo, Milera, y García (2017). Estudios realizados en Cuba, han demostrado que es un alimento alternativo con propiedades bromatológicas que permite la sustitución parcial de los concentrados comerciales, en la dieta de los monogástricos y rumiantes.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales proporcionan una alternativa a la propagación vegetativa y a los programas de mejoramiento genético en esta importante especie leñosa en un corto periodo de tiempo, además la propagación *in vitro* de plantas, es una técnica útil y eficiente que permite la producción masiva de plantas libres de virus Hesami, Daneshvar y Yoosefzadeh ((2019).

Una alternativa a la micropropagación en medio de cultivo semisólido, es el empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal, plataformas semi-automatizadas que permiten el contacto controlado durante un corto tiempo del material a propagar con el medio de cultivo líquido en un ambiente aséptico Georgiev, Schumann, Pavlov, y Bley (2014).

En la actualidad se comercializa un nuevo modelo de Sistemas de Inmersión Temporal denominado SETIS™, producido por la compañía Vervit en Bélgica Vervit, (2016). Existen informes de su empleo eficiente en la propagación de brotes de *Saccharum officinarum*, *Musa* spp., *Solanum*

spp., *Phalaenopsis* spp., *Dioscorea rotundata*, *Stevia rebaudiana*, *Eucalyptus globulus* y *Paulownia elongata* Silva, Solis, Jifon, Creste y Kiran. (2020).

Sin embargo, la literatura científica informa sobre la necesidad de comparar los resultados obtenidos 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 Carvalho, Ozudogru, Lambardi, y Paiva (2019).

El presente trabajo tuvo como objetivo, determinar el mejor tiempo y frecuencia de inmersión para la multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal SETIS™.

### **Población y muestras**

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma, entre noviembre 2018 y marzo 2020.

### **Materiales y métodos**

Material vegetal y Medio de cultivo:

El material vegetal empleado fue proveniente de la fase de multiplicación en medio de cultivo semisólido.

Se utilizó un medio de cultivo con las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) 4,40 g.l<sup>-1</sup> (DuchefaBiochemie B.V.), mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, Glicina 2,0 mg.l<sup>-1</sup>; 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, ácido naftalenacético (ANA) 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup> y pH 5,8 previo a su esterilización.

Después de cuatro semanas, se evaluaron los parámetros morfológicos de las vitroplantas obtenidas en cada experimento.

Esterilización:

Los platos metálicos, frascos de vidrio, frascos SETIS™, mangueras de silicona, filtroshidrofóbicos (0,22 µm, MIDISART) y el medio de cultivo, fueron esterilizados en autoclave vertical (BK-75) a 121 °C y 1,2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión por 20 minutos. En tanto, las pinzas y bisturíes se desinfectaron a 300 °C durante cinco minutos, en esterilizadores eléctricos que permanecieron en la cabina de flujo laminar.

Luego en cabina de flujo laminar se añadió Vitrofur<sup>®</sup> (116 mg.l<sup>-1</sup>) cuando el medio de cultivo de los Sistemas de Inmersión Temporal, tenía una temperatura aproximada de 80-90 °C; al finalizar

se agitó hasta lograr la homogenización del medio de cultivo. Para detectar cualquier tipo de contaminación antes de su uso, se mantuvieron en reposo en la oscuridad durante tres días.

Manejo de los explantes:

La manipulación del material vegetal y la siembra en los recipientes de cultivo, se efectuó en la cabina de flujo laminar horizontal bajo condiciones asépticas. Con ayuda de pinzas se tomaron los segmentos nodales que contenían una yema y se colocaron en los frascos de cultivo para su multiplicación.

Condiciones generales de cultivo:

Se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar indirecta con una duración de fotoperiodo luminoso entre 11-12 horas, densidad del flujo de fotones fotosintéticos  $60-70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura  $26 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$  y humedad relativa entre 70 a 80 %. La intensidad de la luz, se determinó con un luxómetro (Extech®, modelo 401025, EUA).

Para el desarrollo de todos los experimentos en Sistemas de Inmersión Temporal, se adicionaron 1000 ml de medio de cultivo de multiplicación en el compartimento inferior con 3 000 ml de capacidad. En el compartimento superior, se inocularon los explantes por cada Sistema de Inmersión Temporal. Ambos frascos superpuestos, están conectados con una manguera de silicona a partir de los conectores ubicados en la parte inferior delantera de cada frasco. Además, se colocaron filtros hidrofóbicos de  $0,2 \mu\text{m}$  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 variedad Doña Betty a los 28 días de cultivo**

Experimento 1: Determinación del tiempo de inmersión

Con el objetivo de definir el tiempo de inmersión de los brotes de yemas axilares de morera durante su multiplicación en el sistema de inmersión temporal SETIS™ se conformaron tres tratamientos con tiempos de inmersión de 1,0; 2,0 y 3,0 minutos de duración. Basado en la

literatura científica, se fijó como control, una frecuencia de cuatro inmersiones diarias distribuidas cada seis horas Salas, Agramonte, Jiménez, Pérez, Collado, Barbón, Fera y Chávez (2011) en las condiciones y medios de cultivo descritos previamente. A los 28 días de cultivo, se determinó el número de brotes, longitud del brote (cm), número de segmentos nodales y número de hojas.

Experimento2: Determinación de la frecuencia de inmersión

Con el objetivo de determinar el efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de brotes de morera en el Sistema de Inmersión Temporal, se fijó el tiempo de inmersión que mejor resultó del experimento previo, con diferentes frecuencias de inmersión:1) seis inmersiones diarias (cada cuatro horas); 2) cuatro inmersiones diarias (cada seis horas), y 3) tres inmersiones diarias (cada ocho horas), todos en iguales condiciones y medios de cultivo, con 25 segmentos nodales por frasco y tres repeticiones por tratamiento.

Análisis estadísticos:

Se realizó mediante la prueba no paramétricaKruskall-Wallisylas diferencias entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Mann Whitney con un valor de significancia de  $p < 0,05$ .

### **Análisis de los resultados**

Experimento 1: Determinación del tiempo de inmersión

Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas en al menos dos tratamientos. Se observaron los mejores resultados en el tratamiento con dos minutos de inmersión cada ocho horas, siendo el mayor número de brotes 1,60 con diferencias significativas con respecto a los tratamiento uno y tres.

Además, se encontró como mayor número de yemas axilares 4,37 sin diferencias significativas con el resultado del tratamiento número tres, pero si con el número uno. Se observó que el resultado de la longitud de los brotes del segundo tratamiento difirió estadísticamente de los resultados obtenidos en los tratamientos uno y dos (Tabla 1).

En este sentido, la definición del tiempo de inmersión es un elemento vital para cada especie donde se pretenda estandarizar una metodología que implique el uso de los sistemas de inmersión temporal.

Los autores Berthouly y Etienne (2005), señalaron que la definición de este parámetro contribuye a que los tejidos vegetales logren la máxima absorción de nutrientes, pero sin llegar a la hiperhidratación de los tejidos, que 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.

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

Tratamiento	Tiempo de inmersión (min.)	Número de brotes	Número de yemas axilares	Longitud del brote (cm)
1	1	1,03b	3,17b	1,72b
2	2	1,60 <sup>a</sup>	4,37a	3,14a
3	3	1,0b	4,17a	2,11b
ES ±		0,08	0,25	0,18

*Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba comparación de medias de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )*

La literatura científica también plantea que el tiempo de inmersión no debe exceder de uno o dos minutos en especies leñosas, para evitar la presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad y es suficiente para producir un incremento en la actividad de la superóxido-dismutasa y una peroxidación de los lípidos que desaparecen al terminar la fase de inmersión, con lo cual 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 número de brotes formados en este estudio, son comparables con los obtenidos por Rocano, Villena y Peña (2017) en *Juglansneotrópica*, al emplear dos minutos de inmersión cada seis horas en sistemas de inmersión temporal BIT®.

Según Rosales, Brenes, Salas, Arceo y Abdelnour (2018), al realizar la micropropagación de plantas de *Steviarebaudiana* en diferentes sistemas de inmersión temporal con dos minutos de inmersión cada 12 horas, se lograron plantas vigorosas, desarrollaron mayor número de hojas y brotes, en comparación con las plantas cultivadas en medio de cultivo semi-sólido.

En *Eucalyptus camaldulensis* reportado por Mendonça, Stein, Carvalho, Santos, Beijo y Paiv. (2016). Se logró la mejor respuesta con 15 minutos de inmersión cada dos horas, en estas condiciones no se observó hiperhidricidad y un coeficiente de multiplicación de 0,74 veces superior al obtenido en sistemas con inmersión continua.

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

#### Experimento 2: Determinación de la frecuencia de inmersión

En las diferentes frecuencias de inmersión evaluadas, los brotes mantuvieron las características típicas de la especie y no se observaron cambios morfo-fisiológicos atribuidos a las condiciones de cultivo, como presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad después de 28 días de cultivo (Figura 2).



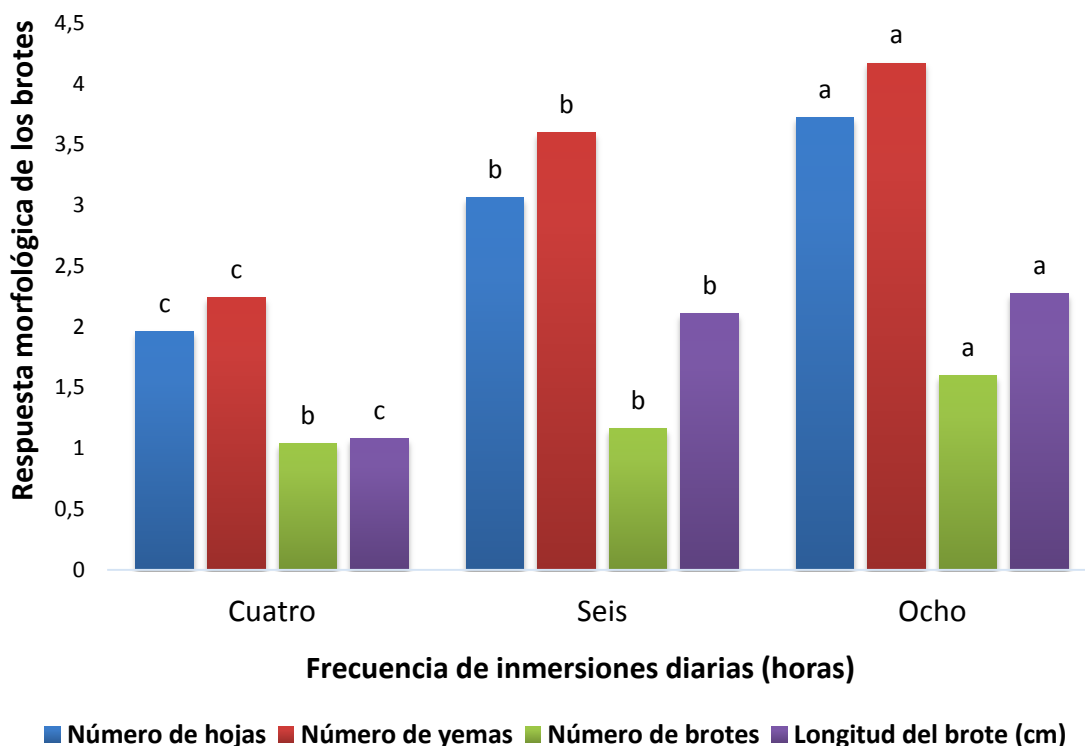
**Figura 2. Brotes *in vitro* de morera variedad Doña Betty obtenidos con dos minutos de inmersión con una frecuencia cada ocho horas en Sistema de Inmersión Temporal SETIS a los 28 días de cultivo**

En el tratamiento con frecuencias de inmersión cada seis u ocho horas diarias con dos minutos de duración, se obtuvo el mayor número de hojas, yemas axilares y se incrementó la longitud de los brotes, con diferencias significativas entre estos, y superiores a los alcanzados en el tratamiento con seis inmersiones con una frecuencia cada cuatro horas (Figura 3).

El número de brotes mostró diferencias significativas, con los mayores valores al utilizar una frecuencia cada ocho horas, el cual difirió estadísticamente del resto de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con inmersiones cada cuatro y seis horas diarias (Figura 3).

Se logró aumentar el número de yemas por brote con una media de 2,24 a 4,17 y los brotes alcanzaron longitudes superiores a los dos centímetros con empleo de frecuencias de inmersión cada ocho horas por día.

Es posible que al disminuir el número de inmersiones se alarguen las frecuencias o intervalos entre estos y provocan un efecto de estrés sobre el material vegetal que pudo haber estimulado la respuesta biológica de los brotes.



Barras con letras diferentes en una misma variable difieren significativamente según la prueba de comparación de medias Mann Whitney ( $p < 0,05$ )

Figura 3. Respuesta de los principales indicadores del desarrollo *in vitro* de los brotes de yemas axilares de *Morus alba* var. Doña Betty a los 28 días en las diferentes frecuencias de inmersión

Los resultados obtenidos son inferiores a los descritos por Salas *et al.* (2011), quienes lograron hasta once brotes por explantes con una longitud aproximada de 11,35 cm en morera variedad Criolla, con empleo del sistema de frascos gemelos con un minuto de inmersión y cada seis horas.

Sin embargo, una de las diferencias radica en el número de explantes utilizados. Según estos autores al duplicar el número de explantes, disminuía significativamente el número de brotes y su longitud. Al haber menor número de brotes disminuye la competencia lo que resulta en mayor disponibilidad de luz y nutrientes. Es posible que la baja respuesta observada esté



atribuida a que se triplicó el número de explantes por frasco, lo que pudo haber provocado una baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno en el interior del recipiente.

Además al existir un contacto más frecuente de los explantes con el medio de cultivo, al finalizar la inmersión se produce un incremento en la producción de dióxido de carbono, y una mayor actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo que provocan una menor asimilación de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo.

Esto corrobora que los tiempos y frecuencias de inmersión son muy variables, debido a la gran diversidad de especies vegetales, los procesos de micropropagación y tipos de sistemas de inmersión temporal utilizados Gianguzzi, Inglese, Barone y Sottile (2019). Por ello, autores como Vidal y Sánchez (2019), refieren la importancia de comparar los resultados obtenidos 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.

La longitud del explante inicial es otro aspecto a considerar, y que pudo haber influido en la longitud de los brotes regenerados. En el presente trabajo se emplearon segmentos nodales de 1,0 cm de longitud con una yema axilar, inferior a la empleada por Salas *et al.* (2011) al emplear segmentos nodales de 2,0 a 3,0 cm de longitud con una yema axilar. La integración de todos estos elementos debe tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

## Conclusiones

1. Con empleo dos minutos de inmersión se logró los mejores resultados en los indicadores morfológicos de las vitroplantas de morera variedad Doña Betty en el sistema de inmersión temporal SETIS.
2. Se incrementó el número de yemas por brote con una media de 2,24 a 4,17 y los brotes alcanzaron longitudes superiores a los dos centímetros con empleo de frecuencias de inmersión cada ocho horas por día.

## Referencias bibliográficas

- Berthouly, M. y Etienne, H. (2005). *Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation*. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, Dordrecht, pp: 165-195.
- Carvalho, L.S.O., Ozudogru, E.A., Lambardi, M. y Paiva, L.V. (2019). *Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 47 (2): 269-277.

- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. y Bley, T. (2014). *Temporary immersion systems in plant biotechnology*. Engineering in Life Science, 14: 607–62.
- Gianguzzi, V., Inglese, P., Barone, E. y Sottile, F. (2019). *In vitro* regeneration of *Capparis spinosa* L. by using a temporary immersion system. Plants, 8: 177.
- Hesami, M., Daneshvar, M. y Yoosefzadeh-Najafabadi M. (2019). *An efficient in vitro shoot regeneration through direct organogenesis from seedling-derived petiole and leaf segments and acclimatization of Ficus religiosa*. J. Forest. Res., 30(3): 807–815.
- Martín, G.J., Montejo, J.I., Milera, M.C. y García, D.E. (2017). Chapter 2. *Chemical composition and nutritive value of mulberry (Morus alba) in animal feeding*. En: Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean, (eds) L.L Savon, O. Gutierrez, G. Febles, (Ed.) FAO-ICA, Cuba, pp: 29-42.
- Mendonça, E.G., Stein, V.C., Carvalho, H.H., Santos, B.R., Beijo, L.A. y Paiva, L.V. (2016). *The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of Eucalyptus camaldulensis clones*. Ciência Florestal, 26 (4): 1211-1224.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures*. Physiol Plant, 15 (3): 473-479.
- Rocano, M.N., Villena, P.G. y Peña, D.F. (2017). *Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación in vitro de Juglans neotrópica*. Maskana, 8 (1): 103-109.
- Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arceo-Solano, S. y Abdelnour-Esquivel, A. (2018). *Micropropagación de Steviarebaudiana en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola*. Revista Chapingo Serie Horticultura, 24(1): 69-84.
- Salas, E., Agramonte, D., Jiménez-Terry, F., Pérez, M., Collado, R., Barbón, R. La O, M., De Fera, M. y Chávez, M. (2011). *Propagación de plantas de Morus alba var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal*. Biotecnología Vegetal 11 (2): 77-88.
- Silva, J.A., Solis-Gracia, N., Jifon, J., Creste, S. y Kiran, K. (2020). *Use of bioreactors for large-scale multiplication of sugarcane (Saccharum spp.), energy cane (Saccharum spp.), and related species*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 56: 366-376.
- Vervit. (2016). SETIS. En: [http://www.setis-systems.be/SETISsystems/About\\_SETIS.html](http://www.setis-systems.be/SETISsystems/About_SETIS.html).
- Vidal, N. y Sánchez, C. (2019). *Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees*. Engineering in Life Sciences, 19: 896–915.