

## Micropropagación del alcaparro en medio semisólido y en biorreactores de inmersión temporal

Fabián Contreras-Loera  
Lucía Isabel Chávez-Ortiz  
José Francisco Morales-Domínguez  
Eugenio Pérez-Molphe-Balch<sup>§</sup>

Centro de Ciencias Básicas-Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, 20131 Aguascalientes, México. (ibq.fabcl@gmail.com; luciachavez75@gmail.com; jfmoral@correo.uaa.mx).

<sup>§</sup>Autor para correspondencia: eperezmb@correo.uaa.mx.

### Resumen

El objetivo fue el desarrollo de un sistema eficiente para la micropropagación del alcaparro (*Capparis spinosa* L.), arbusto leñoso de gran interés por los productos derivados del mismo, su notable resistencia a la sequía y su tolerancia a las altas temperaturas. Primero se establecieron cultivos *in vitro* se a través de la desinfección y germinación de semillas. Fue necesaria una escarificación de estas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (98% v/v) para romper la dormancia. Solo 15% de las semillas germinaron. Se obtuvieron segmentos nodales a partir de las plántulas germinadas, mismos que se cultivaron en medio basal de Murashige y Skoog (MS) semisólido adicionado con benciladenina (BA), 2-isopenteniladenina (2iP) y metatopolina (MT), esto con el fin de inducir la brotación múltiple. La mejor respuesta se obtuvo con 2 mg L<sup>-1</sup> de estas citocininas, con un número promedio de brotes bien diferenciados por segmento nodal de 3.6 con MT, 2.3 con BA y 1.5 con 2iP, esto a los 54 d de incubación. Se probó también la combinación de las citocininas con una auxina, el ácido naftalenacético. Esta combinación mejoró la respuesta de la BA, alcanzando un promedio de 3.2 brotes por segmento nodal. Con las otras citocininas no mostró un efecto positivo, manteniéndose valores muy similares con y sin la auxina. Además de brotes bien diferenciados, se generaron masas o racimos de numerosos brotes pequeños, no aptos para su transferencia a medio de enraizamiento. Estas masas se transfirieron a biorreactores de inmersión temporal tipo RITA, en donde se generó un promedio de 89 brotes bien diferenciados por explante original, esto en un medio con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA con inmersiones de 2 min cada 6 h. Los brotes enraizaron con una eficiencia de 80% en el medio basal, generando plantas bien diferenciadas y aptas para su transferencia a suelo. La supervivencia ya en el medio externo de las plantas generadas *in vitro* fue de 85%, mostrando un desarrollo en apariencia normal ya en condiciones *ex vitro*.

**Palabras clave:** *Capparis spinosa*, citocininas, RITA<sup>®</sup>.

Recibido: enero de 2021

Aceptado: febrero de 2021

## Introducción

El desarrollo de métodos de propagación *in vitro* para especies vegetales de interés agrícola, farmacéutico o forestal ha tomado un auge considerable en los años recientes. Esto es aún más notorio en especies perennes en las que los métodos de multiplicación convencionales son poco eficientes. Un ejemplo de esto es el alcaparro (*Capparis spinosa* L.), especie de la familia Capparaceae cultivada en la zona del Mediterráneo y regiones adyacentes. Se trata de una especie con varios usos tradicionales y potenciales en las industrias alimentaria, medicinal, de cosméticos, farmacológica y ornamental (Khalil *et al.*, 2012; Carra *et al.*, 2012a; Farhoudi y Makezadeh, 2013).

El alcaparro destaca además por su resistencia a la sequía derivada de varias adaptaciones anatómicas (Gan *et al.*, 2013) y de su capacidad de mantener una alta tasa fotosintética bajo condiciones extremas de aridez y altas temperaturas (Levizou *et al.*, 2004), motivo por el cual es una especie de interés para ser introducida en regiones cálidas con una baja disponibilidad de agua. Sin embargo, una de las mayores dificultades para lograr esto es la disponibilidad de plantas. La propagación de esta especie por métodos convencionales es poco eficiente debido a la baja tasa de germinación de las semillas (Hessam *et al.*, 2012; Carra *et al.*, 2012a) y baja eficiencia de enraizamiento de sus esquejes vegetativos (Chalak y Elbitar, 2006; Khalil *et al.*, 2012).

Dado lo anterior, ya hay reportes de propagación *in vitro* de esta especie; por ejemplo, Rodríguez *et al.* (1990) propagaron al alcaparro a partir de segmentos nodales cultivados en medio de Murashige y Skoog (MS) adicionado con combinaciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Musallam *et al.* (2011) mencionan que el mejor medio para el establecimiento de las plantas fue el Lloyd y McCown (WPM) suplementado con 0.8 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (Cin), 0.05 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, obteniendo una elongación de brotes promedio de 1.89 cm, un número de nodos de 4.07 y un número de hojas de 8.45.

Además, obtuvieron 80% de enraizamiento con medio MS al 50% suplementado con 5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Las plántulas generadas *in vitro* se aclimataron con 63% de eficiencia. Por su parte, Al-Safadi y Elias (2011), reportan que el número promedio de brotes generados por explante fue de 5.5 cuando el medio de crecimiento MS contuvo 2 mg L<sup>-1</sup> de ribósido de zeatina, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA).

También reportan organogénesis indirecta a partir de callo, esto en un medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de Cin y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIA, produciéndose dos plantas por cada pieza de callo. Cerca de 86% de las plantas sobrevivieron al ser transferidas a macetas colocadas en un invernadero. Finalmente, Carra *et al.* (2012a) introdujeron el uso de citocininas sintéticas del grupo de las difeniluras en la multiplicación *in vitro* de la especie, encontrando que la N-fenil-N'-benzotiazol-6-il-urea (FBU) y la N-fenil-N'-(1,2,3-tidiazol-5-il-urea, llamada también tidiazurón (TDZ) fueron capaces de generar brotación múltiple en combinaciones con ácido indolbutírico (AIB), aunque con eficiencias menores que la BA.

Por otro lado, recientemente ha cobrado auge el uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs) como parte de los protocolos para la propagación masiva *in vitro* de plantas de interés. Estos dispositivos han demostrado su capacidad de incrementar notablemente la eficiencia y acortar los tiempos requeridos en otros sistemas (Etienne y Berthouly, 2002).

Los sistemas de inmersión temporal están diseñados para que el tejido vegetal permanezca sumergido en medio de cultivo líquido durante ciertos períodos alternados por períodos en seco en los que los tejidos están en contacto con el aire. La frecuencia y duración de estos períodos debe ser establecida para cada especie en particular. Existen varios diseños de BITs, siendo el más eficiente el Récipient à Immersion Temporaire Automatique (RITA<sup>®</sup>), Vitropic, SA, Francia.

Éste consiste en un recipiente dividido en dos secciones, la parte superior contiene las plántulas y la inferior el medio de cultivo. La presión aplicada al compartimento inferior por la inyección de aire comprimido estéril empuja al medio hacia la parte superior, donde entra en contacto con el tejido vegetal sumergiéndolo en tanto se aplique la presión. Durante el periodo de inmersión, el aire genera burbujas que agitan los tejidos y renuevan la atmósfera del espacio superior dentro de la cámara de cultivo, con la sobrepresión escapando a través de tubos de salida protegidos por filtros estériles en la parte superior del aparato. Una vez que cesa la presión del aire, el medio de cultivo baja por gravedad al compartimento inferior secando al tejido vegetal (Teisson *et al.*, 1996).

En este trabajo se reporta el desarrollo de esquemas completos de propagación *in vitro* del alcaparro, esto tanto en medios semisólidos convencionales, como en biorreactores de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup>. Esta tecnología puede ser aplicada para generar plantas suficientes para la introducción de esta especie como cultivo alternativo en regiones de México donde se combinen las altas temperaturas con la baja disponibilidad de agua.

## Materiales y métodos

Desinfección y ruptura de la dormancia de las semillas: se obtuvieron semillas de alcaparro (*Capparis spinosa* L.) de una empresa comercial. Las semillas se sometieron a tres diferentes tratamientos con el fin de desinfectarlas y romper la dormancia. En el tratamiento 1, las semillas se sumergieron en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado durante 20 min y se enjuagaron con agua corriente.

Posteriormente se trataron con etanol al 70% durante 45 s, se volvieron a enjuagar y se desinfectaron con blanqueador comercial a base de hipoclorito de sodio (Cloralex<sup>®</sup>) al 15% durante 15 min. En la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente se inocularon en recipientes de cultivo con 30 ml de medio basal de Murashige y Skoog (1962) o MS, a pH 5.7, con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g L<sup>-1</sup> de agar como gelificante.

Se colocaron cuatro semillas por recipiente de cultivo y se incubaron a 25 ±2 °C, bajo luz blanca tipo led (LED) con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad. En el tratamiento 2 a las semillas se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno, con agua corriente y jabón líquido Dermoclean<sup>®</sup> (10 ml L<sup>-1</sup>), se enjuagaron con agua corriente, se colocaron en etanol al 70% durante 45 s y se volvieron a enjuagar. Luego se desinfectaron con blanqueador a base de hipoclorito de sodio (Cloralex<sup>®</sup>) al 15% durante 15 min. En la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de 500 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> durante 24 h.

Después de este tiempo se colocaron en frascos con 30 ml de medio basal MS y se incubaron bajo las mismas condiciones que en el tratamiento 1. El tratamiento 3 fue similar al 2, solo que en lugar de dejarse las semillas durante 24 h en GA<sub>3</sub>, éstas se dejaron durante 120 h, después de lo cual fueron desinfectadas nuevamente con Cloralex<sup>®</sup> al 10% y finalmente se colocaron en frascos con 30 ml de medio basal MS y se incubaron bajo las condiciones mencionadas.

Las plántulas que germinaron a 67-100 días después de la inoculación, se transfirieron a medio basal MS con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) para acelerar su desarrollo y estimular la brotación de yemas laterales para obtener el material vegetal necesario para los experimentos subsecuentes.

Los brotes que se generaron en este medio fueron transferidos a medio MS adicionado con 1.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado con el fin que crecieran y se diferenciaron. Los segmentos nodales de las plántulas fueron usados como explantes para experimentos de multiplicación que se describen adelante.

Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) en la multiplicación *in vitro* del alcaparro: Se utilizaron como explantes segmentos nodales de 0.5 cm de longitud tomados de las plantas mantenidas en el medio con carbón activado y obtenidas de las semillas germinadas *in vitro*. En experimentos posteriores los segmentos nodales se tomaron de los brotes generados en experimentos previos. En un primer experimento se analizó el efecto de cinco diferentes citocininas en la generación de brotes a partir de los segmentos nodales.

Las citocininas probadas fueron benciladenina (BA), 2-isopenteniladenina (2iP), cinetina (Cin), metatopolina (MT) y tidiazurón (TDZ), todas de la marca Phytotechnology Labs. Las concentraciones probadas de cada citocinina fueron 0.5, 1, 1.5 y 2 mg L<sup>-1</sup>, generando 20 tratamientos. Como testigo se utilizó medio MS basal sin citocininas. Los explantes se inocularon de forma vertical cuidando que la yema quedara al nivel del medio nutritivo. Para cada tratamiento se utilizaron cinco recipientes de cultivo con tres segmentos nodales en cada uno de ellos (n= 15).

El experimento completo se realizó dos veces. En un segundo experimento se analizó la combinación de una citocinina con una auxina. Sólo se probaron las citocininas BA, 2iP, Cin y MT, ya que el TDZ mostró efectos tóxicos para esta especie en el primer experimento. Se probaron 1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de cada citocinina en combinación con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de la auxina ácido naftalenacético (ANA). Los explantes se inocularon de la misma forma que en el primer experimento.

Se utilizaron seis recipientes de cultivo con tres segmentos nodales cada uno por cada tratamiento (n= 18) y el experimento completo se realizó dos veces. En ambos experimentos las condiciones de incubación fueron las mismas que se utilizaron para la germinación de las semillas. El número de brotes por explante se registró a los 54 días de incubación.

Análisis estadístico de los resultados: dado que los datos generados no cumplieron con el supuesto de normalidad, se utilizó un análisis no paramétrico de datos longitudinales en experimentos factoriales para determinar el efecto relativo de cada uno de los tratamientos probados en la generación de brotes. El análisis estadístico se realizó con el programa R versión 3.2.3, utilizando la librería nparLD versión 2.1 (Noguchi *et al.*, 2012).

Multiplicación en biorreactores: se utilizaron biorreactores de inmersión temporal RITA<sup>®</sup>. Los explantes que se inocularon fueron masas de brotes poco diferenciados, generados en los medios semisólidos adicionados con BA, 2iP y MT. Se inocularon tres explantes por biorreactor. Las condiciones que se probaron fueron la citocinina adicionada al medio de cultivo y el número de inmersiones programadas por día. Los medios fueron MS basal con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA o de 2iP. Los ciclos de inmersión fueron cada 6 o cada 4 h, con una duración de dos minutos cada uno. Los biorreactores se colocaron en el cuarto de incubación durante 60 y 90 días bajo las mismas condiciones que los cultivos en medio semisólidos.

Enraizamiento: las pruebas de enraizamiento se realizaron con brotes generados en la etapa de multiplicación que tuvieran una longitud de al menos 5 mm, una yema axilar y que fueran de color verde en su totalidad. Los medios probados fueron el MS basal y MS adicionado con 1.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Se probaron también dos tipos de iluminación, leds de luz blanca y leds de radiación fotosintéticamente activa (RFA), que son la combinación de leds rojos y azules en proporción 7 a 1. La incubación se hizo a 25 ±2 °C. Se colocaron 80 brotes en cada uno de los tratamientos y el experimento completo se realizó dos veces. A los 50 días de incubación se determinó la presencia o ausencia de raíces en los brotes inoculados.

Aclimatación y transferencia a suelo de las plantas generadas: en la etapa de aclimatación se utilizaron cuatro protocolos: 1) se seleccionaron recipientes de cultivo que contuvieran brotes enraizados, a los que se les retiró el sello y se les aflojó la tapa. Se dejaron durante 22 d con la tapa floja en las mismas condiciones de incubación. Transcurrido este tiempo las plantas se sacaron del frasco de cultivo y las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar restos del medio de cultivo, se colocaron en bolsas de vivero con substrato comercial ProMix y se colocaron en una cámara bioclimática a una temperatura de 22-24 °C, humedad relativa 50-60% y fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) por 15 días, luego se llevaron al invernadero; 2) se siguieron los mismos pasos del protocolo 1 hasta colocarlos en bolsas con sustrato, pero se llevaron al invernadero y permanecieron en el mismo, cubiertas por la bolsa transparente por 17 d. Al día 24 se sacaron del invernadero y se colocaron a la intemperie; 3) similar al anterior, pero se sacaron del invernadero al día 77, cuando ya habían desarrollado varias hojas nuevas; y 4) las plantas permanecieron tres días cubiertas por la bolsa plástica y a los 63 días se sacaron del invernadero. En los protocolos, los resultados finales de supervivencia se tomaron a los 90 días de haberse iniciado los mismos.

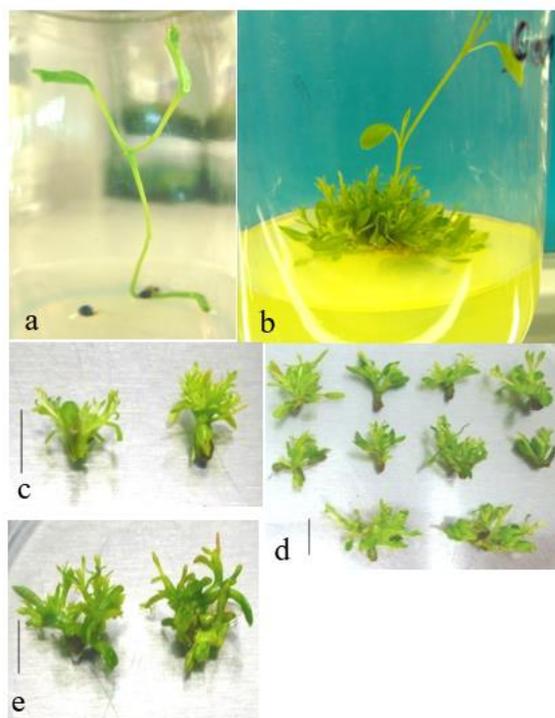
## Resultados y discusión

En cuanto a la germinación *in vitro* de las semillas, sólo el tratamiento 1, con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, fue capaz de romper la dormancia de las semillas, obteniéndose 15% de germinación (Figura 1a). En los tratamientos con GA<sub>3</sub> que se probaron (tratamientos 2 y 3) no hubo germinación. Además, la germinación fue muy asincrónica, ya que se dio entre los 67 y los 234 d de incubación. El porcentaje de germinación obtenido con el uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es inferior a lo obtenido por Al-Safadi y Elias (2011) con 32% y Bhoyar *et al.* (2010) con 33% y es superior a lo mencionado por Hessem *et al.* (2012) que mencionan que este tratamiento es inefectivo. En cuanto al uso de GA<sub>3</sub> para romper la dormancia, Hessem *et al.* (2012) obtuvieron un porcentaje de germinación de 42%, pero usaron una concentración cuatro veces mayor de giberelina (2 000 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> durante 24 h).

En cuanto a la multiplicación en medios semisólidos, cuando se usaron sólo citocininas, los mejores resultados se observaron con MT, BA y 2iP en la concentración de 2 mg L<sup>-1</sup>, con un número promedio de brotes por explante de 3.6, 2.3 y 1.5, respectivamente (Figuras 1c, 1d y 1e). La Cin generó valores menores a 1 brote por explante, similares al testigo sin citocininas, mientras que el TDZ generó muy pocos brotes (0.13 por explante), esto además de generar necrosis en 30% de los explantes tratados. Por lo anterior estas citocininas no se utilizaron en el siguiente experimento.

Es de resaltar, la buena respuesta generada por la metatopolina (MT), citocinina que hasta donde sabemos no había sido probada antes con esta especie. Esta es una citocinina aromática con una alta actividad en los tejidos vegetales (Strnad, 1997). Ha sido propuesta como una alternativa al

uso de la BA en aquellos procesos que requieren de esta actividad, como la multiplicación a partir de yemas o segmentos nodales. Esto es debido a su capacidad para estimular la generación de brotes con una eficiencia comparable a la BA, pero sin mostrar el efecto inhibitorio en el enraizamiento de éstos propio de la BA (Werbrouck *et al.*, 1996).



**Figura 1. Propagación *in vitro* del alcaparro en medio semisólido. a) plántula obtenida de semilla desinfectada y germinada *in vitro*; b) respuesta observada a los 90 d en un segmento nodal cultivado en medio con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de MT. Nótese la presencia de un brote bien diferenciado y una masa de brotes poco diferenciados en la base; c) respuesta a los 54 d de incubación de segmentos nodales expuestos a BA; d) a 2iP; y e) a MT. Barra= 1 cm.**

En este trabajo sólo se cuantificaron los brotes bien diferenciados, de al menos 8 mm de longitud y con al menos una yema axilar, los cuales fueron colectados para su enraizamiento. Sin embargo, en algunos casos en la base de los explantes se obtuvieron masas de brotes muy poco diferenciados y de tamaño muy pequeño para ser transferidos a medio de enraizamiento (Figura 1b). Este tipo de respuesta también fue reportada por Rodríguez *et al.* (1990). Estos brotes, al no ser aptos para ser transferidos a medio de enraizamiento, no se cuantificaron para los resultados de esta etapa.

Esta respuesta se observó en los tratamientos con BA, 2iP y MT. En experimentos similares, Musallam *et al.* (2011) obtuvieron los mejores resultados empleando medio de cultivo Lloyd y McCown (WPM) adicionado con BA a  $1.2 \text{ mg L}^{-1}$  con un promedio de brotes por explante de 4.6 a 4.8. Para la especie *Capparis decidua*, Deora y Shekhawat (1995) produjeron el mayor número de brotes por explante (7.2) en MS suplementado con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y Tyagi y Kothari (1997) obtuvieron la mejor multiplicación en medio MS suplementado con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA con un promedio por explante de seis brotes.

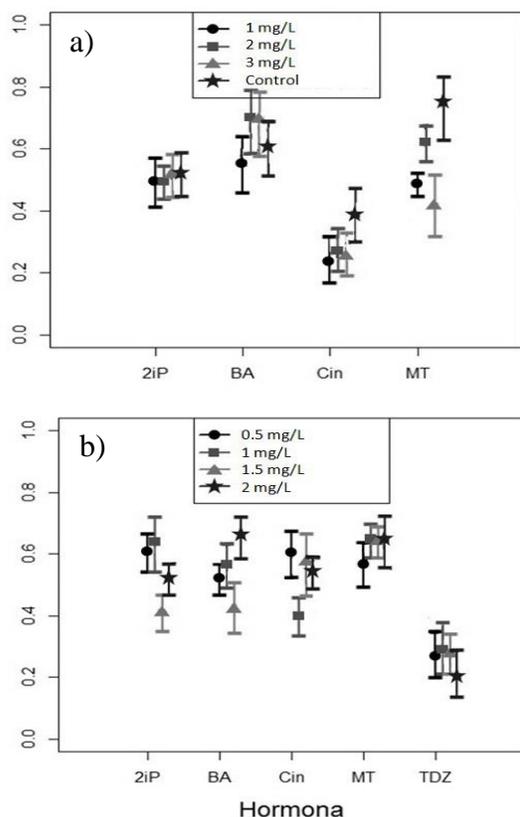
En las pruebas donde se utilizaron citocininas combinadas con auxina (ANA), los valores de número de brotes por explante se mantuvieron, excepto en el caso de la BA, en donde la combinación con ANA incrementó la eficiencia hasta 3.2. Carra *et al.* (2012a) utilizaron medio MS con 1.4 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB para la multiplicación, obteniendo 8.9 brotes por explante. En otro reporte, (Carra *et al.*, 2012b) colocaron explantes en MS complementado con 1.4 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.05 mg L<sup>-1</sup> de AIB generando de 8 a 10 brotes por explante. En la especie *Capparis decidua*, Deora y Shekhawat (1995) consiguieron el número máximo de brotes utilizando MS suplementado 5 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 25 mg L<sup>-1</sup> de L-arginina y de ácido cítrico, produciendo de 4 a 7 brotes por explante. Tyagi *et al.* (2010) consiguió la máxima formación de brotes en medio MS suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, con promedio de 20 brotes por explante. El mejor tratamiento de Vijay *et al.* (2014) para la inducción de brotes fue MS con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 30 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y de sulfato de adenina, obteniendo de 3 a 4 brotes por explante.

Como puede verse, los resultados en cuanto al número de brotes por explante, que se obtuvieron en este trabajo fueron inferiores a algunos de los reportados. Sin embargo, en este caso sólo se contabilizaron los brotes bien diferenciados generados en cada ciclo: es decir, los directamente aptos para enraizar y convertirse en plantas. Los grupos de brotes poco diferenciados, o masas de brotes, no se incluyeron en estos resultados. En la mayoría de los trabajos citados, se contabilizó la totalidad de los brotes generados, independientemente de su grado de diferenciación, lo que hace los valores no comparables.

Como se mencionó anteriormente, la tasa de germinación en esta especie es baja, por lo que es difícil tener plántulas que sirvan como fuente de explantes nodales. Sin embargo, con el sistema de propagación que aquí se propone, los brotes que se generan en un ciclo de multiplicación pueden ser usados como fuente de los explantes nodales necesarios para ciclos posteriores, manteniendo así la producción de plantas de manera indefinida. De esta forma solo es necesario realizar una vez el establecimiento de cultivos *in vitro* partiendo de semillas.

En cuanto al análisis numérico de los resultados, la Figura 2 muestra las gráficas obtenidas con el software R (ver. 3.2.3), el cual maneja una escala relativa (sin unidades) desde 0 hasta 1 y muestra el efecto de cada uno de los reguladores del crecimiento probados con sus respectivas concentraciones. El análisis estadístico muestra que existen diferencias entre los distintos tratamientos con base en un ANOVA-TypeStatisc (ATS) con un valor  $\alpha=0.05$ . Para el experimento sólo con citocininas (Figura 2a) se obtienen los valores de p de 3.48 e-14, 8.69 e-03 y 1.08 e-09, para el efecto de la citocinina, la concentración y la interacción citocinina: concentración, respectivamente. En el experimento donde se combinan las citocininas con ANA (Figura 2b), el valor de p para la citocinina es de 1.71 e-10, para la concentración es 5.64 e-09 y para la interacción citocinina: concentración es de 1.59 e-05.

Lo anterior demuestra que en ambos experimentos existe al menos un tratamiento que es estadísticamente diferente. En el primer caso es el TDZ, que tiene un efecto nulo en la producción de brotes, mientras que en el segundo caso es la combinación de CIN con ANA, que es la que menos afecta la producción de brotes. Este análisis demostró que estadísticamente existe influencia en la citocinina que se utiliza, su concentración y la interacción de la hormona con la concentración, en el número de brotes producido.

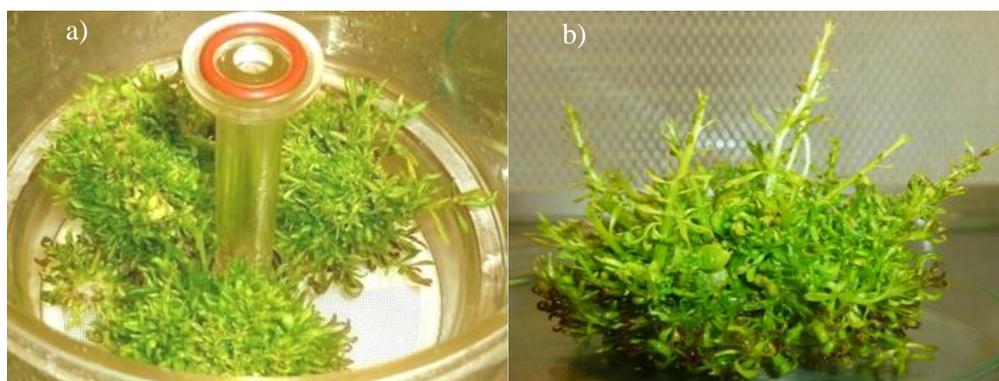


**Figura 2. Efectos relativos de los distintos tratamientos de acuerdo con un análisis no paramétrico de datos longitudinales realizado con el programa R versión 3.2.3, utilizando la librería nparLD versión 2.1 ( $p \leq 0.05$ ): a) citocininas a diferentes concentraciones; y b) citocininas combinadas con ANA.**

Las masas de brotes generadas en este trabajo son otro aspecto que resaltar. Primero, cuando éstas son transferidas a medio semisólido sin reguladores del crecimiento vegetal, algunos de los brotes comienzan a diferenciarse y a crecer, pudiendo ser colectados y transferidos a medio de enraizamiento, dejando a la masa de brotes en el mismo medio y recipiente para que a partir de la misma se vayan diferenciando más brotes.

Esto ocurre al retirar los primeros brotes que se diferenciaron, ya que en apariencia éstos ejercen una dominancia apical que detiene la diferenciación de otros brotes. De esta manera, en un recipiente de cultivo, se puede mantener una producción continua hasta por 200 d. Por otro lado, estas masas de brotes pueden ser inoculadas en un biorreactor de inmersión temporal, como se describe más adelante, en donde ocurrirá la diferenciación y el crecimiento de los brotes de manera simultánea, sin la demora y asincronía por dominancia apical observada en el medio semisólido.

En los sistemas RITA, el mejor tratamiento fue MS con BA ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) con inmersiones cada 6 h, produciendo en promedio 38.5 y 89 brotes bien diferenciados por explante, esto a los 60 y 90 d de incubación, respectivamente (Figuras 3a y 3b). Bajo las mismas condiciones, el tratamiento con 2iP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) generó un promedio de 52 y 67 brotes por explante. La mayor frecuencia de inmersión, cada 4 h, generó promedios de brotes un poco menores, pero con síntomas de hiperhidratación, por lo que no se consideró un tratamiento adecuado.



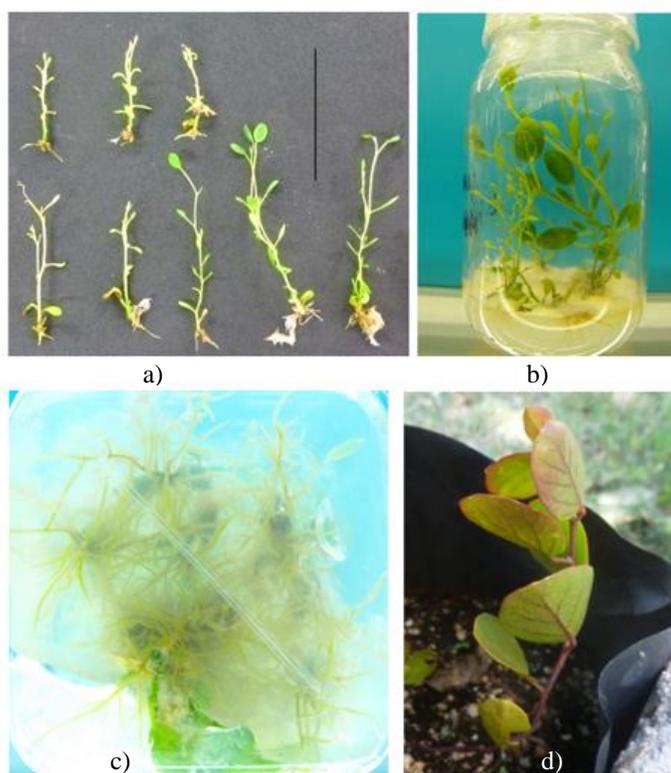
**Figura 3. Diferenciación de brotes de alcaparro en biorreactores de inmersión temporal (RITAs). a) respuesta de los explantes a los 60 días; y b) a los 90 días de estas sometidos a inmersiones de 2 min cada 6 h de medio enriquecido con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.**

Esta buena respuesta en los sistemas RITA se obtuvo con niveles de citocinina menores a los usados en medios semisólidos. En los experimentos preliminares, se probaron citocininas en concentraciones iguales a las usadas en medios semisólidos. En estos casos se observó poca diferenciación de los brotes y una alta hiperhidratación, por lo que se redujo la concentración de citocininas a la mitad, dando los buenos resultados mostrados. No se encontraron antecedentes sobre propagación en biorreactores en esta especie, pero sí se observó que la producción de brotes bien diferenciados en estos sistemas fue considerablemente mayor a la observada en medios semisólidos, coincidiendo esto con reportes hechos en otras especies en que se compara el medio semisólido con estos sistemas (Etienne y Berthouly, 2002).

En este trabajo se propone un sistema híbrido, en donde el explante nodal se cultiva en medio semisólido adicionado con MT, BA y 2iP, donde se generan masas de brotes muy pequeños y poco diferenciados, que luego se desarrollan en un RITA, llegando a producir, luego de estas dos etapas, un promedio de 89 brotes aptos para ser enraizados por cada explante nodal original.

El enraizamiento de los brotes generados ocurrió con una frecuencia de 80% en medio basal MS (Figuras 4a, 4b y 4c). La respuesta fue similar independientemente del tratamiento y sistema de cultivo en el que se llevó a cabo la etapa de multiplicación (medio semisólido o RITA). En el medio con carbón activado la eficiencia de enraizamiento fue menor, oscilando entre el 51 y 61%. Rodríguez *et al.* (1990); Chalak y Elbitar (2006); Musallam *et al.* (2011) utilizaron ácido indolacético para inducir el enraizamiento en esta especie, y obtuvieron 80%, 87% y 70% de eficiencia, respectivamente.

Para la especie *Capparis decidua* Tyagi y Kothari (1997) utilizaron ácido indolbutírico con un porcentaje de enraizamiento de 65%. En este trabajo se obtuvo una eficiencia similar sin la necesidad de incorporar auxinas al medio de cultivo. Esto es importante, ya que en otras especies leñosas se ha reportado que las auxinas pueden generar además de raíces, tejido calloso que puede afectar la supervivencia *ex vitro* de las plantas, quizá debido a que causa una interrupción en la conexión de los sistemas vasculares entre el brote y la raíz (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).



**Figura 4. Enraizamiento y crecimiento en suelo de plantas de alcaparro generadas *in vitro*. a) inicio del enraizamiento y crecimiento de brotes de alcaparro a los 25 d de haber sido separados y colocados en medio basal (barra= 5 cm); b) plantas generadas *in vitro* a los 50 d de incubación en medio basal, listas para su adaptación y transferencia a suelo; c) aspecto de los sistemas radicales generados a los 50 d; y d) planta generada *in vitro*, creciendo ya en suelo y en el exterior a los 50 d de haber salido del sistema *in vitro*.**

La calidad de la luz, blanca o RFA, no afectó la tasa de enraizamiento, ni el desarrollo de la parte aérea de las plántulas en esta etapa. Sin embargo, dado que el consumo energético de las lámparas de RFA es menor a las de luz blanca, su uso podría ser una ventaja desde el punto de vista del costo de producción. Este tipo de iluminación ha demostrado efectos benéficos en la fotomorfogénesis y productividad de diversas especies vegetales, tanto en condiciones de invernadero, como *in vitro* (Goins *et al.*, 1997; Dutta Gupta y Jatothu, 2013).

Finalmente, con respecto al proceso de adaptación y transferencia a suelo de las plantas generadas *in vitro*, los mejores resultados se obtuvieron con el segundo de los protocolos probados, con 85% de supervivencia (Figura 4d). En los protocolos 3 y 4, la supervivencia fue menor (65 y 47%). En cuanto al protocolo 1, en el que se hizo uso de una cámara bioclimática para regular las condiciones ambientales, éste resultó ineficiente, ya que la totalidad de las plantas murieron al sacarlas de la cámara y llevarlas al invernadero. La literatura reporta porcentajes de sobrevivencia similares a los obtenidos en esta investigación, Chalak y Elbitar (2006); Al-Safadi y Elias (2011); Carra *et al.* (2012a); Vijay *et al.* (2014), este último para la especie *C. decidua*, reportan supervivencias de 86%, 82%, 92% y 80%, respectivamente.

## Conclusiones

Se confirmó la baja eficiencia de la multiplicación del alcaparro a través de semillas, esto debido a su baja tasa de germinación. Esto justifica el desarrollo de sistemas de multiplicación *in vitro* que permitan la obtención masiva de plantas. Se observó que las citocininas MT, BA y 2iP son capaces de generar brotes múltiples y masas de brotes en medio semisólido. Los brotes bien diferenciados fueron enraizados y convertidos en plántulas, mientras que las masas de brotes fueron transferidas a un sistema RITA, donde generaron 89 brotes bien diferenciados por explante original. El enraizamiento y adaptación y transferencia a suelo de las plantas obtenidas *in vitro* ocurrieron con eficiencias de 80 y 85%, respectivamente. Si bien ya había reportes sobre la propagación *in vitro* de esta especie, este trabajo aporta el uso de la MT y de los sistemas RITA, lo que incrementa notablemente la eficiencia del sistema.

## Literatura citada

- Al-Safadi, B. and Elias, R. 2011. Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using *in vitro* culture and gamma irradiation. *Scientia Horticulturae*. 127:290-297. Doi: 10.1016/j.scienta.2010.10.014.
- Bhojar, M. S.; Mishra, G. P.; Singh, R. and Singh, S. B. 2010. Effects of various dormancy breaking treatments on the germination of wild caper (*Capparis spinosa*) seeds from the cold arid desert of trans-Himalayas. *Indian J. Agric. Sci.* 80:621-625.
- Carra, A.; Del Signore, M. B.; Sottile, F.; Ricci, Ada. and Carimi, F. 2012a. Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regulators*. 66:229-237. Doi: 10.1007/s10725-011-9645-3.
- Carra, A.; Sajeve, M.; Abbate, L.; Siragusa, M.; Sottile, F. and Carimi, F. 2012b. *In vitro* plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109:373-381. Doi: 10.1007/s11240-011-0102-9.
- Chalak, L. and Elbitar, A. 2006. Micropropagation of *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris* Sibth. & Sm. by nodal cuttings. *Indian J. Biotechnol.* 5:555-558.
- Delgadillo-Diaz, L. J. S.; Morales-Dominguez, J. F.; Santos-Diaz, M. S. and Pérez-Molphe, B. E. 2013. *In vitro* propagation of Mexican oaks (*Quercus* spp.). *Polibotánica*. 35:85-97.
- Deora, N. S. and Shekhawat, N. S. 1995. Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew. A tree of arid horticulture. *Plant Cell Reports*. 15:278-281. Doi:10.1007/BF00193736.
- Dutta-Gupta, S. and Jatothu, B. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol. Reports*. 7:211-220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>.
- Etienne, H. and Berthouly, M. 2002. Temporary immersion system in plant Micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:215-231. Doi:10.1023/A:1015668610465.
- Farhoudi, R. and Makezadeh, T. M. 2013. The effect of seed dormancy breaking methods on caper (*Capparis spinosa* L.) germination and growth. *Sci. J. Agron. Plant Breed*. 1:20-25.
- Gan, L.; Zhang, C.; Yin, Y.; Lin, Z.; Huang, Y.; Xiang, J.; Fu, C. and Li, M. 2013. Anatomical adaptations of the Xerophilous medicinal plant, *Capparis spinosa*, to drought conditions. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54:156-161. Doi:10.1007/s13580-013-0162-3.

- Goins, G. D.; Yorio, N. C.; Sanwo, M. M. and Brown, C. S. 1997. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *J. Exp. Bot.* 48:1407-1413.
- Hessam, A. I.; Khani-Nejad, S. and Kafi, M. 2012. Roles of duration and concentration of priming agents on dormancy breaking and germination of caper (*Capparis spinosa* L.) for the protection of arid degraded areas. *Pak. J. Bot.* 44:225-230.
- Khalil, S. M.; Ramachandra, B. N.; Jacob, S. and Rachel, T. R. 2012. Effect of rooting hormones (IBA and NAA) on rooting of semi hardwood cuttings of *Capparis spinosa*. *J. Agric. Biod. Res.* 1:135-139.
- Levizou, E.; Drilias, P. and Kyparissis, A. 2004. Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of Mediterranean summer. *Photosynthetica.* 42:229-235. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000040594.85407.f4>.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15:473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Musallam, I.; Duwayri, M. and Shibli, R. A. 2011. Micropropagation of caper (*Capparis spinosa* L.) from wild plants. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 5:17-21.
- Noguchi, K.; Gel, Y. R.; Brunner, E. and Konietzschke, F. 2012. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J. Statistical Software.* 50:1-23. Doi: 10.18637/jss.v050.i12.
- Rodríguez, R.; Cuzzo L. M. R. and Ancora, G. 1990. *In vitro* propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *In vitro Cellular Development Biology-Plant.* 26:531-536. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02624097>.
- Strnad, M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum.* 101:674-688. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x.
- Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, B.; Cote, F.; Escalant, V.; Etienne, H. and Lartaud, M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440:521-526. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.440.91>.
- Tyagi, P. and Kothari, S. L. 1997. Micropropagation of *Capparis decidua* through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature tree and seedling explants. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 6:19-23. Doi: 10.1007/BF03263003.
- Tyagi, P.; Khanduja, S. and Kothari, S. 2010. *In vitro* culture of *Capparis decidua* and assessment of clonal fidelity of the regenerated plants. *Biologia Plantarum.* 54:126-130. Doi: 10.1007/s10535-010-0019-x.
- Vijay, N.; Arya, S. and Arya, L. D. 2014. Rapid and mass propagation of the economically important desert plant *Capparis decidua* for its afforestation program. *J. Arid Land Studies.* 24:33-36.
- Werbrouck, S. P. O.; Strnad, M.; Van-Onckelen, H. A. and Debergh, P. C. 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum.* 98:291-297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x>.