

Artículo científico**EFFECTOS DE LA HIPERHIDRICIDAD SOBRE LA REGENERACIÓN DE ÁPICES CRIOCONSERVADOS DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)**

María de los Ángeles Torres Mederos

RESUMEN

La hiperhidricidad es un desorden que ocurre en el cultivo de los tejidos vegetales y causa anomalías morfológicas y la muerte de las plántulas. En este trabajo se evaluó el efecto de la hiperhidricidad sobre la regeneración de plantas a partir de ápices crioconservados de ajo. En un primer experimento, parte de los ápices mostraron síntomas severos de hiperhidricidad con pérdida de su capacidad regenerativa, lo que condujo a modificaciones en los procedimientos de la recuperación. La crioconservación se realizó mediante el protocolo vitrificación con la solución PVS3. La ocurrencia y los efectos de la hiperhidricidad fueron variables entre las diferentes réplicas, pero todas regeneraron plantas viables. Los ápices crioconservados y los de la muestra control mostraron resultados similares respecto al desarrollo de las plántulas. El 40 % de los ápices crioconservados que mostraron síntomas ligeros de hiperhidricidad regeneraron plantas normales y en el 60 % restante, las plantas produjeron bulbillos de pequeño tamaño o no los desarrollaron. Los ápices con que síntomas severos produjeron plantas poco desarrolladas o murieron. Aunque en la aparición de la hiperhidricidad influyen diferentes factores del cultivo de tejidos, la inundación del apoplasto se considera su causa principal; por ello, en la continuidad de las investigaciones sobre la conservación *in vitro* de ajo en el Banco de Germoplasma del INIFAT se requiere hacer énfasis en las prácticas que eviten altos niveles de humedad relativa en el vaso de cultivo y considerar la incidencia de la hiperhidricidad en la estimación de las plantas viables.

Palabras clave: ajo, crioconservación, hiperhidricidad**Hyperhydricity effects on the regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) cryopreserved apices.****ABSTRACT**

Hyperhydricity is a disorder which occurs in plant tissue culture and causes morphological abnormalities and death of plantlets. This study is intended to evaluate the effects of hyperhydricity on plant regeneration of garlic cryopreserved apices. In a first experiment, a part of the apices showed severe hyperhydricity symptoms and losses their regenerative ability, leading to modifications of the recovery procedure. The apices were cryopreserved by the vitrification protocol with the PVS3 solution. The occurrence and the effects of hyperhydricity were variable among different replicas, but all of them regenerated viable plants. The cryopreserved apices and those of the control sample showed similar results regarding the

DrC. María de los Ángeles Torres Mederos, Investigador Titular del Departamento de Recursos Fitogenéticos y Semillas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). MINAG. Calle 188 no. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. E-mail: genetica14@inifat.co.cu

development of the plantlets to bulblets. The 40 % of cryopreserved apices with mild hyperhydricity symptoms regenerated normal plants, and the other 60 % produced plants with bulblets of small size or without bulblet development. Apices with severe hyperhydricity symptoms showed less developed plants or died. Although different factors of *in vitro* culture influence hyperhydricity appearance, the flooding of apoplast is considered the mayor causative effect of the hyperhydricity syndrome. That is why, practices that avoid high relative humidity inside the culture vessel need to be improved, and the hyperhydricity incidence must be considered for garlic plant viability estimations of *in vitro* conservation researches at INIFAT's Gene Bank.

Key words: garlic, cryopreservation, hyperhydricity

INTRODUCCIÓN

La hiperhidricidad es un desorden morfológico, anatómico y fisiológico que ocurre durante la micropropagación de muchas plantas (Bayraktar *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2018), por lo que su incidencia se evalúa sobre todo en los procesos de propagación en medio líquido (Ayub *et al.*, 2019; Pérez-Pérez *et al.*, 2020), aunque también aparece en otros procedimientos del cultivo de tejidos con diferentes grados de severidad. Puede presentarse con síntomas como hojas gruesas, deformadas, con apariencia vítrea, coloración verde claro, hojas alargadas, túrgidas, y curvadas; y en su expresión más severa, puede evolucionar irreversiblemente a la pérdida de la capacidad regenerativa de los tejidos (Gaspar *et al.*, 2000).

Los tejidos hiperhídricos se caracterizan por un alto contenido de agua, y se considera que ese exceso de agua está vinculado a la hinchazón de las células, debido a una presión de pared menor, originada por la reducción de los niveles de celulosa y lignina (de Klerk y Pramanik, 2017).

En una serie de experimentos, de Klerk *et al.* (2017) demostraron que si se evitaba o se intensificaba la inundación del apoplasto (constituido por los espacios extracelulares entre la membrana y la pared celular) disminuía o se incrementaba respectivamente la manifestación

de la hiperhidricidad, de lo que concluyeron que la inundación del apoplasto es evidentemente el principal factor que produce este desorden.

La acumulación de agua en el apoplasto imposibilita el intercambio gaseoso entre las células, originando una anaerobiosis (van den Dries *et al.*, 2013); y en las células se produce la acumulación de gases como el etileno y el jasmonato y se bloquea la comunicación entre ellas por medio de las hormonas gaseosas. La hipoxia de los tejidos, originada por la disminución del intercambio gaseoso, puede inducir la formación de las especies reactivas del oxígeno (EROs), dando lugar al estrés oxidativo; el cual significa un incremento en el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilos ($\bullet OH$) y los hidroperóxidos (ROO^{\bullet}), que originan daños en los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos (Guimãraes-Vieira *et al.*, 2012); aunque la producción de EROs en los cloroplastos y las mitocondrias tiene importantes funciones de señalización en la expresión genética, el daño y la muerte celular; juega un papel importante en la comunicación intercelular y a largas distancias en las plantas; y también en procesos como la regulación de la arquitectura radicular, el crecimiento polar y la senescencia de los órganos (Dietz *et al.*, 2016).

Debido a que la hiperhidricidad se vincula a la acumulación de agua en el apoplasto, su origen se atribuye a condiciones del cultivo de tejidos que no favorecen la transpiración, como los altos niveles de humedad relativa en el vaso de cultivo (Rojas-Martínez y de Klerk, 2010). También se ha encontrado la influencia del agente gelificante del medio de cultivo (de Klerk *et al.*, 2017), así como de su composición, en particular de la fuente de nitrógeno (Nagakubo *et al.*, 1997; Ivanova y Van Standen, 2009); y para su control se ha estudiado la incorporación al medio de diferentes sustancias, como el silicio (Soundararajan, *et al.*, 2017; Muneer *et al.*, 2018), el AgNO₃ (Gao *et al.*, 2016) y el Dikegulac (2,3:4,6-di-O-isopropylidene- α -L-xylo-2-hexulofuranosonic acid) (Antonopoulou *et al.*, 2018), entre otros.

Bakir *et al.* (2016) realizaron estudios moleculares mediante análisis de secuenciación del RNA en hojas hiperhídricas de melocotón [*Prunus persica* (L.) Batsch] y encontraron que la expresión de más de 300 transcritos (ARN producto de la transcripción del ADN) resultó alterada en las hojas de las plantas hiperhídricas respecto al control, 30 de ellos relacionados con reguladores post-transcripcionales de la expresión genética de los organelos y la fotosíntesis, la eliminación celular, el desarrollo de la cutícula y la respuesta al estrés abiótico.

Las características de la especie y el tipo de explante también influyen en la manifestación de la hiperhidricidad. Así, hay autores que plantean que la predisposición a la hiperhidricidad es genotipo dependiente, con variaciones que pueden ocurrir no solo entre especies sino también entre variedades o cultivares de una misma especie, lo que hace necesario la evaluación de las diferentes especies de plantas, de variedades y de cultivares (Amer y Omar, 2019). En la actualidad, se ha encontrado que más de 200 especies han presentado este

desorden fisiológico, y entre ellas el ajo se señala como muy susceptible (Liu *et al.*, 2017).

En las investigaciones dirigidas a la crioconservación de ajo en el Banco de Germoplasma del INIFAT, la manifestación de la hiperhidricidad, en algunos casos ha llegado a manifestarse en forma severa. El objetivo de este trabajo es evaluar la influencia de la hiperhidricidad y de su severidad en la regeneración de ápices crioconservados de ajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó la incidencia de la hiperhidricidad sobre la regeneración de plantas de dos experimentos de crioconservación de ápices de ajo. La procedencia del material vegetal y el procedimiento de crioconservación fue el mismo en ambos experimentos. Sobre la base de los resultados obtenidos respecto a la hiperhidricidad en el Experimento 1, se realizaron algunos ajustes en la fase de recuperación del Experimento 2, o sea que las diferencias entre los experimentos radican en la fase de recuperación de las plantas, después de la extracción del nitrógeno líquido.

Como material vegetal se trabajó con un clon Criollo colectado en la localidad de Güira de Melena, provincia de Artemisa y su utilizó como protocolo de crioconservación la vitrificación con la solución PVS3.

De los bulbos (dientes) de ajo, desinfectados y germinados *in vitro* se extrajeron los ápices de crecimiento, compuestos por el meristemo de crecimiento, uno o dos primordios foliares y parte de la base del diente (de 1 a 2 mm), con un tamaño total del ápice no mayor de los 4 mm. La crioconservación se realizó según el procedimiento descrito por Keller y Senula (2013), como se describe a continuación.

Después del corte, los ápices se mantuvieron hasta el día siguiente en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con

0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético y 0,1 mg.L⁻¹ de kinetina (a la temperatura de 25 °C). A continuación, se colocaron en crioviales de 1,8 mL y se trataron con una solución 2,0 M de glicerol + 0,4 M de sacarosa, por 20 min, a temperatura ambiente (25 °C). Esta solución se reemplazó con 1,5 mL de la solución de vitrificación PVS3 (plant vitrification solution) (50 % de glicerol + 50 % de sacarosa) y el criovial se movió ligeramente, de modo que los ápices quedaran cubiertos y se dejaron en la solución por 2 h, con el objetivo de provocar la deshidratación. Posteriormente, la PVS3 se renovó (volumen 0,5 mL) y los crioviales se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196 °C), por 2 h. La muestra se transfirió a la temperatura ambiente al sumergirla con agitación, en un baño de agua a la temperatura de 40 °C, por 80 s. Por último, se extrajo la solución PVS3 y los ápices se lavaron con 1,5 mL de una solución del medio MS con 1,2 M de sacarosa, por 10 min.

Además de la muestra crioconservada se trató una muestra control, que recibió igual tratamiento exceptuando la inmersión en el nitrógeno líquido, para discriminar el efecto de la crioconservación de cualquier otro efecto relacionado con el cultivo *in vitro*.

Recuperación

Experimento 1.

Después de la extracción del nitrógeno líquido, los ápices se colocaron en medio BDS (Dunstan y Short, 1977) con 0,3 M de sacarosa y 0,6 % de agar en placas de Petri de 90 mm de diámetro y al día siguiente, se pasaron al mismo medio aumentando la concentración de sacarosa al 3 %. Se mantuvieron las primeras 24 h en oscuridad y posteriormente en fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad, a la temperatura de 24 ± 2 °C. A las cuatro semanas del tratamiento, los ápices se transfirieron a erlenmeyers de 100 mL.

Se consideró como supervivencia a la cantidad de ápices que mostraron coloración verde y aumento de tamaño y como valor de la regeneración a los ápices que emitieron nuevas hojas. Ambas se evaluaron a las cuatro semanas de la recuperación, en porcentaje. Además, se evaluó el crecimiento (cm), el color, la emisión de hojas (%), la contaminación (%) y la hiperhidricidad (%).

Se utilizaron tres réplicas, de 10 ápices por tratamiento (30 ápices).

Los resultados del Experimento 1, en cuanto a la manifestación de la hiperhidricidad, motivaron ajustes en la fase de recuperación del segundo experimento.

Experimento 2.

A la salida del nitrógeno líquido, los ápices se colocaron en placas de Petri, con medio MS conteniendo 0,3 M de sacarosa y agar al 0,8 %, cubierto con papel de filtro. A las 24 h, se transfirieron a placas de Petri, con el medio Linsmaier y Skoog (1965), con una relación en las concentraciones KNO₃/NH₄Cl de 56,5/3,5 mM (Nagakubo *et al.*, 1997), 3 % de sacarosa y 75 µM de ácido giberélico, cubierto con papel de filtro. Las placas se mantuvieron durante una semana en la oscuridad y después los ápices se pasaron de las placas a erlenmeyers de 100 mL manteniendo el mismo medio de cultivo. Después de 15 días en los erlenmeyers (a las tres semanas del tratamiento de crioconservación), los brotes se pasaron a tubos de cultivo individuales, con el mismo medio de cultivo y la identificación del criovial de origen. Durante su desarrollo las plantas se mantuvieron en fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad, a la temperatura de 24 ± 2 °C. Una vez que iniciaron la bulbificación, se transfirieron al medio BDS con 15 % de sacarosa.

La muestra crioconservada estuvo formada por 41 ápices distribuidas en ocho crioviales (cinco

ápices por criovial) y 15 ápices para la muestra control.

Las muestras se revisaron diariamente durante la primera semana y a continuación, semanalmente.

Para evaluar la manifestación de la hiperhidricidad se establecieron las categorías:

No H: No se manifestó la hiperhidricidad, los ápices de crecimiento desarrollaron hojas fototrópicas, sin engrosamiento, curvaturas o cualquier otro síntoma externo.

HL (hiperhidricidad ligera): La primera hoja mostró engrosamiento o curvatura, pero el ápice de crecimiento y las nuevas hojas no mostraron síntomas.

HS (hiperhidricidad severa): Puede manifestarse en diferentes niveles de severidad, desde el aspecto suculento de la hoja externa y la ralentización del desarrollo del ápice de crecimiento hasta la pérdida de la organogénesis.

Para evaluar el desarrollo que alcanzaron las plantas regeneradas se establecieron las categorías siguientes:

PB (plantas que bulbificaron): plantas que presentaron las fases del crecimiento propias del cultivo y mostraron buen desarrollo del bulbo.

BP (bulbos pequeños): plantas que mostraron todas las fases de desarrollo del cultivo, pero produjeron bulbos de menor tamaño.

No B: plantas que no bulbificaron

No DA: plantas que no desarrollaron el ápice de crecimiento.

Los valores se expresaron en porcentajes, para cada tratamiento respecto a la cantidad total de explantes que componían la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1

La regeneración de los ápices a las 4 semanas de la recuperación se muestra en la Tabla 1. En ella se observa que el 66,1 % de los ápices (las dos terceras partes) habían producido brotes con un tamaño superior a 1 cm y mostraban la emergencia de nuevas hojas. En la tercera parte de los ápices (el 33,3 %) se observaron síntomas de hiperhidricidad, llegando en algunos casos a manifestarse de forma severa, con la pérdida de la organogénesis como muestra la Figura 1. La evolución de la hiperhidricidad hacia la pérdida de la capacidad regenerativa de los tejidos se atribuye a variaciones genéticas en la población celular, a cambios epigenéticos y a la desaparición de las sustancias promotoras de la morfogénesis (Gaspar *et al.*, 2000). En otros casos de hiperhidricidad severa, se observó cierto crecimiento de los primordios foliares engrosados, pero no se produjo el crecimiento del meristemo apical. Al analizar las condiciones del cultivo a las que estuvieron expuestos los explantes se encontraron algunos factores que pudieron haber influido en la manifestación severa de la hiperhidricidad.

Tabla 1. Características de los ápices crioconservados a las cuatro semanas de la recuperación.

| Indicador | (%) |
|-------------------------|------|
| Supervivencia | 95,5 |
| Regeneración | 91,0 |
| Crecimiento (+ de 1 cm) | 66,7 |
| Color verde | 72,7 |
| Emisión de hojas | 66,7 |
| Hiperhidricidad | 33,3 |
| Contaminación | 8,7 |

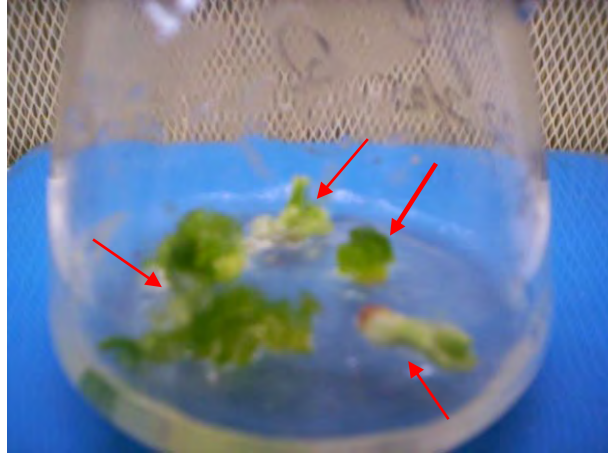


Figura 1. Manifestación de la hiperhidricidad severa en la recuperación de ápices de ajo crioconservados. Las flechas indican que en parte de los ápices se produjo la pérdida de la capacidad organogénica.

En primer lugar, en la fase inicial de la recuperación los explantes se colocaron directamente sobre el medio de cultivo sin papel de filtro, lo que hizo más directo el intercambio del explante con la fase líquida del medio. Además, se mantuvieron por un tiempo prolongado en las placas de Petri, donde existe mayor cercanía de los ápices con la humedad depositada en la superficie superior interna de las placas, un recipiente relativamente pequeño. Al respecto George (1993/1996) señaló que, en las condiciones de muchos cuartos de cultivo, la parte superior de los vasos es más fresca que la base, lo que produce la condensación de gotas de agua en la tapa, y provoca que el aire esté completamente saturado. Por tal motivo, los brotes que se desarrollan en envases pequeños son proclives a convertirse en hiperhídricos

Otro aspecto desfavorable pudo ser la composición del medio de cultivo, en particular la fuente de nitrógeno dada por la relación $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$. En el Experimento 1 se utilizó medio BDS, que contiene una proporción de los iones NO_3^- y NH_4^+ expresada en meq/L de 29,02:8,02 (la relación NO_3^- respecto al nitrato NH_4^+ es de 3,61). La proporción NH_4^+ de este

medio es menor que en el MS (relación 39,4:20,61; $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 1,91$) (George, 1993/1996), pero es posible que aun no haya sido suficientemente baja para evitar el efecto tóxico del amonio. El efecto de la relación nitrato:amonio sobre la hiperhidricidad se ha estudiado en diferentes trabajos. Se considera que el amonio es asimilado más rápidamente que otras fuentes de nitrógeno, como el nitrato, y que en bajas concentraciones de agar este efecto diferencial puede aumentarse y resultar tóxico a los tejidos vegetales, al provocar un aumento de la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa, la cual desvía el metabolismo de los azúcares de la síntesis de la celulosa y la lignina hacia la producción de aminoácidos (George, 1993/1996). Ivanova y Van Staden (2009) estudiaron el efecto del NH_4 en diferentes variantes y atribuyeron la inhibición de la morfogénesis y el crecimiento, en respuesta a la aplicación del NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, a cambios en el pH del medio y a los efectos tóxicos del NH_4 libre, reforzando el criterio de la desviación del metabolismo de los carbohidratos hacia la síntesis de proteínas. La influencia de las bajas concentraciones de agar

sobre la asimilación del amonio, también pudo estar presente en este experimento, ya que la concentración de agar en el medio fue del 0.6 %.

Experimento 2.

Manifestación de la hiperhidricidad en las diferentes réplicas (crioviales de origen).

En este experimento las plantas se identificaron de acuerdo al criovial en el que se crioconservaron y al tubo de cultivo en el que completaron su desarrollo, lo cual permitió apreciar que la manifestación de la hiperhidricidad mostró el comportamiento

señalado por George (1993/1996), quien refiere que “Ápices con diferente grado de vitescencia (hiperhidricidad) son encontrados frecuentemente en el mismo vaso de cultivo y en diferentes vasos del mismo cultivo”.

En la Figura 2 se puede observar como la manifestación de la hiperhidricidad y la intensidad de los síntomas (ligera, HL; severa, HS), fue muy variable entre las diferentes réplicas; y que la mayor parte de las réplicas regeneraron brotes que no presentaron los síntomas o mostraron hiperhidricidad ligera.

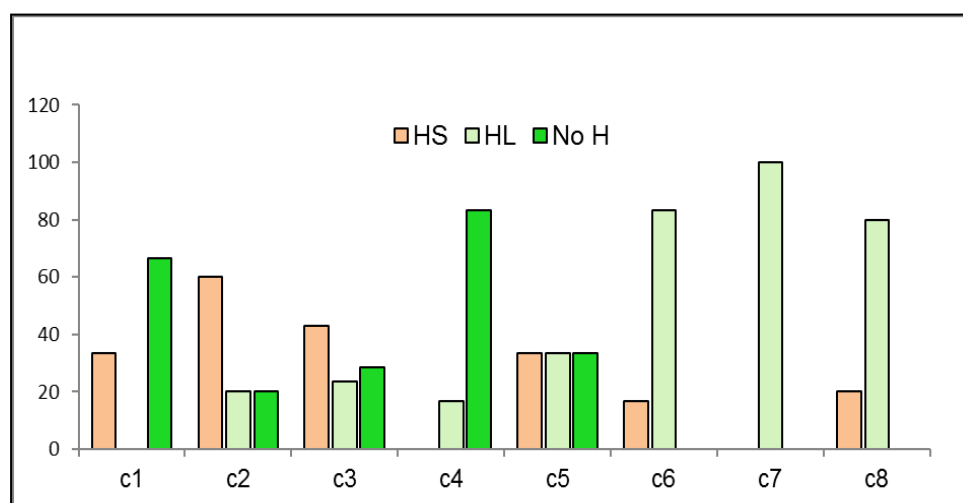


Figura 2. Grados en que se manifestó la hiperhidricidad en las diferentes réplicas (crioviales de origen), a las cuatro semanas de iniciada la recuperación de los ápices crioconservados de ajo (C: criovial de origen; No H: sin síntomas de hiperhidricidad; HL: hiperhidricidad ligera; HS: hiperhidricidad severa).

La supervivencia de los ápices de diferentes réplicas al tratamiento de crioconservación, expresada por la aparición del color verde y el aumento de tamaño, se muestra en la Figura 3.

El comportamiento del desarrollo de las vitropantitas de cada réplica, expresado por la formación de bulbillos, se representa en la Figura 4. Como se puede observar de todos crioviales se obtuvieron plantas viables que completaron su desarrollo hasta la bulbificación,

aspecto importante desde el punto de vista del resultado de la crioconservación.

Comparación de la hiperhidricidad entre la muestra crioconservada y el control

La Tabla 2 resume la supervivencia a las cuatro semanas del tratamiento y el desarrollo posterior de las plantas regeneradas a partir de los ápices crioconservados, comparándolos con la muestra control (sin inmersión en el nitrógeno líquido).

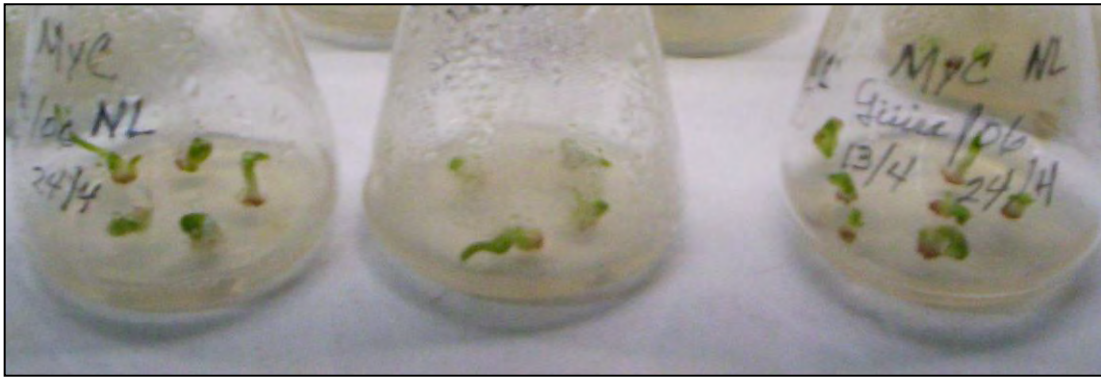


Figura 3. Ápices de ajo del cultivar 'Criollo' crioconservados mostrando un alto nivel de supervivencia (cada erlenmeyer corresponde al criovial de origen).

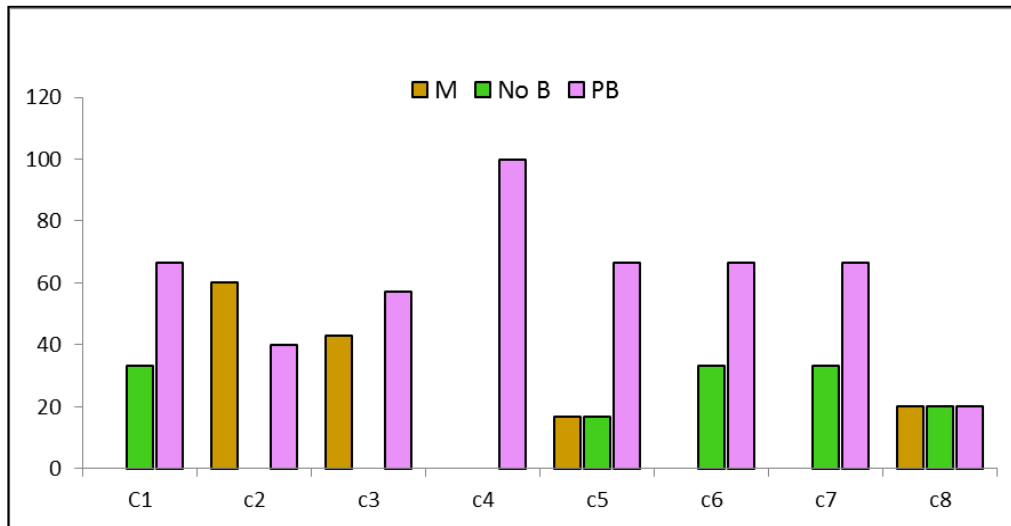


Figura 4. Desarrollo de los ápices crioconservados hacia la formación de vitroplantas bulbificadas a las 15 semanas de iniciada la recuperación. Se presentan las diferentes réplicas de acuerdo a los crioviales de origen (C: criovial de origen; PB: plantas que bulbificaron; No B: plantas que no bulbificaron; M: ápices muertos).

Tabla 2. Supervivencia de los ápices de ajo regenerados de la crioconservación y desarrollo de plantas regeneradas a las 15 semanas posteriores al tratamiento (Los valores se expresan en porcentaje, respecto al total de explantes de cada muestra. * Tiempo transcurrido desde el tratamiento de crioconservación. Supervivencia: Ápices que mostraron coloración verde y aumento de tamaño).

| | Supervivencia (* 4 semanas) | Planta vivas (15 semanas) | Plantas bulbificadas (15 semanas) |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Crioconservados | 85,6 | 68,3 | 56,1 |
| Control | 100 | 55,6 | 55,6 |

En el Experimento 2 la hiperhidricidad no llegó a provocar, en ningún caso, la pérdida de la capacidad organogénica de los tejidos, pero como se muestra en la Figura 4 en parte de los ápices no se observó crecimiento del meristemo apical (representado como M; ápices muertos). Este hecho, pudo ser causado por la hiperhidricidad, pero también pudo tener su origen en otros factores como al daño de los ápices durante la extracción, o a una inadecuada deshidratación al tratar los ápices con la solución PVS3.

La Tabla 2 también expresa el porcentaje de plantas que completaron su desarrollo hasta la bulbificación, el que fue relativamente alto (si se tiene en cuenta el estrés que el tratamiento de

crioconservación impone a estas plantas) y comparable entre ambas muestras.

Efecto de la hiperhidricidad sobre el desarrollo de las vitroplantas

La Figura 5 representa la influencia de los síntomas de la hiperhidricidad observados en la fase inicial de la recuperación sobre el desarrollo alcanzaron que las vitroplantas a las 15 semanas del tratamiento. En ella se aprecia que la intensidad en que se manifestó la hiperhidricidad influyó en el desarrollo posterior de las plantas, lo que indica la importancia de considerar la ocurrencia de este desorden fisiológico en los trabajos de cultivo *in vitro* de ajo, especie considerada muy susceptible, como ya se ha señalado.

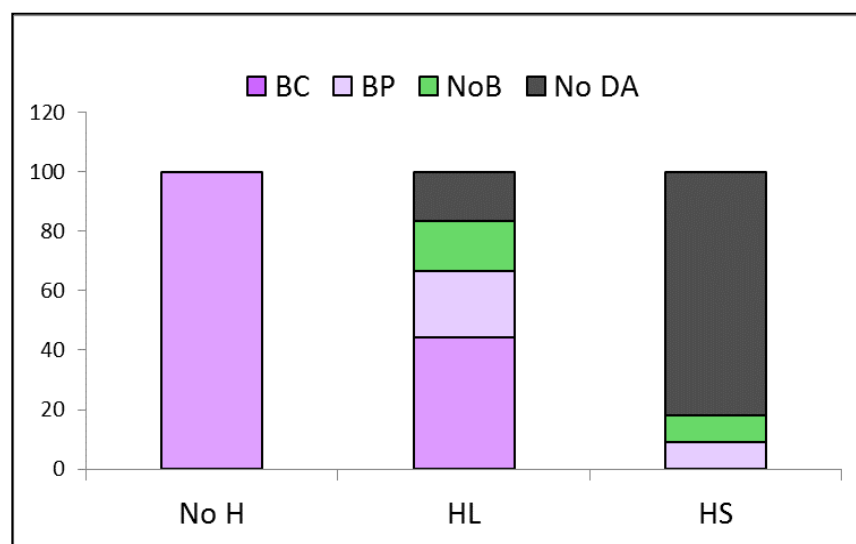


Figura 5. Influencia de los síntomas de la hiperhidricidad observados en la fase inicial de la recuperación de los ápices crioconservados de ajo sobre el desarrollo que alcanzaron las vitroplantas a las 15 semanas del tratamiento (No H: no se manifestó hiperhidricidad; HL: hiperhidricidad ligera; HS: hiperhidricidad severa, No DA: plantas que no desarrollaron el ápice de crecimiento; NoB: plantas que no bulbificaron; BP: plantas que desarrollaron bulbos pequeños; PB: plantas que desarrollaron la bulbificación completa).

Asimismo, se pudo constatar que todos los ápices que regeneraron sin mostrar síntomas de hiperhidricidad (No H) continuaron su desarrollo como vitroplantas hasta la bulbificación. En el

caso en que la hiperhidricidad mostró síntomas ligeros (HL), se observó que cerca del 40 % de los ápices tuvieron apariencia y crecimiento normal y produjeron plantas que evolucionaron

de forma similar a las que no manifestaron síntomas, por lo que podría considerarse que cuando se presentaron síntomas ligeros parte de los ápices revertieron espontáneamente de la hiperhidricidad.

La Figura 6 muestra un ápice con hiperhidricidad ligera, y en ella se aprecia que aunque la hoja externa presenta cierto engrosamiento y curvatura, el ápice de crecimiento muestra vigor y no manifiesta síntomas, es decir que el engrosamiento de la hoja externa no necesariamente produjo daño directo del ápice

de crecimiento, el cual manifestó la textura característica y crecimiento fototrópico. Este comportamiento está en correspondencia con la afirmación de Guimãraes-Vieira *et al.* (2012) quienes señalan que la hiperhidricidad generalmente se considera un fenómeno reversible, no en el sentido de que el tejido hiperhídrico pueda revertir su condición, sino con el significado de que, una vez que se han eliminado las condiciones que originan la hiperhidricidad, los nuevos brotes pueden desarrollar una morfología y anatomía normal.



Figura 6. Vitroplanta que muestra la hoja externa con cierto engrosamiento y curvatura, (síntoma ligero de hiperhidricidad), mientras que el ápice de crecimiento muestra vigor y no manifiesta síntomas.

En el resto de las vitroplantas que al inicio de la recuperación mostraron síntomas ligeros (aproximadamente el 60 %) (Figura 5), el crecimiento se afectó en diferentes grados. El 22,2 % de los ápices bulbificaron, pero su crecimiento mostró cierto retardo respecto a las plantas sin síntomas, lo que redundó en un menor tamaño de los microbulbillos (BP); un 16,7 % regeneró hojas verdaderas, pero la vitroplanta no llegó a bulbificar (No B) y en el 16,7 % restante no se produjo desarrollo del meristemo apical (No DA). Como se señaló anteriormente, en la muerte del ápice de crecimiento pueden incidir otros factores ajenos

a la hiperhidricidad, como la inadecuada deshidratación del meristemo apical con la solución PVS3 en la preparación de las plantas para la crioconservación, debido se presentan diferencias en el desarrollo del primordio foliar que recubre al meristemo, en algunos casos la deshidratación pudiera ser insuficiente para la protección del meristemo, y en otros resultar excesiva, derivando en ambas condiciones hacia la muerte del domo meristemático. También pudo ocurrir la muerte de algunos meristemas por daños durante la extracción.

Cuando la hiperhidricidad se manifestó de forma severa (HS) la mayor parte de los ápices no

regeneraron plantas, y en los casos en que las regeneraron las plantas produjeron bulbos de menor tamaño (BP, bulbos pequeños) o no llegaron a bulbificar. No obstante, en este experimento en ningún caso la hiperhidricidad produjo la pérdida de la capacidad organogénica génica de los explantes, como se presentó en el Experimento 1 (Figura 1) y de todos los crioviales se obtuvieron plantas que no mostraron síntomas de hiperhidricidad o presentaron síntomas ligeros que no afectaron su desarrollo normal (Figuras 2 y 3).

Las modificaciones aplicadas a la recuperación fueron la colocación de papel de filtro sobre el medio de cultivo contenido en las placas de Petri durante la primera semana de la recuperación, la disminución de la proporción de amonio en el medio (proporción de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$; 56,5/3,5), el aumento en la concentración de agar (0,8 %), y la transferencia de las plantas a vasos de mayor tamaño (erlenmeyers de 100 mL) a las tres semanas del tratamiento. Teniendo en cuenta que el origen de la hiperhidricidad se atribuye a la inundación del apoplasto, es necesario continuar en la búsqueda de variantes que permitan disminuir la humedad relativa en el vaso de cultivo. Al respecto, Rojas-Martínez y de Klerk (2010) señalaron que cuando las plantas están contenidas en el vaso de cultivo se restringe significativamente el intercambio gaseoso (agua, CO_2) lo cual tiene una incidencia directa en la transpiración, ya que la humedad relativa dentro del vaso es muy alta. Los autores refieren como una práctica que ha sido exitosa para algunos cultivos (melocotón, clavel y *Phalaenopsis*) la reducción de la humedad relativa dentro del recipiente al producir la condensación del agua en el medio de cultivo enfriado (disminuyendo la temperatura de la superficie de la estantería respecto a la temperatura del aire), pero esta práctica es de

alto costo y no es accesible a todos los laboratorios.

Otro aspecto sería aumentar la permeabilidad de las tapas de los recipientes mediante el uso de cintas permeables, lo que también podría provocar la pérdida de agua del medio con una disminución del crecimiento radicular y la obtención de los nutrientes. Para evitar este desorden también se ha recomendado disminuir los efectos adversos del estrés, ya que señalan que la aparición de tejidos hiperhídricos muchas veces se presentan en plantas estresadas por sequía, hipoxia o iluminación, lo cual resulta difícil para el caso de la crioconservación en que los explantes se someten a un proceso de deshidratación, enfriamiento a temperaturas ultrabajas y después el retorno a la temperatura ambiente y la recuperación en medio de cultivo.

En su estudio sobre el efecto de la adición al medio de cultivo de PEG-6000 combinado con diferentes concentraciones de sacarosa y agar sobre la manifestación de la hiperhidricidad en *Dendrobium officinale*, Gao *et al.* (2020) proponen que el mecanismo mediante el cual la hiperhidricidad ocurre en diferentes especies y condiciones puede variar y señalan que en las plántulas de *D. officinale* el PEG-6000 produce incrementos en la actividad de la enzima peroxidasa (POD), la permeabilidad de la membrana, la disminución de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y el contenido de prolina; además, induce anomalías en el metabolismo del agua, interrumpe las respuestas normales a las condiciones de permeabilidad externas y disminuye el contenido de clorofila, considerando que estos resultados pueden contribuir a esclarecer los mecanismos involucrados en la aparición de la hiperhidricidad, los cuales no han sido del todo esclarecidos.

No obstante, si bien la hiperhidricidad se puede asociar a numerosos factores del cultivo *in vitro*,

existe un consenso respecto a que su causa principal es la inundación del apoplasto y que las prácticas para su disminución, al menos en parte, deben estar enfocadas en facilitar el intercambio gaseoso y la transpiración, por lo que la continuidad de las investigaciones para la recuperación de plantas de la criopreservación de ajo, en el Banco de Germoplasma del INIFAT, deben estar orientadas a este fin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amer, A. y Omar, H. (2019). *In vitro* propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant *Pimpinella anisum*. *Egypt. Pharm. J.*, 18: 254–262. DOI: 10.4103/epj.epj_12_19.
- Antonopoulou, C.; Dimassi, K.; Therios, I. y Chatzissavvidis, C. (2018). Does dikegulac affect *in vitro* shoot proliferation and hyperhydricity incidence in olive explants?. *Hort. Sci. (Prague)*, 45: 125–130. DOI:10.17221/212/2016-HORTSCI.
- Ayub, R.A.; Neves dos Santos, J.; Zanolrensi Junior, L.A.; Mendes da Silva, D.; de Carvalho, T.C. y Grimaldi, F. (2019). Sucrose concentration and volume of liquid medium on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. *Ciência e Agrotecnologia*, 43:e007219. www.editora.ufla.br | www.scielo.br/cagro. DOI:10.1590/1413-7054201943007219.
- Bakir, Y.; Eldem, V.; Zararsiz, G. y Unver, T. (2016). Global transcriptome analysis reveals differences in gene expression patterns between nonhyperhydric and hyperhydric peach leaves. *The Plant Genome*, 9(2): 1-9. DOI: 10.3835/plantgenome2015.09.0080.
- Bayraktar, M.; Hayta-Smedley, S.; Unal, S.; Varol, N. y Aynur G. (2020). Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik'. *South African Journal of Botany*, 128:264-273. DOI:10.1016/j.sajb.2019.11.022.
- de Klerk, G.J. y Pramanik, D. (2017). Trichloroacetate, an inhibitor of wax biosynthesis, prevents the development of hyperhydricity in *Arabidopsis* seedlings. *Plant. Cell. Tiss. Organ Cult.* DOI: 10.1007/s11240-017-1264-x.
- de Klerk, G.J.M.; van den Dries, N. y Krens, F.A. (2017). Hyperhydricity: underlying mechanisms. En: *Proc. VI Int. Symp. on Production and Establishment of Micropropagated Plants*. M. Beruto y E.A. Ozudogru (eds). *Acta Hort.* 1155: 269-275. ISHS. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.39.
- Dietz, K.J.; Mittler, R. y Noctor, G. (2016). Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiology*, 171:1535–1539, www.plantphysiol.org/cgi/DOI:10.1104/pp.16.00938.
- Dunstan, D.I. y Short K.C. (1977). Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.*, 41: 70-72.
- Gao, H.; Xia, X.; An, L.; Xin, X. y Liang Y. (2016). Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during *in vitro* culture, *Plant Science*. DOI:10.1016/j.plantsci.2016.10.008
- Gao, H.; Li, J.; Ji, H.; An, L. y Xia, X. (2018). Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133(1):65–76. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1361-x>.

- Gao, H.; Xu, D.; Zhang, H.; Cheng, X y Yang, Q. (2020). Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. DOI:10.1007/s11627-020-10075-y
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Bisbis, B.; Franck, T.; Crevecoeur, M; Greppin, H. y Dommes, J.(2000) Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. Special symposium:*in vitro* plant recalcitrance. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36:171–181. <http://www.jstor.org/stable/4293333>. DOI:tz10.1007/11627-000-0033-3
- George, E.F. (1993/1996). *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2. The Technology*. Exegetics Ltd. England. Segunda Edición revisada. 574 p.
- Guimãraes-Vieira, A., Ferreira-Tomas, L.; Rangel-Cámara, T. y Willadino, L. (2012). Hyperhydricity: a metabolic disorder. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42(5): 837-844. ISSN: 0103-8478.
- Ivanova, M. y Van Staden, J. (2009). Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 99:167–174. DOI: 10.1007/s11240-009-9589-8.
- Keller, E.R.J. y Senula, A. (2013). Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). En: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology*, Maurizio Lambardi *et al.* (eds.), vol. 994, DOI 10.1007/978-1-62703-074-8_28.
- Linsmaier, E.M. y Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18: 100-127.
- Liu, M.; Jiang, F.; Kong, X.; Tian, J.; Wu, Z. y Wu, Z. (2017). Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. *Scientia Horticulturae*, 217: 285-296. DOI: 10.1016/j.scientia.2017.02.010.
- Muneer, S.; Wei, H.; Gyeong Park, Y.; Kyoung Jeong, H. y Ryong Jeong ,B. (2018). Proteomic analysis reveals the dynamic role of silicon in alleviation of hyperhydricity in carnation grown *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.*, 19:50; DOI:10.3390/ijms19010050.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nagakubo, T.; Takaichi, M. y Oeda, K. (1997). Micropropagation of *Allium sativum* L. (Garlic). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 39. High-Tech and Micropropagation V (ed. Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.3-19. <http://link.springer.com/charper>.
- Pérez-Pérez, J.L.; Fonseca-Yero, M.; Bahi-Arevich, M.; Silva-Pupo, J.J. y Werbrouck, S. (2020). Multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad criolla en sistemas de inmersión temporal. *Pastos y Forrajes*, 43(3):235-243. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>. (consultado: septiembre de 2021)
- Rojas-Martínez, L. y de Klerk, G-J.M. (2010). Hyperhydricity in plant tissue culture. Drowning from with. *Prophyta Annual*. <http://researchgate.net/publication/254835625>.

Soundararajan, P.; Manivannan, A.; Cho, Y.S. y Jeong, B.R. (2017). Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing physiology and protein expression. *Frontiers in Plant Sciences*. 17p. DOI: 10.3389/fpls.2017.00738.

van den Driers, N.; Gianni, S.; Czerednik, A.; Krens, F.A. y de Klerk, G-J.M. (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *Journal of Experimental Botany*, 64(16): 5221–5230. DOI: 10.1093/jxb/ert315.

Fecha de recepción: 6 octubre 2021

Fecha de aceptación: 21 de noviembre 2021

Agrotecnia de Cuba

ISSN impresa: 0568-3114

ISSN digital: 2414- 4673

<http://www.grupoagricoladecuba.gag.cu>

