

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS CON EL
OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES NODALES *IN VITRO* DE
*BAMBUSA LAKO***

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado y título de
Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en
Biotecnología

YANELY MARISOL CANALES OCHOA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

Dedicatoria

En primer lugar, quiero dedicar el presente trabajo de tesis a Dios por cada una de las oportunidades que ha puesto en mi vida y por siempre sostener mi mano, espero cumplir su propósito en mi vida, siempre glorificarlo, confiar en su voluntad y en su infinita misericordia. En segundo lugar, a mis padres:

A mi madre **Gladis Carminda Ochoa**, por su amor y apoyo incondicional, su perseverancia, por siempre animarme a seguir adelante con buenos ánimos a pesar de las circunstancias, por sus enseñanzas, ser mi mejor ejemplo de humildad, perdón, bondad, templanza y fortaleza. Dios la guarde y la tenga gozando de su eterno descanso y le haga saber que este logro es parte de su esfuerzo y dedicado a ella con mucho amor.

A mi padre **Mauricio Canales**, por ser un padre incondicional y darme su apoyo para cumplir mis metas, por creer y confiar en mí en el corto tiempo que tuve el privilegio de tenerlo a mi lado, estoy segura de que estaría muy feliz y orgulloso por mis logros profesionales y personales.

Las palabras no alcanzan para honrarlos con mi agradecimiento por todo lo que hicieron por mí, ya que esto no hubiese sido posible sin su presencia en mi vida.

Eternamente agradecida

Su hija: Yanelly Marisol Canales Ochoa

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo dondequiera que vayas” Josué 1:9

Agradecimientos

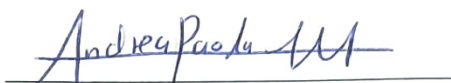
A mi mamá por sus consejos, por su apoyo emocional y por ser el motor que me impulsa a luchar por mis sueños. A mi hermana Linney y a mis hermanos Allan y Kevin, gracias por su comprensión y solidaridad. A mi gran amigo Gustavo Poveda Wong por su incondicional amistad, por su cariño, alegrar mis días, hacerme parte de su vida y por todo su apoyo durante estos años. A mi prima Tania Godoy Reyes por su apoyo incondicional desde el inicio hasta el final de esta etapa, le agradezco su amistad, su cariño, sus ánimos y ser un gran ejemplo a seguir. A las personas que estuvieron cerca y a la distancia durante este proceso, gracias por sus ánimos, su confianza y por los buenos momentos vividos.

A mi directora de tesis Andrea Holst por compartirme sus conocimientos sobre el cultivo *in vitro* de bambú, por su paciencia y por su apoyo en cada una de las etapas de la maestría, a don Víctor Jiménez y a Paúl Solórzano por sus sugerencias y brindarme su ayuda cuando más lo necesité. A Paula Carvajal, por toda su ayuda desde el primer día en el laboratorio, por su guía en el planteamiento del anteproyecto y por cada una de sus valiosas sugerencias durante el proceso de tesis. A Miguel Benavides por sus enseñanzas en histología vegetal, por siempre animarme a mejorar y a confiar en mí. A Laura Vega y a la doctora Andrea Irías por sus sugerencias en los experimentos de las pruebas bioquímicas. Al profesor Luis Barboza Barquero por su hospitalidad y por atender mis dudas académicas. A Mariana Torres por sus sugerencias en la estadística de los datos y su amistad. En general agradezco a todo el personal del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) por su gran espíritu de colaboración, por su solidaridad y amabilidad, cualidades que caracterizan al pueblo costarricense.

Mi eterno agradecimiento a don Eric Guevara Berger por abrirme las puertas del CIGRAS aún sin tener ninguna experiencia en Biotecnología.

Gracias al Servicio Alemán de Intercambio Académico por el financiamiento brindado y por la experiencia de estudiar en la Universidad de Costa Rica. Agradezco a todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron a que esto fuera posible.

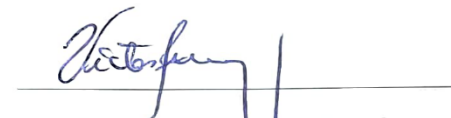
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”



Dra. Andrea Irías Mata
Representante de la Decana Sistema de Estudios de Posgrado



M.Sc. Andrea Holst Sanjuán
Directora de tesis



Dr. Víctor Jiménez García
Asesor



Aleida María Isabel Cascante Vargas

Apoderada Generalísima del **Asesor** M.Sc Paúl Solórzano Cascante



Dra. Catalina Salas Durán

Directora del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Yanely Marisol Canales Ochoa
Candidata

REPUBLICA DE COSTA RICA
REGISTRO NACIONAL
CERTIFICACION DE PODER
NUMERO DE CERTIFICACION: RNPDIGITAL-853250-2023
CITAS DE INSCRIPCION: 2022-5671-1-1



DATOS GENERALES DEL PODER

FECHA DE INSCRIPCION: 06/01/2022

TIPO: PODER GENERALISIMO **ESTADO ACTUAL:** INSCRITO

PLAZO: FECHA DE INICIO: 28/12/2021 **VENCIMIENTO:** *-NO HAY*-

FACULTADES O RESTRICCIONES: QUE CONFIERE PODER GENERALISIMO SIN LIMITE DE SUMA CONFIRIENDOLE AL EFECTO LAS FACULTADES QUE DETERMINA EL ARTICULO MIL DOSCIENTOS CINCUENTA Y TRES DEL CODIGO CIVIL, Y ADEMAS LAS DE SUSTITUIR ESTE PODER EN TODO O EN PARTE, REVOCAR SUSTITUCIONES Y HACER OTRAS DE NUEVO.- PODRA COMPRAR Y VENDER BIENES INMUEBLES DEL PODERDANTE, RETIRAR DINERO O CHEQUES O RECIBIR TRANSFERENCIAS DE DINERO EN SU NOMBRE, PODRA ABRIR Y MANEJAR CUENTAS BANCARIAS EN NOMBRE DE LA PODERDANTE. PODRA SUSCRIBIR HIPOTECAS, SOLICITAR CREDITOS Y REALIZAR TODO TRAMITE TENDIENTE A FORMALIZAR ESTAS NEGOCIACIONES COMO SI FUERA LA PODERDANTE. ASIMISMO, LO PODRA REPRESENTAR EN EL PROCESO SUCESORIO DE QUIEN EN VIDA FUERA DON NILS SOLORZANO VILLARREAL, CON INDEPENDENCIA DE SU PARENTESCO Y CALIDAD DE HEREDERA, PODRA ACEPTAR LA HERENCIA, REALIZAR Y RECIBIR CESIONES DE DERECHOS COMO SI FUERA EL SUSCRITO Y TRANSIGIR Y CONCILIAR EN TODO COMO SI FUERA EL SUSCRITO SIN NINGUNA LIMITACION.

PARTES DEL PODER

CITAS DE INSCRIPCION DE LA PARTE: 2022-5671-1-1 **FECHA:** 06/01/2022

TIPO DE PARTE: PODERDANTE **ESTADO DE LA PARTE:** INSCRITO

OCUPADO POR: PAUL SOLORZANO CASCANTE **CEDULA DE IDENTIDAD:** 1-1304-0296

PLAZO: FECHA DE INICIO: 28/12/2021

FACULTADES O RESTRICCIONES: VER FACULTADES EN DATOS GENERALES DEL PODER.

CITAS DE INSCRIPCION DE LA PARTE: 2022-5671-1-1 **FECHA:** 06/01/2022

TIPO DE PARTE: APODERADO **ESTADO DE LA PARTE:** INSCRITO

OCUPADO POR: ALEIDA MARIA ISABEL CASCANTE VARGAS **CEDULA DE IDENTIDAD:** 1-0529-0888

PLAZO: FECHA DE INICIO: 28/12/2021

FACULTADES O RESTRICCIONES: VER FACULTADES EN DATOS GENERALES DEL PODER.-

NO EXISTEN AFECTACIONES INSCRITAS PARA EL PODER CERTIFICADO
NO EXISTEN MOVIMIENTOS PENDIENTES PARA EL PODER CERTIFICADO
NO EXISTEN OBSERVACIONES PARA EL PODER CERTIFICADO

ESTA CERTIFICACION, CUYOS DERECHOS ARANCELARIOS FUERON DEBIDAMENTE CANCELADOS, CONSTITUYE DOCUMENTO PUBLICO CONFORME LO ESTABLECEN LOS ARTICULOS 45.2 DEL CODIGO PROCESAL CIVIL, 5 INCISO D) DE LA LEY DE CERTIFICADOS, FIRMAS DIGITALES Y DOCUMENTOS ELECTRONICOS N° 8454, Y EL DECRETO EJECUTIVO N° 35488-J, PUBLICADO EN LA GACETA N° 196, DEL 8 DE OCTUBRE DE 2009. EN DICHO MARCO LEGAL SE ESTABLECE LA OBLIGATORIEDAD DE RECIBIR ESTE DOCUMENTO POR PARTE DE LOS ENTES PUBLICOS Y PRIVADOS, ASI COMO PARA LOS PARTICULARES, EN CASO DE QUE SE LE PRESENTEN PROBLEMAS PARA LA RECEPCION DE ESTE DOCUMENTO Y APLICACION DE SUS EFECTOS LEGALES, SIRVASE COMUNICARLO AL CENTRO DE ASISTENCIA AL USUARIO, TELEFONO. 2202-0888.

ESTIMADO USUARIO, EL REGISTRO NACIONAL LE INDICA QUE EL VALOR DE LA PRESENTE CERTIFICACION FUE ESTABLECIDO POR LA JUNTA ADMINISTRATIVA DEL REGISTRO NACIONAL; NINGUNA PERSONA FISICA O JURIDICA PUEDE VARIAR ESE VALOR.

EMITIDA A TRAVES DEL PORTAL DE SERVICIOS DIGITALES Y CON DATOS CONSULTADOS A UNA REPLICA OFICIAL DE LA BASE DE DATOS DEL REGISTRO NACIONAL, A LAS 09 HORAS 59 MINUTOS Y 23 SEGUNDOS, DEL 01 DE JUNIO DE 2023..
PODRA SER VERIFICADA EN EL SITIO www.rnpdigital.com DENTRO DE LOS SIGUIENTES 15 DIAS NATURALES.
SI LA CERTIFICACION CONTIENE ALGUNA INCONSISTENCIA EN LA INFORMACION, FAVOR DE CONTACTAR A rnpdigital@rnp.go.cr, PARA DETERMINAR EL ORIGEN DE LA INCONSISTENCIA Y COMPETENCIA DE LA RESOLUCION.

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Certificado del poder generalísimo.....	v
Tabla de contenido.....	vi
Resumen.....	ix
Summary.....	x
Lista de Cuadros.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1.1. Aspectos generales del bambú.....	5
3.1.2. Tribu Bambusaea.....	6
3.1.3. <i>Bambusa lako</i>	6
3.1.4. Floración y propagación del bambú.....	7
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de bambú.....	7
3.3. Oscurecimiento durante el cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	8
3.3.1. Compuestos fenólicos en el oscurecimiento <i>in vitro</i> de plantas.....	9
3.3.2. Las PPO en el oscurecimiento <i>in vitro</i> de plantas.....	10
3.3.3. ROS en el oscurecimiento <i>in vitro</i>	11
3.3.4. Efecto del SNP en el oscurecimiento <i>in vitro</i> de plantas.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Localización del proyecto.....	16
4.2. Material vegetal.....	16
4.3. Desinfección de tejidos.....	16
4.4. Establecimiento <i>in vitro</i> y brotación inicial.....	17

4.5. Caracterización del color en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	18
4.5.1. Establecimiento de la escala visual de oscurecimiento.....	18
4.5.2. Caracterización del color en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	18
4.5.3. Observación del tejido interno de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	18
4.6. Pruebas bioquímicas.....	19
4.6.1. Cuantificación de polifenoles totales (PT) en tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	19
4.6.2. Actividad de la enzima PPO en tejidos <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	20
4.6.3. Contenido de MDA en tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	22
4.7. Histología.....	23
4.7.1. Fijación del tejido vegetal.....	24
4.7.2. Procesamiento del tejido vegetal.....	24
4.7.3. Inclusión de tejidos vegetales en parafina.....	25
4.7.4. Corte de tejidos vegetales y colocación en portaobjetos.....	25
4.7.5. Tinción de tejidos vegetales.....	25
4.8. Efecto del SNP en tejidos <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1.1. Descripción del oscurecimiento en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	30
5.2. Optimización de pruebas bioquímicas en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	33
5.2.1. Efecto de la reducción de la masa inicial sobre el contenido de PT en el tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	33
5.2.2. Efecto del almacenamiento a -80°C y del método de macerado del tejido sobre la actividad enzimática de la PPO en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	34
5.3. Determinación del contenido de PT, actividad enzimática de PPO y MDA en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> según la escala de oscurecimiento.....	36
5.4. Cambios anatómicos en el tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en respuesta al oscurecimiento.....	38
5.5. Localización de polifenoles y H ₂ O ₂ en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	43
5.6. Efecto del SNP en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	46
6. DISCUSIÓN.....	48
6.1. Descripción del oscurecimiento en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	48
6.2. Optimización de pruebas bioquímicas en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	49
6.3. Determinación del contenido de PT, actividad enzimática de la PPO y MDA en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> según la escala de oscurecimiento.....	51

6.4. Cambios anatómicos en el tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en respuesta al oscurecimiento.....	53
6.5. Localización de polifenoles y H ₂ O ₂ en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	53
6.6. Efecto del SNP en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	55
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.....	56
8. RECOMENDACIONES.....	57
9. BIBLIOGRAFÍA.....	58

Resumen

El término “oscurecimiento” engloba de manera general la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa para producir quinonas, especies químicas muy reactivas, todo lo cual genera daño e incluso la muerte celular. El oscurecimiento en el cultivo de tejidos es un problema común, principalmente en especies leñosas. El bambú no está exento de esta limitación durante su cultivo *in vitro*. Una especie de importancia comercial y ambiental es *Bambusa lako*. Sin embargo, su propagación *in vitro* se ve limitada por la muerte de brotes en la fase de establecimiento debido al oscurecimiento. En este estudio se evaluó si el oscurecimiento de explantes nodales *in vitro* de *B. lako* estaba asociado con la acumulación de polifenoles, la actividad de la polifenol oxidasa y el estrés oxidativo evidenciado mediante el malondialdehído. Para la evaluación de estos parámetros bioquímicos primero se desarrolló una escala visual de oscurecimiento de cuatro grados. Se obtuvo un aumento en la concentración de fenoles totales y malondialdehído a medida que avanza el oscurecimiento. Por otro lado, también se encontró un aumento en la actividad de la polifenol oxidasa entre el grado verde y el completamente oscurecido. En adición a lo anterior, el análisis histológico evidenció una actividad metabólica activa en los brotes verdes dado que se encontró una mayor acumulación de almidón y proteína. Por otro lado, al buscar localizar los polifenoles y especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂, se encontraron en los haces vasculares. Como propuesta innovadora y dado al efecto que tiene el nitroprusiato de sodio sobre el oscurecimiento *in vitro*, se evaluó el efecto de tres concentraciones de este compuesto (0,5 mM; 1,5 mM y 3,0 mM) sobre el crecimiento y el oscurecimiento de los brotes. No se encontró ningún efecto sobre la brotación, longitud de brote y número de brotes; además, tampoco fue efectivo para reducir el oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako* durante siete semanas de cultivo.

Summary

The term "browning" generally encompasses free radical oxidation of different cellular components, as well as the oxidation of phenolic compounds catalyzed by the enzyme polyphenol oxidase to produce quinones, highly reactive chemical species, all of which lead to cell damage and even cell death. Browning in tissue culture is a common problem, mainly in woody species. Bamboo is not exempt from this limitation during *in vitro* culture. One species of commercial and environmental importance is *Bambusa lako*. However, its *in vitro* propagation is limited by shoot death at the establishment stage due to browning. In this study, we evaluated whether browning of *in vitro* nodal explants of *Bambusa lako* was associated with polyphenol accumulation, polyphenol oxidase activity, and oxidative stress as evidenced by malondialdehyde. For the evaluation of these biochemical parameters, a four-grade visual darkening scale was first developed. An increase in the concentration of total phenols and malondialdehyde was obtained as the darkening progresses. On the other hand, an increase in polyphenol oxidase activity was also found between green and fully darkened grades. In addition to the above, histological analysis evidenced an active metabolic activity in the green shoots since a greater accumulation of starch and protein was found. On the other hand, when searching for polyphenols and reactive oxygen species such as H₂O₂, they were found in the vascular bundles. As an innovative proposal and given the effect of sodium nitroprusside on browning *in vitro*, the effect of three concentrations of this compound (0.5 mM; 1.5 mM and 3.0 mM) on shoot growth and browning was evaluated. No effect was found on sprouting, shoot length and number of shoots; furthermore, it was also ineffective in reducing shoot browning *in vitro* of *Bambusa lako* during seven weeks of culture.

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Reportes del efecto del nitroprusiato de sodio en el cultivo <i>in vitro</i> de plantas y brotes de bambú.....	13
Cuadro 2. Curva patrón del ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales en las muestras de tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	20
Cuadro 3. Concentración total de fenoles, con respecto al material vegetal inicial utilizado en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	34
Cuadro 4. Concentración de MDA con respecto al material vegetal inicial utilizado, en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	36

Lista de Figuras

Figura 1. Ejemplos de compuestos fenólicos que se encuentran en plantas. a. No flavonoides; b. Flavonoides, los compuestos presentados son los más abundantes dentro de cada subgrupo y grupo. *Derivados del ácido benzoico y **derivados del ácido hidroxicinámico. Tomado de Crozier et al. (2009).....	10
Figura 2. Plantas de <i>B. lako</i> establecidas previamente en el invernadero del CIGRAS.....	16
Figura 3. Zona distal, medial y basal de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> para el análisis histológico, la localización de polifenoles y la enzima peroxidasa. Barra equivalente a 1 cm.....	24
Figura 4. Comportamiento del oscurecimiento de los brotes de <i>B. lako</i> durante siete semanas de cultivo desde su establecimiento en condiciones <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS. Después de dos semanas de introducción <i>in vitro</i> se colocaron en condiciones de luz indirecta y a la cuarta semana se colocaron en condiciones de luz directa. Se evaluaron 36 brotes.....	30
Figura 5. Escala de oscurecimiento de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> y sus principales colores representados en códigos decimales RGB. a. Grado 1; b. Grado 2; c. Grado 3; d. Grado 4. Barra equivalente a 1 cm. Los valores entre paréntesis representan el código RGB (R, G, B).....	31
Figura 6. Detalle de la apariencia interna de la base de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en los cuatro grados de oscurecimiento. a. grado 1, b. grado 2, c. grado 3 y d. grado 4. La imagen mostrada a la izquierda muestra la zona del brote que fue diseccionado. A la derecha se presenta el brote diseccionado. Barra de los brotes sin diseccionar equivalente a 0,5 cm y diseccionados equivalentes a 1,5 cm (ampliados a 3x) y 0,75 cm (ampliados a 1,5x).....	32
Figura 7. Porcentaje de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en los diferentes grados de oscurecimiento durante siete semanas de cultivo <i>in vitro</i>	33
Figura 8. Efecto del método de maceración, y del almacenamiento a una temperatura de -80°C sobre la actividad de la PPO en los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas, según una prueba de separación de medias de Tukey. Barras indican el error estándar (n=3). NL: Con mortero y nitrógeno líquido; MC: Con molino de café y sin nitrógeno líquido. Las barras indican el error estándar.....	35
Figura 9. a. Concentración de fenoles totales (PT) en términos de equivalentes de ácido gálico, b. actividad enzimática de la PPO y c. concentración de MDA, según los diferentes grados de oscurecimiento de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . Letras diferentes indican diferencias	

estadísticamente significativas, según una prueba de Tukey (PT) o Kruskall-Wallis (PPO y MDA) (n=3). Las barras indican error estándar.....	37
Figura 10. Diagrama de dispersión de la correlación de Pearson entre la actividad de la PPO U/min.g) y la concentración de fenoles totales (mg/g) de los grados de oscurecimientos de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i>	38
Figura 11. Histología de PAS en secciones transversales de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en grado 1. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. c. f. i. Zona basal de los brotes. a. b. d. e. f. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 µm; c. escala de barra equivalente a 50 µm. ep: epidermis; prt: proteína; ps: polisacáridos, en este caso gránulos de almidón; pq: parénquima; ev: elementos de los vasos; hv: haces vasculares; nu: núcleo; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.....	39
Figura 12. Histología de PAS en secciones transversales de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en grado 2. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. c. f. i. Zona basal de los brotes. a. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 µm; b. d. e. f. escala de barra equivalente a 50 µm. ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; hv: haces vasculares; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.....	40
Figura 13. Histología de PAS en secciones transversales de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en grado 3. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. a. b. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 µm; d. f. escala de barra equivalente a 50 µm. e. escala de barra equivalente a 100 µm. ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; hv: haces vasculares; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.....	41
Figura 14. Histología de PAS en secciones transversales de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> en grado 4. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. a. b. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 µm; d. escala de barra equivalente a 100 µm. e. f. escala de barra equivalente a 50 µm. e. escala de barra equivalente a 100 µm. ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; ev: elementos de los vasos; hv: haces vasculares; x: metaxilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.....	42
Figura 15. Localización de polifenoles, con la prueba de Hoepfner-Vorsatz en los, a. haces vasculares de la zona distal del brote en grado 2 y b. área basal del brote en grado 3, del tejido de <i>B. lako</i> . c. Compuestos polifenólicos presentes en el control positivo (frijol - Brunca); x: xilema;	

fl: floema; cp; compuesto fenólicos; tst: testa; ctl: cotiledón. Coloración café indica presencia de polifenoles. Barras equivalentes a 20 μm	43
Figura 16. Localización de polifenoles, con la tinción de azul de toluidina, en los haces vasculares del tejido <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . a. Grado 1, zona basal del brote; b. Grado 2, zona basal del brote; c. Grado 3, zona basal del brote y d. Grado 4, zona distal del brote. x: xilema; cp; compuestos fenólicos; fl: floema; fb; fibras; pxl: protoxilema. Azul claro muestra la presencia de polifenoles. Cortes transversales de 12-15 μm , barras equivalentes a 20 μm	44
Figura 17. Localización de peróxido de hidrógeno con DAB en los haces y tejidos vasculares de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . a. Zona basal de brote en grado 1; b. y c. Zona basal de brote en grado 2; d. Zona basal de brote en grado 3; e. y f. Zona basal y zona distal de brote en grado 4, respectivamente. Barras equivalentes a 20 μm . Color cobrizo indica localización de la enzima peroxidasa en el tejido. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; m: xilema; fl: floema; tjv: tejido vascular.....	45
Figura 18. Raíz de rábano, utilizado como control positivo en la prueba de DAB en brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . Barra equivalente a 50 μm . Localización de peróxido de hidrógeno indicada en color café: H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.....	45
Figura 19. a. Efecto de los diferentes tratamientos de SNP sobre a. la brotación <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> , según una prueba de Chi cuadrado de Pearson; b. el promedio de brotes por yema, según una prueba de Chi cuadrado de Pearson y c. la longitud del brote más largo luego de dos semanas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> desde su establecimiento, según una prueba de Tukey. n=36 (0 mM), n= 43 (0,5 mM), n= 34 (1,5mM) y n= 31 (3,0 mM).....	46
Figura 20. Efecto del SNP sobre el oscurecimiento de los brotes <i>in vitro</i> de <i>B. lako</i> . a. Porcentaje de explantes de <i>B. lako</i> en 0 mM de SNP, b. 0,5 mM de SNP, c. 1,5 mM de SNP y d. 3,0 mM, de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado. Cada color corresponde al grado de oscurecimiento según la escala visual. Se utilizó el siguiente número de réplicas biológicas. 0 mM = 36; 0,5 mM = 43; 1,5 mM = 34; 3 mM = 31.....	47



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Yanely Marisol Canales Ochoa, con cédula de identidad 134000578401, en mi condición de autor del TFG titulado Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados con el oscurecimiento de explantes nodales in vitro de Bambusa lako.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. INTRODUCCIÓN

El bambú pertenece a la subfamilia Bambusoideae, una de las 12 subfamilias de las gramíneas (Poaceae) (Judziewicz *et al.* 1999). Aproximadamente existen de 60 a 75 géneros, con cerca de 1500 especies de bambú distribuidas en el planeta y clasificadas en tres tribus: Arundinarieae, Bambuseae y Olyreae (Liese 2001; BPG 2012). El 64% se encuentra en el sudoeste de Asia, el 33% en América Latina y el resto en África y Oceanía. No existen reportes sobre la presencia de especies nativas de bambú en Europa y la Antártida (Dransfield 1981).

El bambú es usado en la construcción por sus propiedades mecánicas y físicas, en el sector aeroespacial, la alimentación, la industria textil, la pulpa y el papel, el arte y el diseño, en la producción de biocombustibles y en la elaboración de gas metano y etanol en cantidades comerciales (Akinlabi *et al.* 2017). El género *Bambusa* representa uno de los grandes recursos naturales renovables, así como también presenta diversos beneficios medioambientales, tales como que son grandes captadores de carbono, presentan tolerancia a temperaturas adversas y sus rizomas contribuyen a disminuir la erosión del suelo superficial, entre otros (García-Ramírez *et al.* 2011). *Bambusa lako* es una especie dentro de este género, nativo de Indonesia, conocido como bambú negro del Timor, apreciado en la industria maderera, ornamental y por su importancia para el ambiente (Widjaja, 1997; Lantican 2009; Roxas 2012). Existe interés por la propagación del bambú a escala comercial, pero ésta se ha visto limitada por la baja tasa de germinación, por la pérdida de viabilidad de las semillas y por la poca disponibilidad de material para su reproducción por división de rizomas o esquejes (Liese 1987; Banik 1995; van Dam *et al.* 2018).

El cultivo *in vitro* representa una alternativa para la propagación masiva del bambú. A pesar de que existen protocolos eficientes para la propagación *in vitro* de algunas especies de bambú (Gielis y Oprins 2002; Sandhu *et al.* 2018), en el caso de *B. lako* no se han reportado protocolos exitosos. La principal causa es atribuida a la muerte de los brotes por oscurecimiento durante la fase de establecimiento *in vitro* (Zamora-Chacón 2015). El oscurecimiento es un problema común en el cultivo de tejidos *in vitro* de plantas,

especialmente en plantas leñosas. Incluso este fenómeno se ha mencionado también en algunas otras especies de bambú durante su propagación *in vitro*, tales como *Dendrocalamus latiflorus* Munro, *Phyllostachys nigra*, *Gigantochloa atrovioleacea* y *Bambusa balcooa* Roxb (Huang *et al.* 2002, Das y Pal 2005; Bisht *et al.* 2010).

El oscurecimiento en el cultivo de tejidos vegetales generalmente está relacionado con la acumulación de polifenoles y su polimerización enzimática mediada por la polifenol oxidasa (PPO) (Amiot *et al.* 1996). De igual manera se relaciona con el estrés oxidativo provocado por las condiciones *in vitro*, las cuales, además, promueven anomalías anatómicas y fisiológicas en las plantas *in vitro* (Rajput *et al.* 2020). El malondialdehído (MDA) es un subproducto de la peroxidación lipídica inducida por radicales de oxígeno y enzimas, y es utilizado como biomarcador del estrés oxidativo en plantas (Davey *et al.* 2005). Aunque se han reportado diversas estrategias para sobrellevar este fenómeno, por ejemplo, agregar compuestos antioxidantes al medio o realizar un subcultivo frecuente del tejido, se sugiere explorar otras alternativas debido al costo y tiempo que estas implican (Dutta-Mudoi *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2020).

Se ha mencionado que el nitroprusiato de sodio (SNP, por sus siglas en inglés) inhibe la actividad de las enzimas PPO, fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y peroxidasa (POD), que están asociadas a niveles altos de compuestos fenólicos y a la producción de etileno, lo cual resulta en la reducción del oscurecimiento y lignificación externa en brotes de bambú (Xu *et al.* 2009; Xu *et al.* 2010; Yang *et al.* 2010; Hesami *et al.* 2018; Pandey *et al.* 2020). En adición, al ser el SNP un donador de óxido nítrico (NO), tiene un efecto como regulador de crecimiento y contribuye al crecimiento y desarrollo de los tejidos *in vitro* (Pandey *et al.* 2020; Pradhan *et al.* 2020). Aunque sus efectos dependen de las concentraciones y genotipo (Sarropoulou *et al.* 2014).

Por tanto, con la presente investigación se caracterizó el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* para determinar si se asociaba a la acumulación de polifenoles, la actividad de la PPO y/o al estrés oxidativo evidenciado por MDA. Por otro lado, se evaluaron los cambios histológicos causados por el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* y, por último,

como estrategia innovadora, se estudió el efecto de varias concentraciones de NSP sobre la brotación inicial durante el establecimiento *in vitro* de *B. lako*, tanto en parámetros de crecimiento como en el oscurecimiento del tejido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar los cambios fisiológicos y bioquímicos relacionados con el oscurecimiento en tejidos *in vitro* de *Bambusa lako*.

2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar si el oscurecimiento de los tejidos *in vitro* de *Bambusa lako* está relacionado con el contenido de fenoles, la actividad de la enzima polifenol oxidasa y el estrés oxidativo evidenciado mediante el contenido de malondialdehído.
2. Describir, mediante histología, los cambios anatómicos asociados al oscurecimiento de los brotes de *Bambusa lako* durante la fase de establecimiento *in vitro*.
3. Evaluar el efecto de la adición de nitroprusiato de sodio al medio de cultivo sobre el oscurecimiento de los brotes de *Bambusa lako* durante su establecimiento *in vitro*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1.1. Aspectos generales del bambú

El bambú es una planta perenne herbácea o leñosa, que forma parte del grupo de las angiospermas, al orden de las monocotiledóneas y pertenece a la subfamilia Bambusoideae, una de las 12 subfamilias de las gramíneas (Poaceae) (Judziewicz *et al.* 1999). Se clasifica en tres tribus: Arundinarieae, Bambusaea y Olyreae (BPG 2012). Se estima que existen 60-75 géneros y 1250-1500 especies de bambú distribuidas, de manera general, 64% en el sudoeste de Asia, 33 % en América Latina y el resto en África y Oceanía. Sin embargo, no existen reportes de especies nativas de bambú en Antártida y Europa, pero sí se ha mencionado la propagación de especies de bambú introducidas en el último continente (Dransfield 1981; Liese 2001).

El bambú es considerada una planta versátil, ya que crece de manera óptima a temperaturas entre 20 °C y 30 °C y en altitudes entre 100 y 800 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.); aunque se puede encontrar en altitudes mayores a 3000 m.s.n.m. Además, crece en todo tipo de suelo, menos en suelos salinos (Mohah *et al.* 2022). Se caracteriza por tener un sistema de rizoma bien desarrollado, que permite su clasificación en dos grupos principales y uno intermedio: paquimorfo o simpodial, leptomorfo o monopodial e intermedio o antipodia. Poseen un tallo aéreo que brota del rizoma, conocido como culmo, compuesto por haces vasculares colaterales y aproximadamente 52% de tejido parenquimático, 40% de fibra y 8% de células conductoras, siendo estas características similares entre diferentes especies. Por encima de la línea nodal y en posición dística del culmo se encuentran las yemas, estas presentan un carácter vegetativo o reproductivo (Grosser y Liese 1971; Banik 1995; Liese 1998; Londoño 2002).

Por sus propiedades mecánicas y físicas, el bambú es considerada una planta multiusos, debido a la composición de su material, que puede ser usado en la construcción, en el sector aeroespacial, en la alimentación de animales y humanos, en la industria textil y de confección, en la pulpa y el papel, el arte y el diseño, en la producción de biocombustibles y en la elaboración de gas metano y etanol en cantidades comerciales (Akinlabi *et al.* 2017). En países como Colombia y Costa Rica, el bambú, al revestirlo con concreto y yeso, ha demostrado ser una forma barata y efectiva de construir viviendas a prueba de terremotos.

En Filipinas y Hawái, se desarrollan tecnologías para el uso del bambú en la construcción de edificios a prueba de ciclones (Turnbull 2008).

3.1.2. Tribu Bambusaea

La tribu Bambusaea, se divide en dos clados, bambúes leñosos neotropicales y bambúes leñosos paleotropicales. A su vez, los bambúes neotropicales se clasifican en tres subtribus, *Arthrostylidium*, *Chusqueinae* y *Guaduinae*, y los bambúes leñosos paleotropicales se clasifican en cuatro subtribus *Bambusinae*, *Hickeliinae*, *Melocanninae* y *Racemobambosinae* (Sungkaew *et al.* 2009). Esta tribu se divide en 360 especies agrupadas en 20 géneros, de los cuales un género y dos especies se encuentran en la zona templada norte de Estados Unidos, el resto se clasifica en cuatro subtribus, tres endémicas nuevas de América (*Arthrostylidiinae*, *Chusqueinae* y *Guaduinae*) y una, *Arundinariinae*, común al Viejo y al Nuevo Mundo distribuidas desde México hasta Chile (Londoño 1990). Los bambúes pertenecientes a esta tribu presentan sistemas complejos de rizoma, culmos lignificados, comúnmente huecos, hojas muy bien diferenciadas, un excelente desarrollo de ramificaciones aéreas. Además, presentan espiguillas bisexuales y tienen ciclos de floración gregarios (Dransfield y Widjaja 1995; BPG 2012).

3.1.3. *Bambusa lako*

Una especie de interés comercial es *B. lako*, ya que sus culmos son usados para la construcción y elaboración de muebles tradicionales (Roxas 2012). Además, por su hábito de crecimiento, es un bambú de bajo riesgo invasivo (Lieurance *et al.* 2018). *B. lako*, es originario de Indonesia, donde su nombre local “lako” significa negro en tetún (idioma oficial de Timor Oriental), en referencia a sus culmos negros o violáceos. Es una especie perenne que forma culmos bastante compactos con cañas erectas, recurvas en el ápice, que pueden alcanzar los 20 m de altura en las zonas tropicales, pero en otras zonas se mantienen más bajas y tienen un diámetro de 4-10 cm (Widjaja 1997).

Widjaja (1997) describe que *B. lako* presenta ramas en el culmo inferior, aurículas prominentes de las vainas del culmo y rayas amarillentas a verdosas en los culmos jóvenes. Dudas en la taxonomía de ciertos grupos llevó a realizar estudios taxonómicos moleculares. Los resultados y análisis de un estudio de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados determinaron que pertenece al género *Gigantochloa* (Loh *et al.* 2000).

3.1.4. Floración y propagación del bambú

Las especies de bambú pertenecientes a la tribu Bambuseae se caracterizan por tener ciclos de floración largos con reproducción monocárpica, es decir que al florecer posteriormente mueren. Esta característica depende de la especie (Soderstrom 1981). Se ha mencionado que la floración del bambú puede ocurrir de forma esporádica, es decir que solo uno o varios miembros de una misma población florecen, o de forma gregaria, cuando la floración de una especie ocurre en un mismo momento y en diferentes lugares. Algunas especies de bambú permanecen en un estado vegetativo por décadas o puede que hasta por un siglo (Zheng *et al.* 2020).

Convencionalmente, el bambú se propaga por semillas, considerado un método fácil y de bajo costo (Banik 1995). Sin embargo, presenta limitaciones como la baja frecuencia de floración y la forma gregaria en que esta ocurre dentro de una población, la baja tasa de germinación de las semillas y, debido a su heterogeneidad genética, no siempre reproducen las características de las plantas madre (Banik 1995; Liese 1987; van Dam *et al.* 2018). En cambio, los métodos de propagación vegetativa mediante propágulos y rizomas permiten la obtención de plantas idénticas a la madre, no obstante, presentan desventajas, tales como que la floración y la muerte ocurran en un periodo corto después de la propagación (Banik 1995). Además, estos métodos requieren mucha mano de obra por su volumen, son de difícil manejo y transporte, presentan crecimiento lento y una baja tasa de multiplicación y de supervivencia (Ray y Ali 2017).

3.2. Cultivo *in vitro* de bambú

El cultivo *in vitro* de tejidos consiste en tomar la porción de una planta, comúnmente llamados explantes (hoja, ápice, inflorescencias etc.) y colocarla en un medio de cultivo nutritivo basal que reúne las condiciones para su desarrollo y crecimiento. Esta técnica permite obtener plantas libres de enfermedades, genéticamente uniformes y de forma masiva, con respecto a los métodos tradicionales de propagación (Rajput *et al.* 2020). Dadas las desventajas para propagar el bambú a través de los métodos convencionales, el cultivo *in vitro* es una alternativa para su propagación a gran escala. Se han desarrollado métodos viables y eficientes para la propagación de plantas de diversas especies de bambú a escala

comercial, y en programas de mejoramiento genético y la conservación de germoplasma (Gielis y Oprins 2002; Sandhu *et al.* 2018).

La proliferación de brotes a través de yemas axilares de bambú es el método más usado para la producción a gran escala (Jiménez y Guevara 2007; George y Debergh 2008), principalmente porque la mayoría de las plantas producidas son genéticamente estables (Schoofs 1992; Gielis y Oprins 2002). Este método involucra la selección y desinfección del explante, la inducción de brotación de yemas en un periodo de oscuridad, crecimiento de brotes en condiciones de luz, división de plantas para la multiplicación *in vitro* y el subcultivo frecuente en recipientes de mayor tamaño, enraizamiento y aclimatación (Jiménez *et al.* 2021).

En el caso del género *Bambusa*, se han reportado protocolos exitosos de propagación *in vitro*, tales como los desarrollados para *Bambusa vulgaris* 'Striata' (Ramanayake *et al.* 2006), *Bambusa nutans* Wall. ex Munro (Negi y Saxena, 2011a), *Bambusa tulda* (Sharma y Sarma, 2013), entre otras especies. En cuanto a *B. lako*, no existen reportes de un protocolo exitoso para su propagación *in vitro* debido a la mortalidad de brotes *in vitro* provocada por la respuesta al oscurecimiento durante la fase de brotación (Zamora-Chacón, 2015).

3.3. Oscurecimiento durante el cultivo *in vitro* de plantas

El oscurecimiento representa uno de los factores más serios y frecuentes desde el inicio y durante el establecimiento *in vitro* de plantas, especialmente en plantas leñosas (Saxena 1990; Azofeifa 2009). Esta respuesta provoca que la capacidad regenerativa disminuya, que se produzca crecimiento deficiente y en casos extremos la muerte de los explantes (Azofeifa 2009). La severidad del oscurecimiento varía según la especie, tejido u órgano, edad de la planta, medio nutritivo y otras variables del cultivo *in vitro* (Huang *et al.* 2002; Wang *et al.* 2016). El cultivo *in vitro* de bambú no está exento de esta respuesta, ya que se ha reportado en diferentes estudios de micropropagación *in vitro* de especies de bambú como *Dendrocalamus latiflorus* Munro, *Phyllostachys nigra*, *Gigantochloa atroviolacea* y *Bambusa balcooa* Roxb la muerte de brotes o plántulas por causa del oscurecimiento, convirtiéndolo en una barrera para establecer protocolos eficientes y rentables en la micropropagación de bambú (Huang *et al.* 2002; Das y Pal 2005; Bisht *et al.* 2010).

Se ha mencionado que el oscurecimiento *in vitro* está relacionado con la acumulación de compuestos fenólicos, con la acumulación de especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés) y niveles altos de la actividad enzimática de la PPO (Xu *et al.* 2015). En la literatura se han sugerido diversas estrategias para sobrellevar esta respuesta en el cultivo *in vitro* de plantas, tales como el uso de compuestos antioxidantes (Das y Pal 2005; Zheng *et al.* 2020), utilizar medio líquido para una mayor dispersión de sustancias tóxicas (Saxena 1990; Saxena y Bhojwani 1993; Ramanayake y Yakandawala 1997; Shirin y Rana 2007; Azofeifa 2009) y subcultivar de manera frecuente los explantes o plántulas; sin embargo, este último método es poco rentable ya que demanda mucho tiempo y mano de obra (Azofeifa 2009; Dutta-Mudoi *et al.* 2013).

3.3.1. Compuestos fenólicos en el oscurecimiento *in vitro* de plantas

Los compuestos fenólicos constituyen los metabolitos secundarios más comunes de las plantas. Están involucrados en procesos fisiológicos, ya que participan en distintas etapas del desarrollo vegetal, actúan en la defensa contra patógenos, depredadores o radiación ultravioleta y generalmente se reporta su ubicación en las vacuolas. Se caracterizan por poseer al menos un anillo de benceno que lleva uno o más grupos hidroxilo. En la naturaleza se pueden encontrar aproximadamente 8000 fenoles, provenientes en su mayoría de la ruta metabólica del ácido siquímico y el metabolismo de los fenilpropanoides (Holderbaum *et al.* 2010; Selvarajan *et al.* 2018). Se clasifican como flavonoides y no flavonoides, que incluyen ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos (Figura 1). Los flavonoides presentan en su estructura dos anillos de benceno unidos entre sí por un puente de tres carbonos, y se subdividen en 12 grupos, dentro de algunos ejemplos comunes están los flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, antocianinas, flavanonas, isoflavonas, y dihidrochalconas (Crozier *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2019).

Sumado a lo anterior, los polifenoles participan en procesos de respuesta a estrés abiótico y biótico y su acumulación en el tejido vegetal se ha asociado con el oscurecimiento en el cultivo *in vitro* de plantas (Dalal *et al.* 1992). También se ha sugerido que la sobreproducción de compuestos fenólicos y su polimerización por enzimas oxidativas está relacionado con la reducción de la tasa de sobrevivencia de plántulas *in vitro* (Huang *et al.* 2002; Hesami *et al.* 2018).

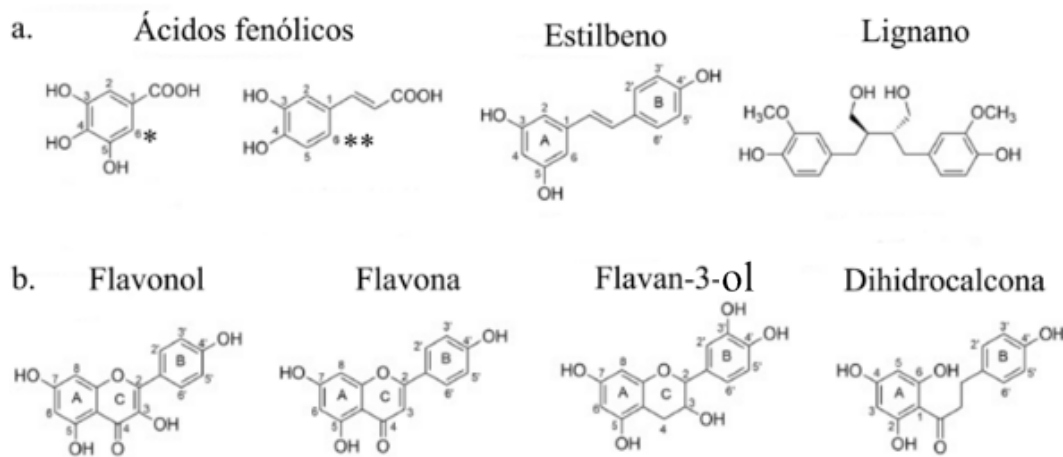


Figura 1. Ejemplos de compuestos fenólicos que se encuentran en plantas. a. No flavonoides; b. Flavonoides, los compuestos presentados son los más abundantes dentro de cada subgrupo y grupo. *Derivados del ácido benzoico y **derivados del ácido hidroxicinámico. Tomado de Crozier *et al.* (2009).

3.3.2. Las PPO en el oscurecimiento *in vitro* de plantas

Las PPO son metaloproteínas que contienen cobre. Polimerizan diversos compuestos fenólicos, lo que conlleva al oscurecimiento en plantas, razón por la que son consideradas enzimas críticas en la tecnología de alimentos. Son clasificadas según su mecanismo de acción y especificidad de sustratos en: catecol oxidasas, tirosinasas y lacasas. Las catecol oxidasas median la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas; las tirosinasas poseen actividades de cresolasa y por último las lacasas oxidan una gran gama de compuestos aromáticos (Yoruk y Marshall 2007).

Las PPO participan en el mecanismo de defensa de las plantas, ya que son inducidas principalmente por heridas, ataques de insectos y señales relacionadas con la defensa provocada por algunas fitohormonas y su localización se reporta en los plastidios (Durán *et al.* 2002; Selvarajan *et al.* 2018; Aziz *et al.* 2019). Estudios han establecido la existencia de un vínculo en la regulación de la actividad de las PPO y la cantidad de polifenoles, ya que el aumento de la actividad enzimática de estas enzimas está asociado al oscurecimiento *in vitro* de plantas, a la desorganización celular y a la eventual muerte celular (Tang y Newton, 2004; Poudyal *et al.* 2008; Huang *et al.* 2002).

3.3.3. ROS en el oscurecimiento *in vitro*

Las ROS son un subproducto del metabolismo aeróbico de las plantas, e incluyen radicales libres y moléculas no radicales producidas en diferentes compartimentos de las plantas como los cloroplastos, peroxisomas, mitocondrias y apoplastos. El anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete (1O_2), el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) representan los principales ROS de las plantas (Mansoor *et al.* 2022). Las plantas bajo condiciones de estrés producen grandes cantidades de ROS involucradas en la regulación de procesos vinculados con el crecimiento, el desarrollo y en la coordinación de respuestas al estrés biótico y abiótico (Mittler *et al.* 2004; Schippers *et al.* 2016).

Se ha indicado que el oscurecimiento también está relacionado con un desequilibrio entre la formación de ROS y el sistema de defensa antioxidante (Turrens 2003). Para evitar el deterioro en la célula por altos niveles de H_2O_2 , los organismos expresan la enzima POD para la detoxificación de H_2O_2 , sin embargo, el aumento en la actividad de esta enzima también puede causar la muerte celular y subsecuentemente el oscurecimiento *in vitro* (Abohatem *et al.* 2011).

De igual manera, un incremento desproporcionado de las concentraciones de las ROS resulta en la peroxidación lipídica o daño oxidativo celular (Foyer y Noctor 2009). La peroxidación lipídica es un indicador del estrés oxidativo en los tejidos y se ha cuantificado mediante la reacción del MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (Hodges *et al.* 1999). Altos niveles de MDA en el cultivo *in vitro* se han asociado con una reducción en las tasas de crecimiento y desarrollo morfogénético; además, el MDA puede reaccionar y provocar alteraciones en el ADN, proteínas, fosfolípidos y unirse a componentes del medio de cultivo (Adams *et al.* 1999).

3.3.4. Efecto del SNP en el oscurecimiento *in vitro* de plantas

El NO es una molécula bioactiva, volátil, incolora y soluble en agua que regula algunas funciones en las plantas, tales como germinación de semillas, formación de raíces adventicias, floración, cierre de estomas, y senescencia; también media la respuesta al estrés biótico y abiótico y aumenta la actividad antioxidante contra el estrés oxidativo (Crawford y Guo 2005; Khan *et al.* 2017). El SNP se ha utilizado como donante de NO de bajo costo (Zandonadi *et al.* 2010). Algunos resultados indican que su adición exógena durante el

cultivo *in vitro* tiene efectos positivos (Cuadro 1) (Jafari y Daneshvar 2019; Subiramani *et al.* 2019; Pandey *et al.* 2020), ya que, al ser un donador de NO, tiene un efecto como regulador de crecimiento y contribuye al desarrollo de los tejidos *in vitro* (Pandey *et al.* 2020; Pradhan *et al.* 2020). Aunque los resultados dependen de las concentraciones y genotipo (Sarropoulou *et al.* 2014).

Se ha mencionado que el SNP inhibe la actividad de las enzimas PPO, PAL y POD, enzimas asociadas a niveles altos de fenoles, así como la producción de etileno, lo cual resulta en la reducción del oscurecimiento y lignificación externa en brotes de bambú, además de proteger la membrana plasmática. De igual manera el NO puede evitar la transformación de fenoles en quinonas al hacerlos reaccionar con compuestos quelantes de iones metálicos (Xu *et al.* 2009; Xu *et al.* 2010; Yang *et al.* 2010; Hesami *et al.* 2018; Pandey *et al.* 2020).

Cuadro 1. Reportes del efecto del nitroprusiato de sodio en el cultivo *in vitro* de plantas y brotes de bambú.

Material vegetal	Tratamiento	Resultados	Referencia
Brotes de crisantemo	0,83 a 6,71 μM de SNP	Con 1,67 μM SNP + 2,22 μM BA se generó la mayor inducción en el número de brotes.	Arun <i>et al.</i> (2017)
Semillas <i>in vitro</i> de soya	0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM de SNP	Mayor brotación con 30 μM SNP + 4,44 μM BA. Alta resistencia al estrés salino y sobrevivencia de brotes con 50 μM SNP + 4, 44 mM BA.	Karthik <i>et al.</i> (2019)
Callos de <i>Valeriana jatamansi</i>	5, 10, 15, 20, 30 μM de SNP	Con 1,5 mg/L de NAA + 15 μM de SNP se obtuvo mayor frecuencia de callos. Disminución de hiperhidricidad y oscurecimiento al usar 20 y 30 μM SNP. Mayor inducción de brotes y enraizamiento con 10% agua de coco + 15 μM SNP.	Pandey <i>et al.</i> (2020)
Callos de <i>Dioscorea opposita</i>	0, 10, 20, 40, 100, 150 μM de SNP	Con 20-40 μM de SNP disminuye la concentración de H_2O_2 y aumenta la inducción de callos, disminuye la actividad de catalasa y la POD y aumenta la actividad del superóxido dismutasa; promueve la acumulación de prolina y glutatión y reduce el oscurecimiento.	Xu <i>et al.</i> (2009)
Callos de <i>Ficus religiosa</i>	10, 20, 30, 40 y 50 μM de SNP	La concentración de 50 μM SNP disminuyó el oscurecimiento, la actividad de la PPO, SOD y CAT y aumentó la concentración de prolina.	Hesami <i>et al.</i> (2018)

Cuadro 1. (Cont.)

Material vegetal	Tratamiento	Resultados	Referencia
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	50, 100, 250 y 500 μ M de SNP y 0,05, 0,1, 0,3 y 0,5 mM de putrescina	Los tratamientos con mayor eficacia fueron 10% PEG + 50 μ M SNP + 0,05 mM putrescina (T10) y 10% PEG + 100 μ M SNP + 0,05 mM putrescina (T14). En ellos se observó rápida producción de primordios y mayor número de raíces, la longitud de raíces y sobrevivencia.	Pradhan <i>et al.</i> (2020)
Brotos de <i>Arachis hypogaea</i> (M-13 y PBS24030)	5, 50, 100 y 500 μ M de SNP y en combinación con 3 mg/L BA	Inducción de brotes por parte de SNP solo (100 μ M) o en combinación (50 μ M + BA). A concentraciones bajas mejora la actividad antioxidante, ya que aumenta la actividad enzimática de CAT, SOD y APX con la finalidad de proteger a las plantas del estrés oxidativo.	Verma <i>et al.</i> (2014)
Puntas de brotes de <i>Rubus idaus</i>	50 y 100 μ M de SNP + 100 mM de NaCl	Los valores más altos para el número de brotes y hojas, altura de brotes, peso fresco, peso seco, biomasa, carotenoides se obtuvieron con 50 μ M de SNP. La mejor cantidad de prolina se encontró en el control y la menor cantidad de azúcar soluble total con 50 y 100 μ M de SNP y con NaCl 100 mM + SNP 100 μ M se encontró un aumento en la actividad de SOD.	Ali <i>et al.</i> (2017)

Cuadro 1. (Cont.)

Material vegetal	Tratamiento	Resultados	Referencia
Hojas de cerezo CAB-6P, Gisela 6 y MxM 14	0, 10, 20, 30, 40 o 50 μ M SNP + 17,6 μ M de BA y 2,68 μ M de NAA	CAB-6P: 10 μ M de SNP mayor número de brotes. Con 30 μ M de SNP brotes con mayor longitud e inducción de brotes y con 50 μ M SNP se obtuvo el mejor enraizamiento. Gisela 6: La inducción de brotes mejoró en un 40% con 40 μ M de SNP, también indujo formación de raíces y con 30 μ M SNP produjo callos más grandes. MxM 14: con 30 μ M de SNP se obtuvo el mayor número de brotes y mayor producción de raíces, tasa de inducción y con 40 μ M SNP raíces y brotes más largos. Mejor tamaño, tasa de inducción y peso fresco en callos se observaron en concentraciones de 30 μ M SNP (CAB-6P) y 40 μ M SNP (MxM14).	Sarropoulou <i>et al.</i> (2014)
Brotos pelados de bambú	0,1, 0,5 y 1,0 mM de SNP	El tratamiento con 0,5 mM disminuyó la actividad enzimática de PAL, PPO y POD por lo que retrasó el oscurecimiento de los brotes.	Yang <i>et al.</i> (2010)

APX: ascorbato peroxidasa; BA: benciladenina; CAT: catalasa; NAA: ácido naltalenacético; PAL: fenilalanina amonio liasa; PEG: polietilenglicol; POD: peroxidasa; PPO: polifenol oxidasa; SNP: nitroprusiato de sodio; SOD: superóxido dismutasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del proyecto

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología, del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

4.2. Material vegetal

Se utilizaron yemas de plantas adultas de *B. lako*, las cuales fueron previamente establecidas por división de rizomas en el invernadero del CIGRAS (Figura 2). El riego de las plantas fue por goteo y se aplicó 1 g de fertilizante granular (Rosafert 12-12-17+2, Abonos Superior, Costa Rica) cada mes en la base de cada planta. También se comenzó a aplicar, dos semanas antes de cada introducción, 2 g/L de Agri-mycin® (Pfizer, México) en combinación con 2 g/L benomil (Benomil® 50 WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwan) cada dos o tres días al follaje de las plantas, para reducir la carga de microorganismos al momento de realizar la desinfección para su establecimiento *in vitro* (Zamora-Chacón 2015).



Figura 2. Plantas de *B. lako* establecidas previamente en el invernadero del CIGRAS.

4.3. Desinfección de tejidos

El protocolo de desinfección se basó en la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (2006), con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación: con la ayuda de una tijera de podar desinfectada se seccionaron ramas laterales de *B. lako*. Posteriormente, se llevaron al laboratorio y se cortaron en segmentos de un solo nudo, con una yema visible y prominente,

de aproximadamente 2,0 – 3,0 mm de diámetro y 25 – 35 mm de longitud, se les removió cuidadosamente la vaina de la hoja y se limpiaron con algodón impregnado de etanol al 70% para después ser sumergidos en una solución alcalina de Extran MA 01 (0,1% v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 10 min a 100 rpm. A continuación, se realizó una inmersión en 2 g/L de Agri-mycin® (Pfizer, México) en combinación con 2 g/L benomil (Benomil® 50WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwán) durante 50 min a 100 rpm. Seguidamente, se realizó una inmersión en etanol al 70% durante 2 min, después se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaOCl 1,5% v/v) con dos gotas de Tween 80 Sigma® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) por cada 100 mL, durante 15 min a 100 rpm. Por último, los explantes se lavaron con agua destilada estéril de 3 a 5 veces en la cámara de flujo laminar y los extremos de los explantes se cortaron con la ayuda de un bisturí para eliminar los extremos dañados luego de la desinfección.

4.4. Establecimiento *in vitro* y brotación inicial

Se utilizaron las sales minerales del medio Murashige y Skoog (MS) (1962) para el establecimiento de los explantes en medio sólido. El medio MS se suplementó con tiamina-HCl (0,1 mg/L), piridoxina-HCl (0,5 mg/L), ácido nicotínico (0,5 mg/L), glicina (2,0 mg/L), mioinositol (100 mg/L), SM (Supresor Microbiológico, Laboratorios Químicos Arvi, Cartago, Costa Rica; 2 ml/L), thidiazurón (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) (0,7 mg/L) y sacarosa (3% m/v). El pH se ajustó a 5,8 con KOH. El medio se solidificó con 0,2% (m/v) de Phytigel™ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se dispensaron 10 ml de medio en tubos de cultivo de 25 x 150 mm y por último se autoclavó por 20 min a 1,5 kg cm².

En la cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas, se colocó una microestaca de forma vertical en el medio de cultivo, con el extremo basal hacia abajo y con el nudo al nivel del medio. Seguidamente, se cerraron los tubos de cultivo con tapas de plástico y se sellaron con adhesivo de plástico (película autoadherible Darnel). Inicialmente, se colocaron en oscuridad a 25°C hasta observar la brotación. Después se transfirieron a condiciones de luz indirecta, y al presentar una coloración verde, se colocaron en condiciones de luz directa con un fotoperiodo de 12 h (33,88 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a 25°C (Jiménez *et al.* 2006). El subcultivo de los brotes se hizo en intervalos de tres semanas, tal y como lo realizaron Negi y Saxena (2011b).

4.5. Caracterización del color en los brotes *in vitro* de *B. lako*

4.5.1. Establecimiento de la escala visual de oscurecimiento

Se evaluaron 36 brotes de *B. lako* dos veces por semana durante dos meses para establecer los grados de oscurecimiento más representativos del proceso en las diferentes etapas de crecimiento de los tejidos. En primera instancia, se estableció en qué parte del tejido inició el oscurecimiento y posteriormente se determinaron cuatro grados de oscurecimiento tomando en cuenta la coloración del tejido y la forma en que avanzó en los brotes. Esta escala de oscurecimiento se basó en el trabajo de Martínez-Torres (2020). Al identificar los grados de la escala se procedió a documentar el proceso mediante fotografías.

4.5.2. Caracterización del color en brotes *in vitro* de *B. lako*

La caracterización del color de los brotes *in vitro* de *B. lako*, ocasionados por oscurecimiento, se realizó de la siguiente forma. Se tomaron fotografías digitales utilizando una cámara Nikon 289 modelo D71000 de los brotes *in vitro* de *B. lako* correspondientes a cada grado de oscurecimiento de la escala visual previamente establecida. A continuación, en el editor de fotografías Adobe Photoshop (Versión 23.3.2), se eliminó el fondo y se obtuvieron las imágenes individuales de los brotes *in vitro* de *B. lako* en los diferentes grados de oscurecimiento. Posteriormente, y debido a que la descripción del color a través de la percepción visual humana del color rojo a verde es variada (Merbs y Nathans, 1992), se utilizó la herramienta geotests.net diseñada por Jégou (2013). Este es un software de acceso público, simple y económico que permite obtener los valores RGB hexadecimales de manera cuantitativa y objetiva de los seis colores principales de cada imagen de los diferentes grados de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako*.

4.5.3. Observación del tejido interno de los brotes *in vitro* de *B. lako*

Para evaluar el oscurecimiento del tejido interno de los brotes *in vitro* de *B. lako*, se diseccionaron de forma longitudinal y con ayuda de un bisturí, dos brotes por cada grado de oscurecimiento previamente establecidos en la escala visual. El tejido de los brotes se inspeccionó utilizando un estereoscopio (Olympus SZ2-ILST, Tokio, Japón) y se documentó a través de fotografías con una cámara de un celular Redmi Note 10 Pro de 108 MP.

4.6. Pruebas bioquímicas

4.6.1. Cuantificación de polifenoles totales (PT) en tejido *in vitro* de *B. lako*

Se cuantificó la cantidad de PT en los diferentes grados de oscurecimiento establecidos en la escala según el protocolo descrito por Ainsworth y Gillespie (2007). Sin embargo, debido a la poca disponibilidad de material vegetal, fue necesario evaluar el efecto de reducir la cantidad inicial de tejido vegetal a utilizar, a continuación, se describe el protocolo.

a. Extracción de Polifenoles:

Se trituraron de 6 a 10 brotes con nitrógeno líquido, posteriormente el tejido macerado se incubó a una temperatura de -80°C hasta realizar el ensayo. Se experimentó con dos cantidades de tejido vegetal: 0,25 y 0,50 g colocados en un tubo Eppendorf de 2 ml, al que seguidamente se le agregó 1,6 y 0,8 ml de metanol al 95% (v/v) a 4°C , respectivamente, y dos balines de acero inoxidable. Las muestras se homogenizaron por 1 min a 30 Hz en el molino mecánico (modelo MM400 de Retsh, Hann, Alemania) y se removieron los balines de acero inoxidable. Las muestras se extrajeron por 48 h a temperatura ambiente y en oscuridad, después de transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y con la ayuda de una micropipeta, se recolectó el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 2 ml. En tubos Eppendorf de 2 mL se prepararon las siguientes soluciones:

- **Muestra de interés:** 100 μL muestra (sobrenadante recolectado previamente) más 200 μL de Folin-Ciocalteu (FC) al 10% (v/v) en agua.
- **Estándar:** 100 μL ácido gálico 5 mM diluido en metanol al 95% (v/v) más 200 μL FC.
- **Blanco:** 100 μL metanol más 200 μL FC.

Seguidamente, las soluciones se homogenizaron en un vortex durante 1 min, posteriormente a cada una se les adicionó 800 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 700 mM y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente.

b. Preparación de curva estándar de ácido gálico y análisis espectrofotométrico

Después de las dos horas de incubación, se preparó la curva estándar de ácido gálico con seis puntos de concentración que iban desde 0 hasta 0,086 mg/mL en una placa de 96 pocillos.

En el cuadro 2 se muestran las concentraciones utilizadas del estándar de ácido gálico (0,456 nmol/ μ L) y blanco para completar 200 μ L por cada pocillo. En el caso de los pocillos que contenían las muestras en estudio, se utilizaron 200 μ L de volumen. Tanto para los puntos de la curva estándar como para las muestras, se realizaron tres réplicas biológicas y tres repeticiones instrumentales. Por último, se midió la absorbancia en un lector espectrofotométrico de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de 765 nm.

Cuadro 2. Curva patrón del ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales en las muestras de tejido *in vitro* de *B. lako*

Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Volumen del estándar de ácido gálico (0,456 nmol/ μ L) (μ L)	Volumen de blanco de metanol al 95% (v/v) (μ L)
0	0	200
0,017	44	156
0,034	88	112
0,051	132	68
0,068	176	24
0,086	200	0

A partir de la curva se calculó la concentración de ácido gálico, y se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad total de fenoles en las muestras de tejido *in vitro* de *B. lako*:

$$PT = \frac{AG \cdot V}{M} \cdot FD$$

Donde **PT** es la concentración de polifenoles totales (mg/g) que se expresan en términos de miligramos de ácido gálico por gramo de muestra, **AG** es la concentración de ácido gálico calculada a partir de la curva patrón (mg/mL), **V** es el volumen de metanol utilizado para la extracción (mL), **M** es la masa de tejido utilizado (g) y **FD** corresponde al factor de dilución, que es este caso fue de 11.

4.6.2. Actividad de la enzima PPO en tejidos *in vitro* de *B. lako*

La metodología empleada para determinar la actividad de la PPO en el tejido *in vitro* de *B. lako* se basó en la descrita por Zhang y Shao (2015) y Huang *et al.* (2002). Tomando en

consideración que para realizar la prueba bioquímica de la PPO en brotes *in vitro* de *B. lako* se tenía previsto recolectar las muestras a medida que se presentaban los grados de oscurecimiento determinados en la escala y no se podían hacer todas las mediciones simultáneamente, se estudió si el método de macerado y si el almacenamiento del tejido vegetal de *B. lako* a una temperatura de -80°C provocaban cambios en la determinación de la actividad enzimática. El tejido se maceró utilizando nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pistilo, o un molino de café. Se almacenaron tres repeticiones biológicas de ambos métodos de maceración durante treinta días, la actividad enzimática se midió en intervalos de 0, 7, 15 y 30 días.

a. Extracción de la enzima PPO en tejidos in vitro de B. lako

Con ayuda de un bisturí previamente desinfectado se seccionaron aproximadamente 6 a 7 brotes *in vitro* de *B. lako* en fragmentos pequeños. Posteriormente en un molino de café durante 5 min se trituró el tejido vegetal, por otro lado, con la ayuda de un pistilo, un mortero y nitrógeno líquido se maceró el tejido vegetal. En una balanza analítica se pesó 0,25 g de tejido (de cada uno de los métodos de molienda) en un tubo Eppendorf de 2 mL, se agregaron dos balines de acero inoxidable y 1 mL de 0,2 de buffer de fosfato de sodio a pH 6,8, almacenado a 4°C . En un molino mecánico (modelo MM400 de Retsh, Hann, Alemania) se homogenizó durante 1 min a 30 Hz. Con la ayuda de una micropipeta se agregaron 250 μL del buffer de extracción con la intención de lavar los balines de acero y completar el volumen para la extracción de la enzima (1,25 mL), en este paso los balines de acero se retiraron del tubo Eppendorf con un imán y una pinza limpia. Luego se homogenizó la muestra en un vortex por 1 min y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 10 000 rpm. Se recolectaron 100 μL el sobrenadante y se transfirieron a un tubo Eppendorf nuevo. Las muestras se colocaron en un bloque frío y una cubeta con hielo para conservar la enzima mientras se realizaba el análisis.

b. Análisis espectrofotométrico

Se adicionaron 90 μL de 3,8 mM de 3,4 – Dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) preparado con el buffer de extracción; seguidamente se agregaron 10 μL de extracto enzimático por triplicado en cada pocillo de una microplaca. A continuación, se realizó la lectura cada minuto durante una hora en un espectrofotómetro Multiskan GO

(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de 490 nm y a 25°C. Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática, donde una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que causa una unidad de cambio en la absorbancia por minuto, la fórmula aplicada se basó en la reportada por Zhu *et al.* (2020) que se describe de la siguiente manera:

$$AE = \frac{\left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t}\right) \cdot Vt}{Ve \cdot m \cdot 0,001 \cdot t}$$

Donde, *AE* es la actividad enzimática, reportada en U/min·g, $\Delta Abs/\Delta t$ representa la pendiente de la curva, *Vt* corresponde al volumen total de la extracción (mL), *Ve* el volumen del extracto enzimático (mL), *m* la masa de tejido empleado (g), **0,001** es definido como el cambio de transformación de sustrato por minuto y *t* corresponde al tiempo en minutos de lectura de actividad enzimática.

4.6.3. Contenido de MDA en tejido *in vitro* de *B. lako*

La metodología empleada para realizar la cuantificación de MDA se basó en la descrita por Balen *et al.* (2009). Al igual que para el contenido total de fenoles, se optimizó el protocolo con el objetivo de evaluar si había un efecto al disminuir la masa inicial vegetal. A continuación, se detalla el protocolo seguido.

a. Extracción de MDA

Se liofilizaron de dos a tres brotes *in vitro* de *B. lako* y se colocaron a - 40°C hasta ser procesados. Se experimentó con dos cantidades iniciales de tejido vegetal, 30 y 60 mg de muestra liofilizada, las cuales se agregaron en un tubo de Eppendorf de 2 mL. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres repeticiones instrumentales por cada muestra. Seguidamente se maceraron con la ayuda de dos balines de acero inoxidable por 1 min a 30 Hz en el molino mecánico (modelo MM400 de Retsh, Hann, Alemania) y se retiraron los balines de acero. Se agregó 800 y 1600 μ L de la solución de 0,25% (m/v) de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) en 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA), respectivamente. De forma inmediata, se homogenizaron por inversión y se calentaron durante 30 min en un baño María a 95°C dentro de la capilla de extracción. Para finalizar, las muestras se enfriaron durante 5 min en una cubeta con hielo para después centrifugarlas a 10 000 rpm por 10 min.

b. Análisis espectrofotométrico

Se preparó una placa de 96 pocillos, se agregó 200 μL del blanco y cada muestra por triplicado en los pocillos de la placa. Se procedió a realizar la lectura de absorbancia en un lector espectrofotométrico de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) con absorbancias de 532 nm y 600 nm para corregir turbidez inespecífica. El contenido de lípidos peroxidados se expresó como el total de especies reactivas de TBA (TBARS, por sus siglas en inglés), principalmente MDA, por gramo de masa de muestra seca usando el coeficiente de extinción de $155 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Para determinar la concentración de MDA se utilizó la ecuación de la Ley de Lambert-Beer, y se despejó para “c” de la siguiente manera:

$$c = \frac{Ab}{\epsilon \cdot b}$$

En donde **c** es la concentración de MDA en la muestra (mM), **Ab** es la absorbancia corregida ($Ab_{532} - Ab_{600}$) (nm), ϵ es el coeficiente de extinción molar que equivale a $155 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ y **b** es la longitud de la cubeta que es de 0,8 cm.

Posteriormente se convirtió la concentración obtenida de MDA, donde c corresponde a mmol/L del cálculo anterior, a términos de mmol de la siguiente manera:

$$mmol = c \cdot \frac{1L}{1000 mL} \cdot 0,2 mL$$

Una vez obtenida la concentración de MDA en mmol, se procedió a dividirla entre la masa en gramos de tejido utilizado para expresar la concentración de MDA en mmol/g. En este ensayo se realizaron tres réplicas biológicas y tres repeticiones instrumentales.

4.7. Histología

El proceso de histología vegetal en los brotes *in vitro* de *B. lako* se basó en el protocolo descrito por Benavides-Acevedo y Torres-Segura (2022). A continuación, se detalla la metodología empleada.

La caracterización histológica de los brotes *in vitro* de *B. lako* se realizó en las zonas distal, medial y basal de los brotes *in vitro* en cada grado de oscurecimiento, según la escala desarrollada (Figura 3).



Figura 3. Zona distal, medial y basal de los brotes *in vitro* de *B. lako* para el análisis histológico, la localización de polifenoles y la enzima peroxidasa. Barra equivalente a 1 cm.

4.7.1. Fijación del tejido vegetal

El tejido vegetal se cortó en secciones de aproximadamente 2 cm y 0,5 cm (para luego realizar cortes longitudinales y transversales respectivamente), se colocaron en un cassette de procesamiento histológico y se fijaron en una solución de F.A.A. (10% formaldehído, 5% de ácido acético glacial y 85% de etanol al 70% v/v) por alrededor de 24 h a temperatura ambiente.

4.7.2. Procesamiento del tejido vegetal

Las muestras se deshidrataron en una serie de grados de etanol de la siguiente forma: etanol 70% y etanol de 80% por 5 min, posteriormente se sumergieron en soluciones de etanol de 90%, etanol de 95%, etanol de 100% y nuevamente etanol de 100%, por 10 min. Seguidamente, las muestras se colocaron en una solución 1:1 de etanol y xilol por 10 min, a continuación, se sumergieron en xilol por 10 min y nuevamente se sumergieron en xilol por 10 min. Cada una de las soluciones se calentaron en el microondas por 2 min hasta alcanzar una temperatura entre 50-60 °C. Posteriormente, se colocaron en una solución 1:1 de xilol y

parafina por 20 min dentro de una estufa a 60°C; y finalmente se realizaron dos inmersiones seguidas en una solución de parafina (Paraplast[®], Leica) a 60°C dentro de una estufa durante 40 min.

4.7.3. Inclusión de tejidos vegetales en parafina

Las muestras se colocaron en un recipiente que contenía parafina de inclusión (Paraplast[®], Leica) y este a su vez se colocó en una plantilla para evitar que la parafina de inclusión se solidificara. Cada cassette de procesamiento se tomó con la punta de una pinza previamente calentada. Las muestras se transfirieron y se colocaron en la posición espacial correcta, para obtener cortes transversales y longitudinales en un molde metálico previamente calentado y prellenado con parafina (Paraplast[®], Leica). Seguidamente se calentó la superficie del cassette de procesamiento y se colocó sobre el molde metálico, y se relleno con parafina. Posteriormente se almacenaron en el refrigerador por alrededor de 10 min. Finalmente, se separó el bloque de parafina con la muestra del molde metálico.

4.7.4. Corte de tejidos vegetales y colocación en portaobjetos

Los bloques de parafina se montaron (colocados en una cubeta con hielo para mantenerlos fríos) en un micrótopo de rotación (American Optical 820, Buffalo, USA). Los bloques de parafina en primera instancia se desbastaron con cortes de 60 µm, hasta ver la estructura de estudio. Seguidamente, se cambió de cuchilla y se ajustó el micrótopo a entre 8-12 µm para realizar los cortes. Los cortes se colocaron en un baño de flotación en agua (27-28°C), para expandir las láminas de parafina. A continuación, se colocaron en portaobjetos y se acomodaron en una canastilla metálica. Por último, la canastilla metálica se incubó en una estufa entre 45-60°C durante 60 min.

4.7.5. Tinción de tejidos vegetales

4.7.5.1. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)

Los portaobjetos se desparafinaron colocándolos durante 2 min en soluciones de xilol, xilol, etanol (100%), etanol (100%), etanol (95%), etanol (70%) y se colocaron en una cubeta con agua por alrededor de 15 segundos. A continuación, se colocaron durante 15 min en ácido

peryódico al 1% m/v. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Con la ayuda de un gotero se cubrieron los portaobjetos con reactivo de Schiff y se dejaron reposar por 15 min; posteriormente se lavaron con agua corriente calentada a 45°C. Seguidamente los portaobjetos se sumergieron en azul de Coomassie por 30 min. Después de este tiempo se lavaron con agua y se deshidrataron y aclararon sumergiendo la canastilla de metal por 2 min en soluciones de etanol (95%), etanol (100%), etanol (100%), xilol y nuevamente en xilol. A continuación, la canastilla se mantuvo sumergida en xilol y, con la ayuda de una pinza, se tomó cada portaobjeto a los cuales se les situó un cubreobjetos con medio de montaje (Permout[®]). La tinción de PAS es utilizada para teñir polisacáridos simples y complejos, tales como la celulosa en la pared celular y reservas energéticas como gránulos de almidón (Chu 1963; Yu *et al.* 2021).

4.7.5.2. Localización de polifenoles

Se realizaron dos pruebas para determinar la localización de polifenoles, las cuales se detallan a continuación:

a. Test Hoepfner-Vorsatz (Reeve 1951):

La prueba se realizó en las zonas distal, medial y basal de los brotes en los diferentes grados de oscurecimiento, previamente procesados. El protocolo utilizado se detalla a continuación: las muestras se desparafinaron en dos cambios por 2 min en una solución de xilol, posteriormente las muestras se hidrataron en alcoholes de concentración decreciente por 2 min, a continuación, en cada uno de los portaobjetos se colocaron gotas de una solución compuesta por: 10% de nitrito de sodio, 10% de ácido acético y 20% de urea. Después de 3 min, se colocaron gotas de una solución 2 N de NaOH por 3 min.

b. Test con azul de toluidina:

La prueba se realizó en las zonas distal, medial y basal de los brotes en los diferentes grados de oscurecimiento, previamente procesados. El protocolo empleado se describe de la siguiente manera: los portaobjetos con las muestras se colocaron en una solución de

hipoclorito de sodio al 13% (v/v) durante 5 min y posteriormente en azul de toluidina 0,05% (diluído en agua) por 10 min (Elwers *et al.* 2010).

A continuación, en ambas metodologías, los portaobjetos con el tejido se deshidrataron por 2 min en alcoholes de concentración creciente, seguidamente se aclararon en dos cambios por 2 min en xilol y por último se realizó el montaje del cubreobjeto. Además, en las dos pruebas se utilizó frijol de variedad brunca como control positivo.

4.7.5.3. Localización de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La prueba se realizó en las zonas distal, medial y basal de los brotes en los diferentes grados de oscurecimiento, previamente procesada para localizar la presencia de H₂O₂, se realizó la prueba de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Melvin *et al.* 2017) con algunas modificaciones que a continuación se describen: los portaobjetos con las muestras se incubaron en la estufa a 60°C por 20 min, seguidamente se desparafinaron en dos cambios consecutivos de 2 min en xilol, posteriormente se hidrataron en alcoholes de concentración creciente por 2 min. Las muestras se incubaron en oscuridad por 1 hora en DAB (preparado con 1,5 mL de sustrato DAB y con dos gotas del cromógeno DAB), posteriormente se sumergieron en agua por alrededor de 10 segundos, después se realizó una contraincubación con eosina al 0,1% por 3 min. Seguidamente las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente por 2 min. A continuación, se aclararon en dos cambios consecutivos de 2 min en xilol y por último se procedió a realizar el montaje del cubreobjeto. Para esta prueba se utilizó como control positivo la raíz de rábano.

4.7.5.4. Análisis de las muestras fijadas

Se procedió a observar las láminas fijas con un microscopio invertido (Zeiss, AxioVert A1) con el fin de determinar si existen diferencias en las estructuras celulares en los distintos grados de oscurecimiento. Durante la observación de las láminas se tomaron fotografías de las imágenes más representativas con la ayuda de una cámara Olympus y el software CellSens.

4.8. Efecto del SNP en tejidos *in vitro* de *B. lako*

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de SNP sobre el desarrollo y oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako*. El establecimiento *in vitro* de las microestacas de *B. lako* se realizó según el protocolo de desinfección y en el medio de cultivo sólido descritos anteriormente, suplementados con SNP (Sigma-Aldrich, Ateenheim, Alemania) a concentraciones de 0,5, 1,5 y 3 mM (Yang *et al.* 2010) y en presencia de un testigo. El SNP se adicionó al medio de cultivo por filtración (con filtros de jeringa de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm) en la cámara de flujo laminar y se agitó en un vortex, luego del autoclavado. Se dispensaron 10 mL de medio de cultivo en tubos de cultivo de 25 x 150 mm. Se evaluó en cada tratamiento, el porcentaje de brotación, número de brotes, longitud del brote más largo y el grado de oscurecimiento según la escala establecida. Las evaluaciones se realizaron en dos momentos de cada semana desde la tercera hasta la séptima semana de cultivo *in vitro*.

4.9. Diseño experimental y análisis estadístico

La optimización de las pruebas bioquímicas, así como para el análisis de los brotes en los distintos grados de oscurecimiento, se utilizaron tres réplicas biológicas y tres repeticiones instrumentales. Los datos de las pruebas de PT y MDA no cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se les aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En cuanto a las pruebas de los métodos de maceración y almacenamiento de la actividad de la PPO. Los resultados mostraron tener una distribución normal, por lo que se les realizó una separación de medias mediante una prueba de Tukey.

Los datos de las pruebas bioquímicas en los brotes *in vitro* de *B. lako* en los distintos grados de oscurecimiento para las pruebas de PPO y MDA, no cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se les aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En cambio, los datos de los PT presentaron una distribución normal, por tanto, se realizó una separación de medias mediante una prueba de Tukey. Para determinar si la cantidad de polifenoles tenía un efecto en la actividad de la PPO en los brotes *in vitro* de *B. lako* en los diferentes grados de oscurecimiento se realizó una correlación de Pearson a una confiabilidad del 95%.

En cuanto al experimento de SNP se evaluaron tres tratamientos de SNP (0,5, 1,5 y 3 mM) en presencia de un testigo. Para los datos de brotación y número de brotes se realizó una tabla de contingencia y se aplicó un Chi cuadrado de Pearson. Por otro lado, la longitud de brotes cumplió con los supuestos de normalidad, por lo que se realizó una separación de medias mediante una prueba de Tukey. Para el análisis del efecto de los tratamientos de SNP sobre el oscurecimiento, se realizó una tabla de contingencia y se aplicó una prueba de Chi cuadrado de Pearson. Para las variables de crecimiento y desarrollo la unidad experimental fue de un explante. Para evaluar el efecto del SNP se utilizó la escala de oscurecimiento previamente establecida y para el control se utilizaron 36 réplicas biológicas; en cuanto al tratamiento 0,5 mM se emplearon 43; para el caso del tratamiento 1,5 mM se usaron 34 y para el tratamiento con 3,0 mM se evaluaron 31 réplicas biológicas. Los gráficos se elaboraron utilizando el software de Excel de Microsoft Office 365 y se utilizó el programa informático R (R Core Team 2020) para realizar el análisis estadístico a todas las pruebas anteriormente mencionadas.

5. RESULTADOS

5.1.1. Descripción del oscurecimiento en brotes *in vitro* de *B. lako*

Se evaluó el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* durante siete semanas. A las cuatro semanas de cultivo *in vitro* el oscurecimiento de los brotes comenzó a ser evidente y su manifestación creció de manera exponencial en las siguientes semanas. Para la semana siete se reporta el 87% de oscurecimiento total en los brotes (Figura 4).

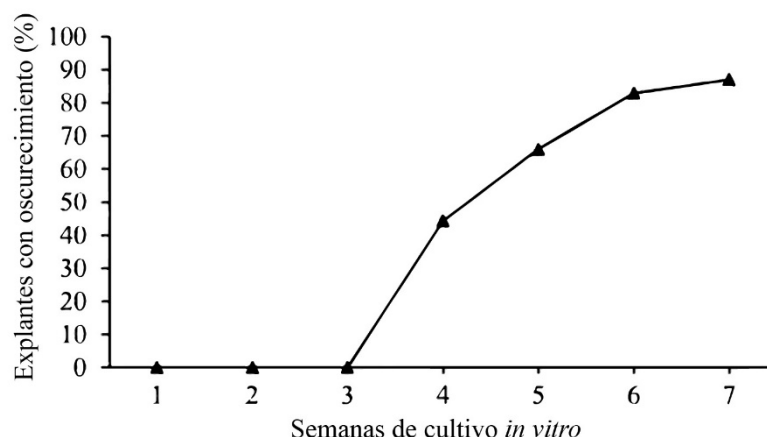


Figura 4. Comportamiento del oscurecimiento de los brotes de *B. lako* durante siete semanas de cultivo desde su establecimiento en condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS. Después de dos semanas de introducción *in vitro* se colocaron en condiciones de luz indirecta y a la cuarta semana se colocaron en condiciones de luz directa. Se evaluaron 36 brotes.

Se identificó, de manera visual, que el oscurecimiento se origina en la base del brote y avanza hacia la zona apical del mismo. Inicialmente, se observó clorosis en el brote y en la punta de las hojas; posteriormente el brote se va tornando oscuro hasta cubrir su totalidad. Con el fin de describir los cambios bioquímicos y anatómicos provocados por el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako*, se estableció una escala visual con cuatro grados de oscurecimiento y, debido a la heterogeneidad del color en los brotes, se determinó una guía de los seis colores principales (Figura 5). A continuación, se detallan los cambios de coloración de los brotes *in vitro* de *B. lako* en los diferentes grados de oscurecimiento:

Grado 1: Los brotes presentaron coloraciones verdes en el tallo y hojas (Figura 5a), el principal tono verde fue aquel con los valores $R = 64$; $G = 137$; $B = 0$. Asimismo, se observó una coloración café en la base del prófalo, justo en la unión con el explante inicial, con valores $R = 142$; $G = 96$; $B = 35$ (Figura 5a).

Grado 2: Los brotes presentaron una apariencia clorótica acentuada principalmente en la región de los nudos. En la punta de la hoja se observaron espectros de color amarillo, verde y café y en el prófalo de la base del brote se observó una coloración café. La coloración amarilla más pronunciada, según la guía de colores, corresponde a los componentes $R = 142$; $G = 155$; $B = 8$ y el color café pertenece a los valores $R = 146$; $G = 104$; $B = 50$ (Figura 5b).

Grado 3: Los prófilos que envuelven los nudos presentaron un espectro de coloración café, el más intenso presentaba valores $R = 137$; $G = 92$; $B = 47$ y el menos intenso $R = 179$; $G = 156$; $B = 90$. En cuanto a la hoja, se observaron coloraciones amarillas, siendo la más pronunciada la del código decimal $R = 177$; $G = 171$; $B = 74$, y verdes menos intensos en comparación a los brotes del grado 1. En la punta de ésta, se observó el color café más intenso (Figura 5c).

Grado 4: Los brotes presentaron colores café de diferentes tonalidades, desde tenues hasta más oscuros. El color café más oscuro fue más evidente en la zona de unión con el explante madre, el área de los nudos, la zona distal del brote y las hojas. El espectro café más intenso corresponde al código decimal $R = 112$; $G = 46$; $B = 16$. En este grado los brotes no presentan ninguna coloración verde (Figura 5d).

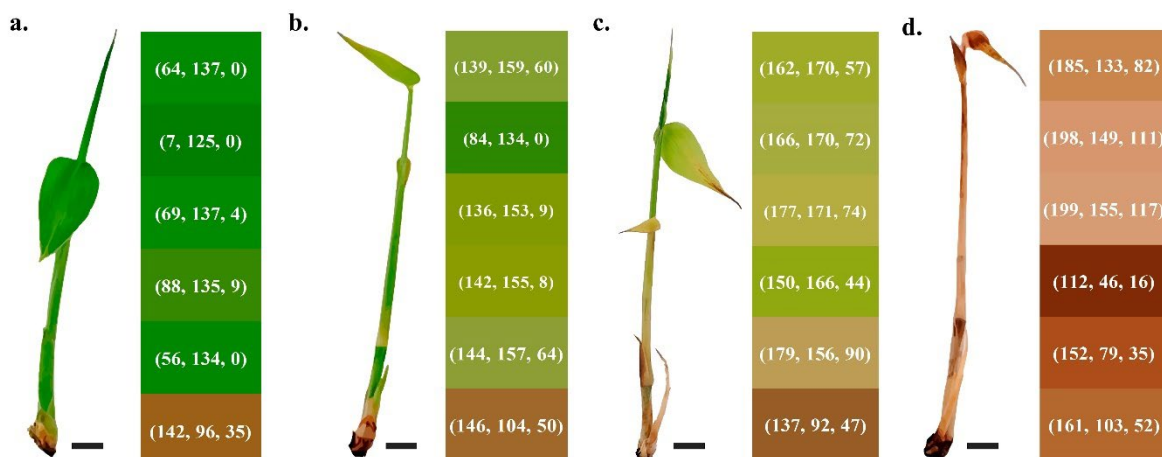


Figura 5. Escala de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako* y sus principales colores representados en códigos decimales RGB. a. Grado 1; b. Grado 2; c. Grado 3; d. Grado 4. Barra equivalente a 1 cm. Los valores entre paréntesis representan el código RGB (R, G, B).

Al diseccionar longitudinalmente la base de los brotes, en cada grado de oscurecimiento, se observó que a nivel interno los brotes del grado 1 no presentaron oscurecimiento (Figura 6a). En el grado 2 los brotes se observan oscurecidos en la base; así como, en cada nudo (Figura

6b). En el caso de los grados 3 y 4, el tejido interno tiene una apariencia oscurecida, en mayor medida en el grado 4, que igualmente se acentúa en la región del nudo (Figura 6c y d).

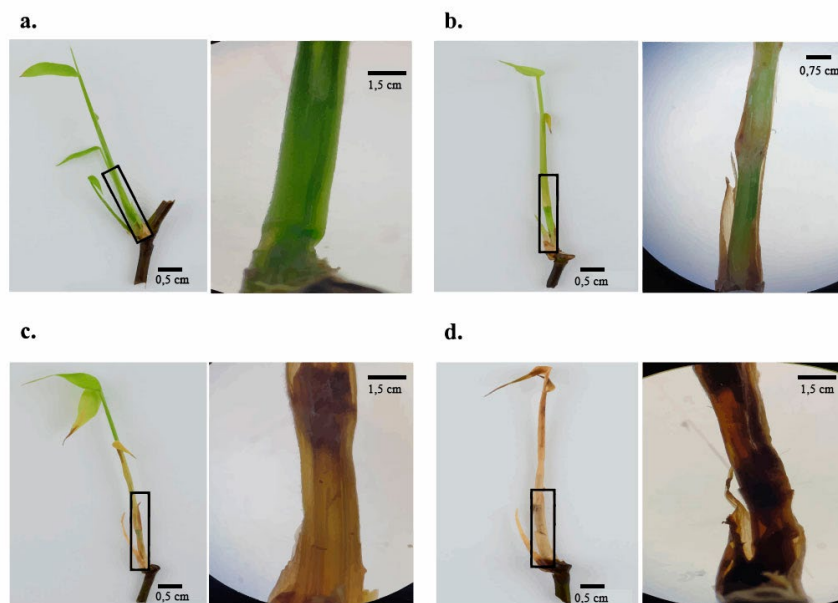


Figura 6. Detalle de la apariencia interna de la base de los brotes *in vitro* de *B. lako* en los cuatro grados de oscurecimiento. a. grado 1, b. grado 2, c. grado 3 y d. grado 4. La imagen mostrada a la izquierda muestra la zona del brote que fue disectado. A la derecha se presenta el brote diseccionado. Barra de los brotes sin diseccionar equivalente a 0,5 cm y diseccionados equivalentes a 1,5 cm (ampliados a 3x) y 0,75 cm (ampliados a 1,5x).

Como se indicó anteriormente, durante las primeras tres semanas de cultivo, los brotes se mantuvieron en el grado 1. A la cuarta semana, el oscurecimiento se hizo evidente en los brotes *in vitro*, por lo que en este lapso se observaron brotes verdes (grado 1) y brotes con inicios de oscurecimiento (grado 2). Sin embargo, en la semana cinco fue posible observar brotes en los cuatro grados de la escala, por lo que el oscurecimiento en la población de brotes *in vitro* de *B. lako* fue más evidente, para esta semana se reporta el 41,67% de los brotes completamente oscuros, es decir en grado 4. El número de brotes en este grado fue exponencial hasta la semana siete, ya que el porcentaje de los brotes introducidos en grado 4 era del 83,3%. Asimismo, en esta semana no se observaron brotes en grado 1, pero sí en los grados de oscurecimiento restantes (Figura 7).

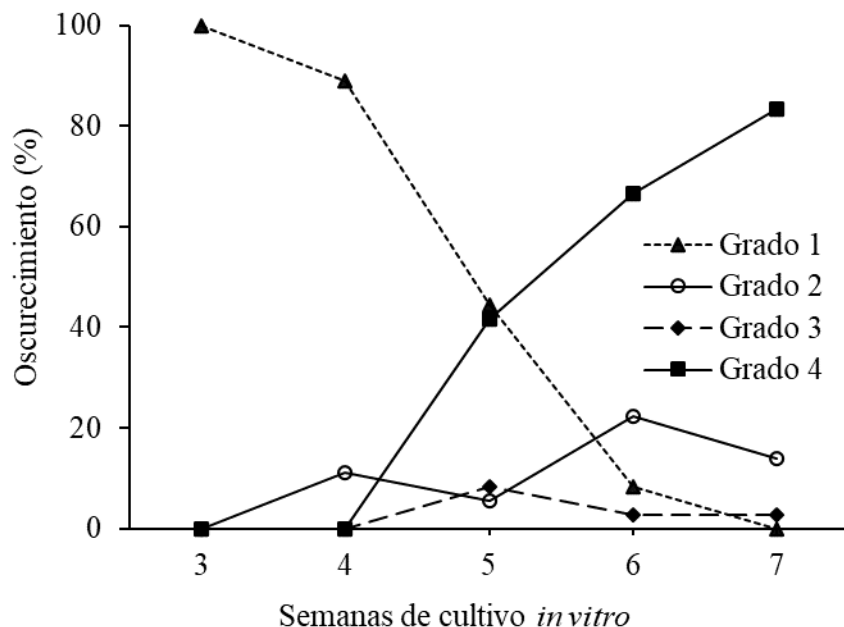


Figura 7. Porcentaje de brotes *in vitro* de *B. lako* en los diferentes grados de oscurecimiento durante siete semanas de cultivo *in vitro*.

5.2. Optimización de pruebas bioquímicas en brotes *in vitro* de *B. lako*

5.2.1. Efecto de la reducción de la masa inicial sobre el contenido de PT en el tejido *in vitro* de *B. lako*

Debido a que el oscurecimiento en los tejidos *in vitro* de *B. lako* se produjo en diferentes momentos a lo largo del tiempo, la disponibilidad de material vegetal fue una limitante para realizar las mediciones. Por lo tanto, se optimizó el método con la finalidad de reducir la masa inicial del material vegetal de 0,50 g a 0,25 g y proporcionalmente con el volumen de metanol (1,6 mL a 0,8 mL), y que esto era metodológicamente factible. Como era de esperar, se encontró que al reducir la masa inicial de tejido vegetal, se obtiene la misma concentración de PT ($p = 0,20$) (Cuadro 3). Por tanto, se logró reducir la masa inicial y se continuó utilizando 0,25 g para realizar la cuantificación de PT en los tejidos *in vitro* de *B. lako*.

Cuadro 3. Concentración total de fenoles, con respecto al material vegetal inicial utilizado, en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Material vegetal (g)	Contenido total de fenoles (mg/g PF) *
0,25	2,19 ± 0,29 ^a
0,50	2,30 ± 0,12 ^a

*Promedio ± error estándar. Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (n = 3). PF: peso fresco.

5.2.2. Efecto del almacenamiento a -80°C y del método de macerado del tejido sobre la actividad enzimática de la PPO en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Debido a la dificultad para macerar los brotes *in vitro* de *B. lako* frescos, se evaluaron dos métodos de maceración y almacenamiento en el tiempo, para determinar si se producía un efecto sobre la determinación de la actividad de la PPO.

La actividad de la PPO en el tejido *in vitro* de *B. lako* no se vio afectada por la maceración con mortero y nitrógeno líquido, y el almacenamiento de 0 a 30 días a -80°C (p = 0,49) (Figura 8). Sin embargo, el tejido macerado con molino de café sí presentó diferencias significativas (p=0,01) en la actividad de la enzima el día 15 de almacenamiento, en comparación con los días 0, 7 y 30 (Figura 8). Por lo tanto, en pruebas posteriores se continuó macerando el tejido *in vitro* de *B. lako* con nitrógeno líquido y el tejido se almacenó a -80°C mientras se recolectaron todos los grados de oscurecimiento hasta el análisis.

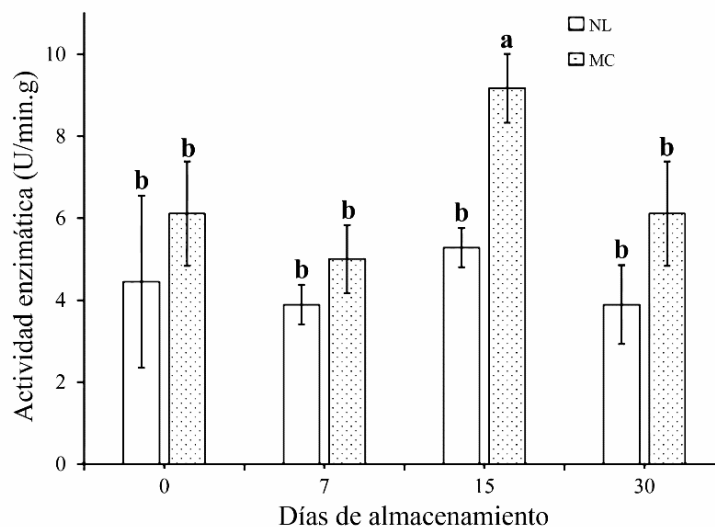


Figura 8. Efecto del método de maceración, y del almacenamiento a una temperatura de -80°C sobre la actividad de la PPO en los brotes *in vitro* de *B. lako*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas, según una prueba de separación de medias de Tukey. Barras indican el error estándar ($n=3$). NL: Con mortero y nitrógeno líquido; MC: Con molino de café y sin nitrógeno líquido. Las barras indican el error estándar.

5.2.3. Efecto de la reducción de la masa inicial sobre la cantidad del MDA en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Al igual que en la prueba del contenido de PT, con el fin de disminuir la cantidad de tejido a utilizar con respecto a lo indicado por Balen *et al.* (2009), se realizó una prueba para determinar si era posible disminuir la cantidad de masa inicial al evaluar el contenido de MDA en brotes *in vitro* de *B. lako*. Se encontró que al comparar la cantidad de material vegetal (30,0 y 60,0 mg) empleada, con respecto a la concentración de MDA, existen diferencias significativas ($p = 0,0013$) (Cuadro 4). Por lo anterior, no fue posible disminuir la masa inicial para la prueba dado que provoca un efecto en la cuantificación de MDA en los brotes *in vitro* de *B. lako*.

Cuadro 4. Concentración de MDA con respecto al material vegetal inicial utilizado, en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Material vegetal (mg)	Concentración de MDA (mmol/g PS) *
60,0	0,015 ± 0,004 ^b
30,0	0,019 ± 0,004 ^a

*Promedio ± error estándar. Letras diferentes dentro de una misma columna difieren entre sí de acuerdo con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (n = 3). PS: Peso seco.

5.3. Determinación del contenido de PT, actividad enzimática de PPO y MDA en los brotes *in vitro* de *B. lako* según la escala de oscurecimiento.

La concentración de PT, en términos de equivalentes de ácido gálico, aumentó significativamente conforme avanza el grado de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako* ($p = 5,3 \times 10^{-4}$) (Figura 9a). Al evaluar la actividad enzimática de la PPO en los brotes *in vitro* de *B. lako*, se encontró que el grado 4 de oscurecimiento presenta una actividad enzimática mayor, con respecto al grado 1 ($p = 0,037$) (Figura 9b). En cuanto a la peroxidación lipídica de los brotes *in vitro* de *B. lako*, mediante la cuantificación de MDA, se encontró que los grados 3 y 4 de oscurecimiento obtuvieron los valores más altos de peroxidación lipídica, seguido del grado 2 y finalmente el grado 1 ($p = 2,1 \times 10^{-10}$) (Figura 9c).

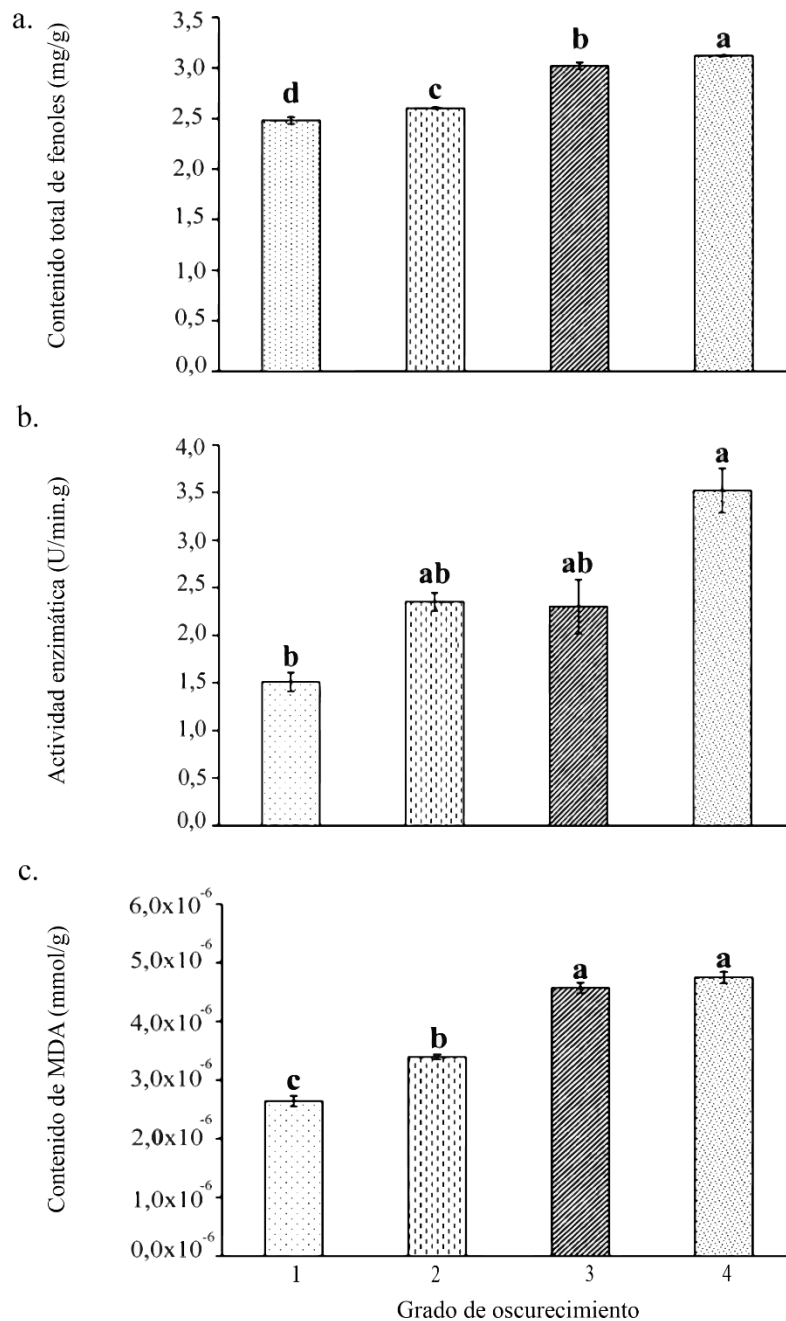


Figura 9. a. Concentración de fenoles totales (PT) en términos de equivalentes de ácido gálico, b. actividad enzimática de la PPO y c. concentración de MDA, según los diferentes grados de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, según una prueba de Tukey (PT) o Kruskal-Wallis (PPO y MDA) (n=3). Las barras indican error estándar.

Al realizar la correlación de Pearson entre los grados de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako* se encontró un coeficiente de correlación positivo de $r = 0,49$ por lo que, los valores de la actividad de la PPO muestran una tendencia a incrementar a medida aumenta la cantidad total de fenoles (Figura 10).

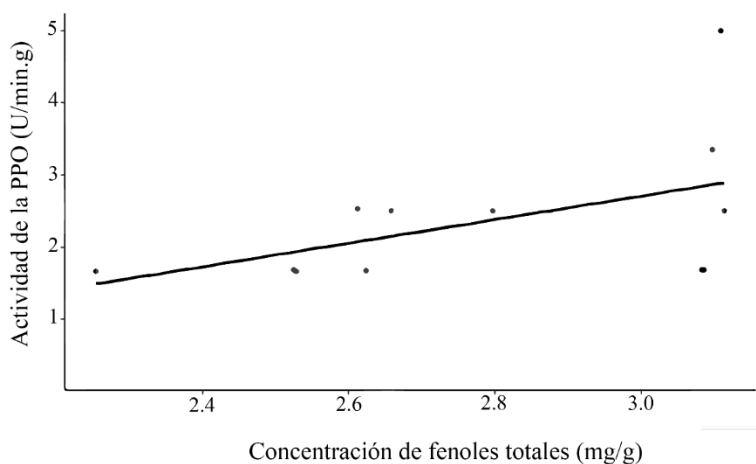


Figura 10. Diagrama de dispersión de la correlación de Pearson entre la actividad de la PPO U/min.g) y la concentración de fenoles totales (mg/g) de los grados de oscurecimientos de los brotes *in vitro* de *B. lako*.

5.4. Cambios anatómicos en el tejido *in vitro* de *B. lako* en respuesta al oscurecimiento

La caracterización histológica mediante la tinción de PAS de las partes distal y medial del grado 1 mostró la presencia de polisacáridos, en este caso reservas energéticas como gránulos de almidón en las células del parénquima (Figura 11a, b, d, e, g y h). No obstante, en la zona basal del brote no se observó la presencia de gránulos de almidón (Figura 11c, f y j). Por otro lado, las tres zonas presentaron tejido vascular distintivos de un tallo de una monocotiledónea y dispersos en el parénquima con señales de diferenciación (Figura 11c-i). De igual manera se observó diferenciación en zonas adyacentes a los haces vasculares (Figura 11d-f). La doble tinción con azul de Coomassie reveló la presencia de proteína en la epidermis, en el parénquima y haces vasculares de las partes distal y medial de tejido; sin embargo, se observa una tinción más marcada en la zona distal del brote en comparación con la zona medial (Figura 11a, b, d, e, g y h).

GRADO 1

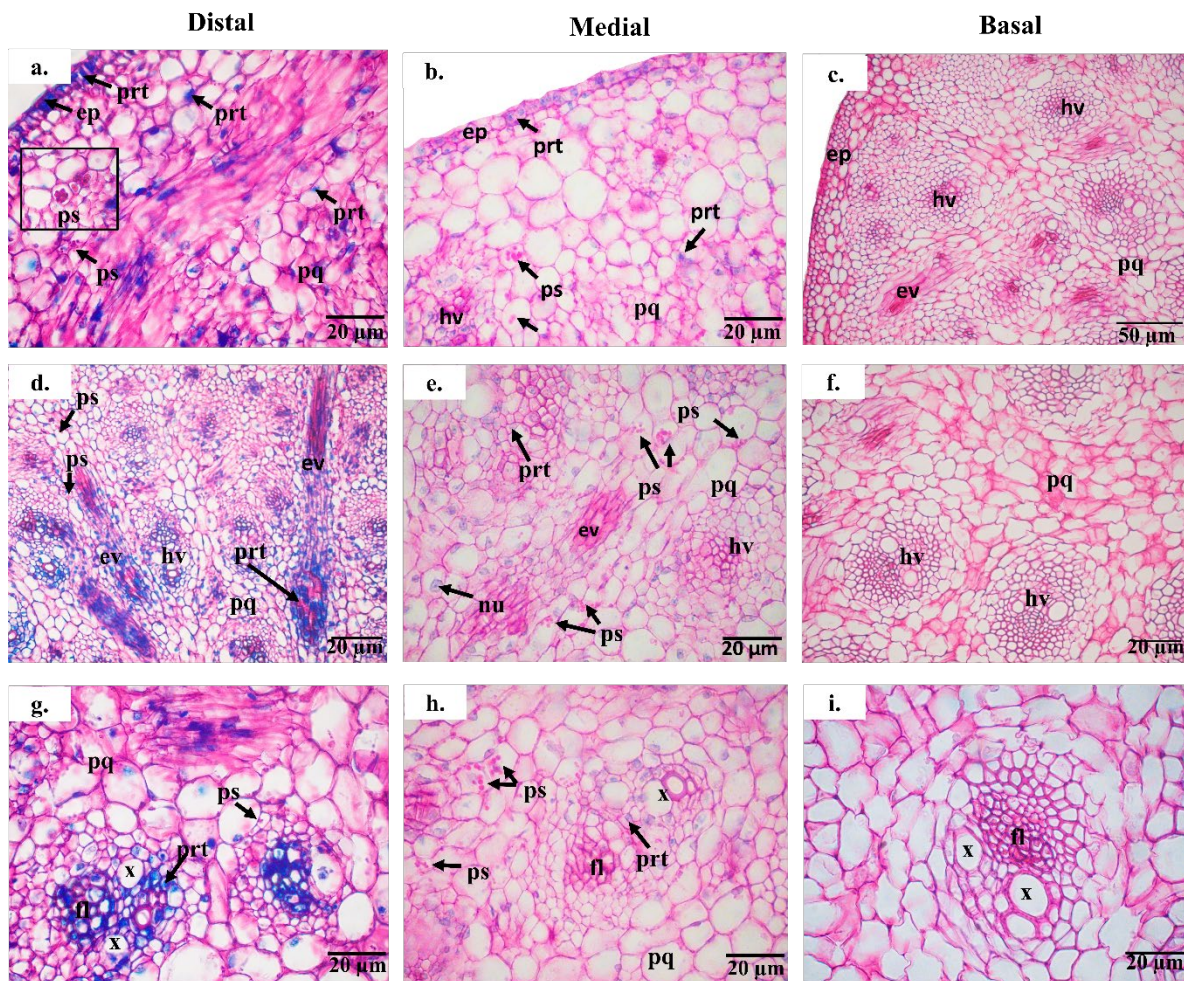


Figura 11. Histología de PAS en secciones transversales de brotes *in vitro* de *B. lako* en grado 1. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. c. f. i. Zona basal de los brotes. a. b. d. e. f. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 μm ; c. escala de barra equivalente a 50 μm . ep: epidermis; prt: proteína; ps: polisacáridos, en este caso gránulos de almidón; pq: parénquima; ev: elementos de los vasos; hv: haces vasculares; nu: núcleo; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.

A diferencia del grado 1, en el grado 2 la tinción de PAS reveló la ausencia de gránulos de almidón en las tres zonas de los brotes (Figura 12a-f). Además, se observó menor tinción de proteína, con respecto al grado 1, en la zona distal del tejido (Figura 12a, d y g). En el caso de la parte distal del tejido, las células del parénquima presentaron una distribución y engrosamiento desigual con respecto a las otras dos áreas del tejido (Figura 12a-c). Se observaron haces vasculares diferenciados a lo largo de los brotes en el grado 2 (Figura 12).

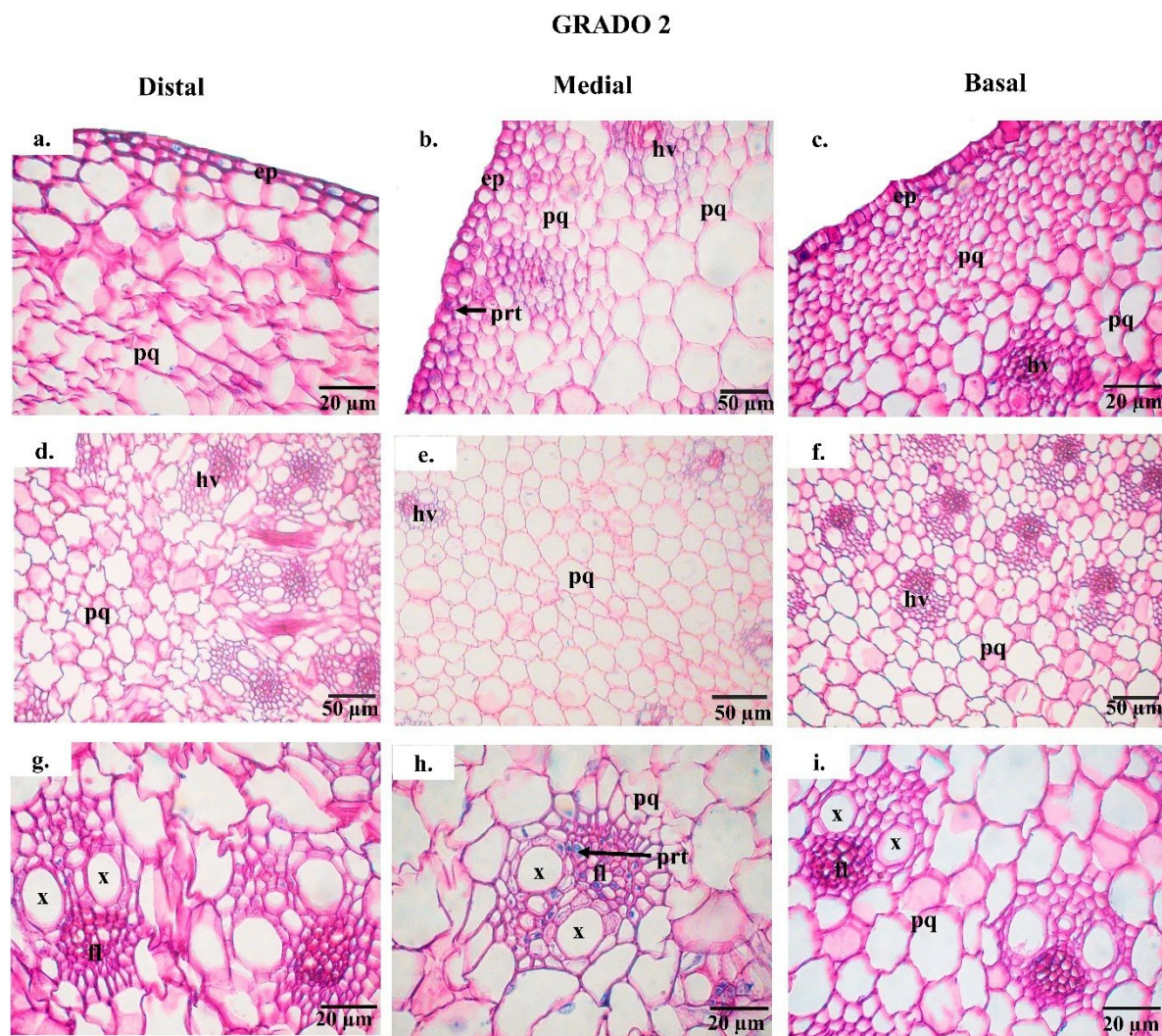


Figura 12. Histología de PAS en secciones transversales de brotes *in vitro* de *B. lako* en grado 2. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. c. f. i. Zona basal de los brotes. a. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 µm; b. d. e. f. escala de barra equivalente a 50 µm. ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; hv: haces vasculares; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.

Por otro lado, el tejido del grado 3 presentó algunas características similares con el grado 2. En las tres zonas del brote se observó ausencia de gránulos de almidón (Figura 13 a, b y c). En la zona distal del tejido se encontró proteína en las células del parénquima, en la epidermis y en los haces vasculares (Figura 13a y g); sin embargo, en las otras dos zonas no se encontró proteína. Se observaron células del parénquima más compactas en el tejido de la parte distal y basal, respecto a la parte medial (Figura 13a-c). Por otro lado, se puede apreciar una distribución de haces vasculares característica a la de un tallo de una monocotiledónea (Figura 13d-f).

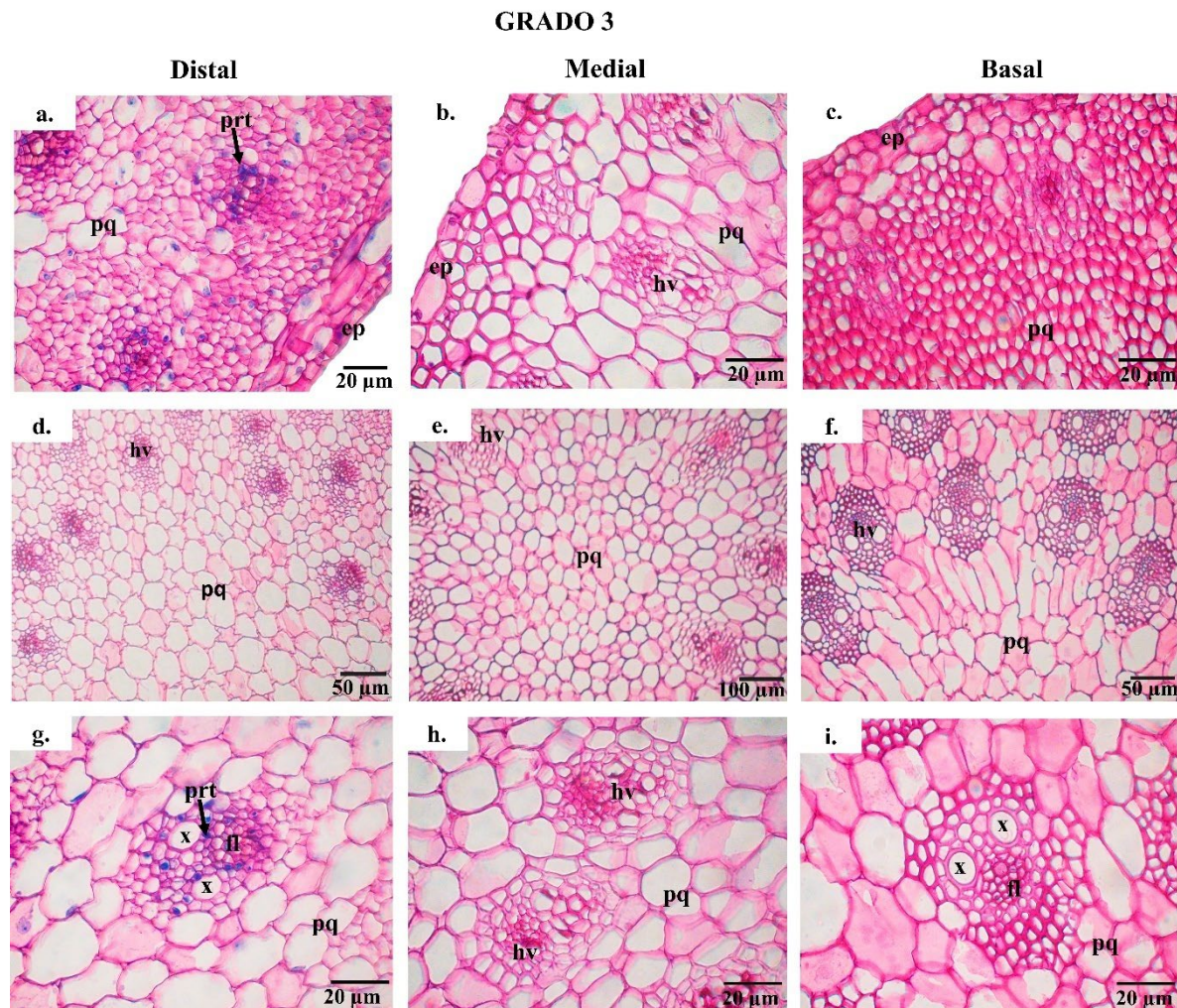


Figura 13. Histología de PAS en secciones transversales de brotes *in vitro* de *B. lako* en grado 3. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. a. b. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 μm ; d. f. escala de barra equivalente a 50 μm . e. escala de barra equivalente a 100 μm . ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; hv: haces vasculares; x: xilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.

Al igual que en el grado 2 y grado 3 la tinción de PAS en las zonas evaluadas de los brotes en grado 4 reveló ausencia de gránulos de almidón. Las células del parénquima de la base del brote no presentaban una apariencia compacta respecto al área distal del brote (Figura 14a y c). La doble tinción con azul de Coomassie mostró la presencia de proteína en las células del parénquima, epidermis y haces vasculares del área distal del brote (Figura 14a y g); sin embargo, en las otras zonas no se encontró proteína.

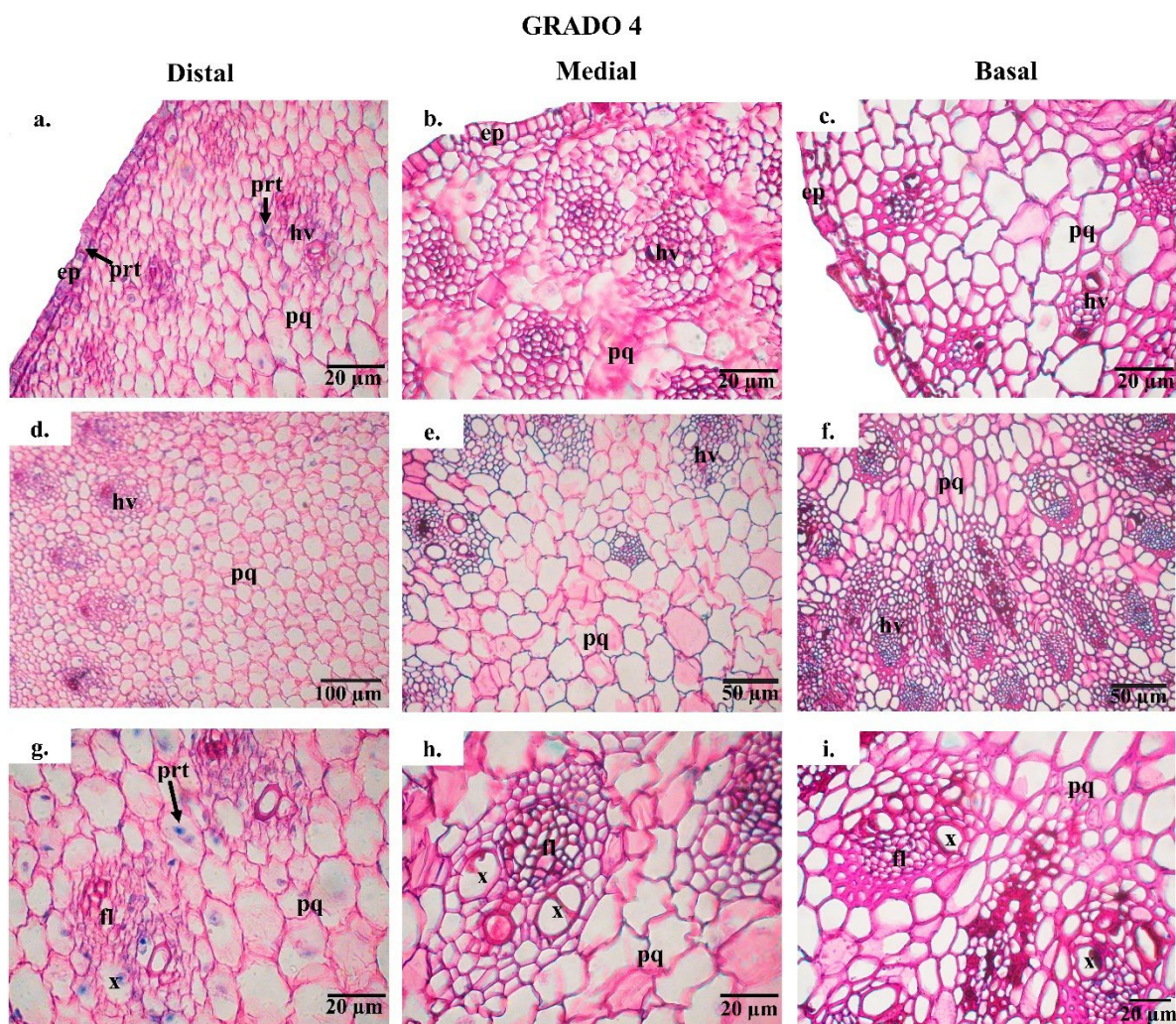


Figura 14. Histología de PAS en secciones transversales de brotes *in vitro* de *B. lako* en grado 4. a. d. g. Zona distal de los brotes. b. e. h. Zona medial de los brotes. a. b. c. g. h. i. escala de barra equivalente a 20 μm ; d. escala de barra equivalente a 100 μm . e. f. escala de barra equivalente a 50 μm . e. escala de barra equivalente a 100 μm . ep: epidermis; prt: proteína; pq: parénquima; ev: elementos de los vasos; hv: haces vasculares; x: metaxilema; fl: floema. Coloración azul indica la presencia de proteína y fucsia la presencia de carbohidratos.

5.5. Localización de polifenoles y H₂O₂ en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Con el fin de localizar los polifenoles en los brotes *in vitro* de *B. lako* se realizó la prueba de Hoepfner-Vorsatz en los cortes del tejido de la zona distal, medial y basal de los distintos grados de oscurecimiento; sin embargo, en la mayoría de las muestras el material vegetal se barrió de los portaobjetos al momento de realizar el aclarado con xilol. A pesar de lo anterior, se logró identificar polifenoles en la zona distal del tejido del grado 2 y en el área basal del grado 3. Se observó que los polifenoles se localizaron en las estructuras de los haces vasculares (Figura 15a y b), los mismos se muestran como una coloración café naranja. En este caso se utilizó como control positivo semilla de frijol de la variedad Brunca. Los compuestos polifenólicos se presentaron en la testa y parte del cotiledón (Figura 15c).

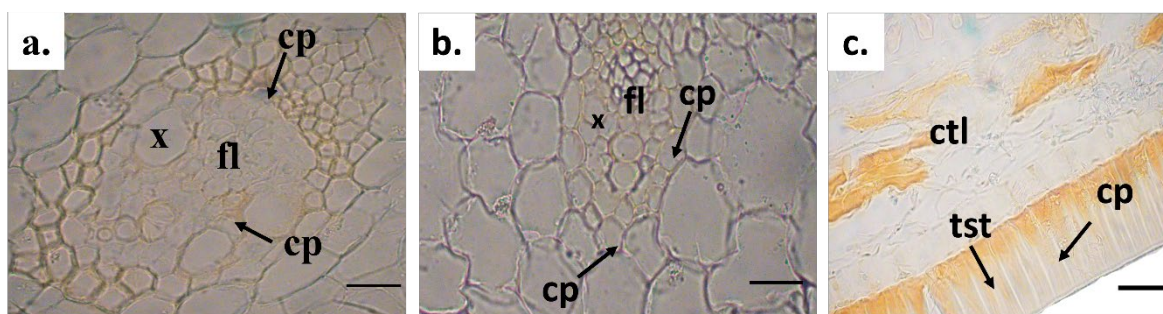


Figura 15. Localización de polifenoles, con la prueba de Hoepfner-Vorsatz en los, a. haces vasculares de la zona distal del brote en grado 2 y b. área basal del brote en grado 3, del tejido de *B. lako*. c. Compuestos polifenólicos presentes en el control positivo (frijol - Brunca); x: xilema; fl: floema; cp; compuesto fenólicos; tst: testa; ctl: cotiledón. Coloración café indica presencia de polifenoles. Barras equivalentes a 20 μ m.

Al utilizar el método con azul de toluidina al 0,5% diluido en agua destilada y previamente incubadas en hipoclorito de sodio, probablemente se localizaron polifenoles en los haces vasculares del área basal del brote en el grado 1, grado 2, grado 3 y en la zona distal del grado 4 los cuales se muestran como una coloración azul más clara. En todos los grados, la presencia de estos metabolitos se observó en el xilema, floema y fibras, además, en los grados 2 y 4 se ubicaron también depositados dentro del floema. El grado 4 presentó una coloración menos intensa respecto a los otros grados (Figura 16a-c).

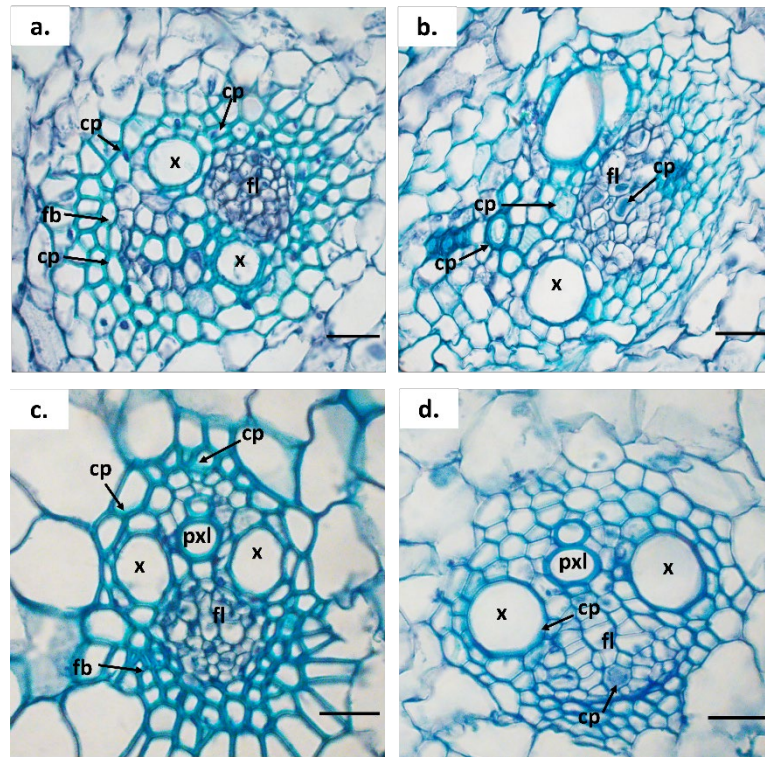


Figura 16. Localización de polifenoles, con la tinción de azul de toluidina, en los haces vasculares del tejido *in vitro* de *B. lako*. a. Grado 1, zona basal del brote; b. Grado 2, zona basal del brote; c. Grado 3, zona basal del brote y d. Grado 4, zona distal del brote. x: xilema; cp; compuestos fenólicos; fl: floema; fb; fibras; pxl: protoxilema. Azul claro muestra la presencia de polifenoles. Cortes transversales de 12-15 μm , barras equivalentes a 20 μm .

Al localizar tanto el H_2O_2 en el tejido de *B. lako* utilizando DAB y una tinción de contraste con Eosina, se identificó de manera tenue una coloración cobriza característica del DAB en los haces vasculares del tejido basal del grado 1 (Figura 17a), del grado 2 (Figura 17b y c), grado 3 (Figura 17d) y grado 4 (Figura 17e) y en la zona distal (Figura 17f) del grado 4. Para esta prueba se utilizó como control muestras de raíces de rábano (Figura 18).

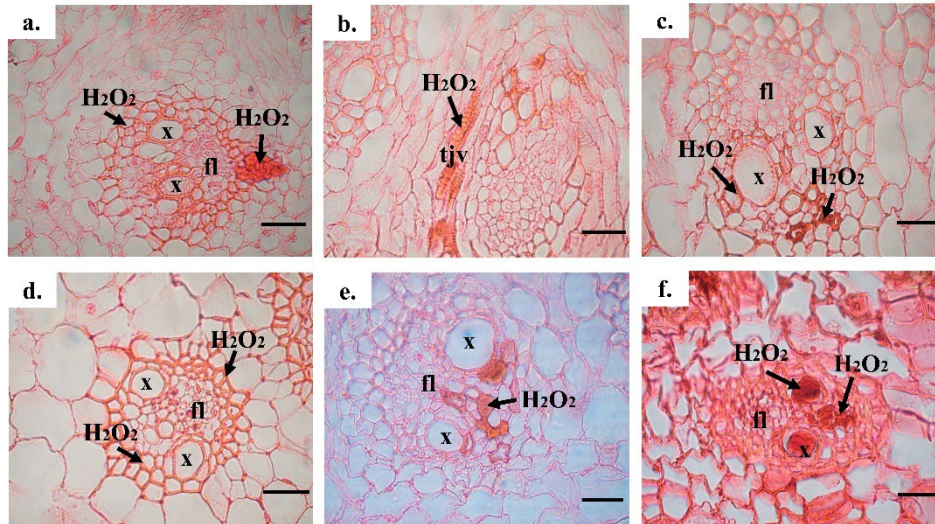


Figura 17. Localización de peróxido de hidrógeno con DAB en los haces y tejidos vasculares de los brotes *in vitro* de *B. lako*. a. Zona basal de brote en grado 1; b. y c. Zona basal de brote en grado 2; d. Zona basal de brote en grado 3; e. y f. Zona basal y zona distal de brote en grado 4, respectivamente. Barras equivalentes a 20 μm . Color cobrizo indica localización de la enzima peroxidasa en el tejido. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; m: xilema; fl: floema; tjv: tejido vascular.

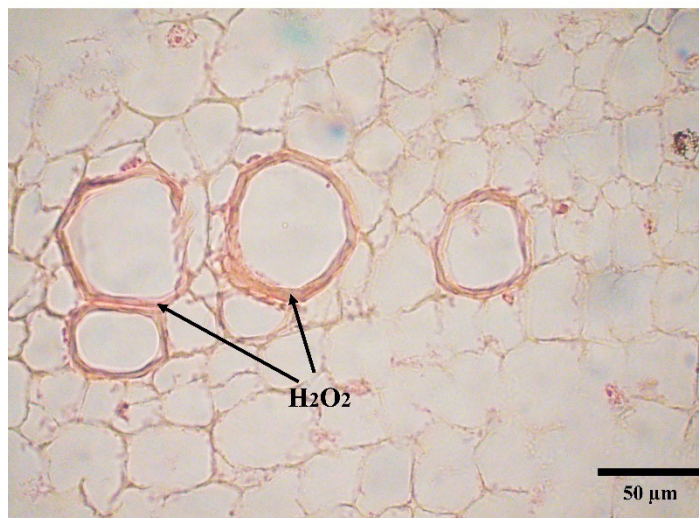


Figura 18. Raíz de rábano, utilizado como control positivo en la prueba de DAB en brotes *in vitro* de *B. lako*. Barra equivalente a 50 μm . Localización de peróxido de hidrógeno indicada en color café: H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

5.6. Efecto del SNP en brotes *in vitro* de *B. lako*

No se observó efecto de la concentración de SNP sobre el porcentaje de brotación ($p = 0,27$) (Figura 19a), el número de brotes ($p = 0,65$) (Figura 19b), ni en la longitud del brote de mayor tamaño ($p = 0,54$) (Figura 19c).

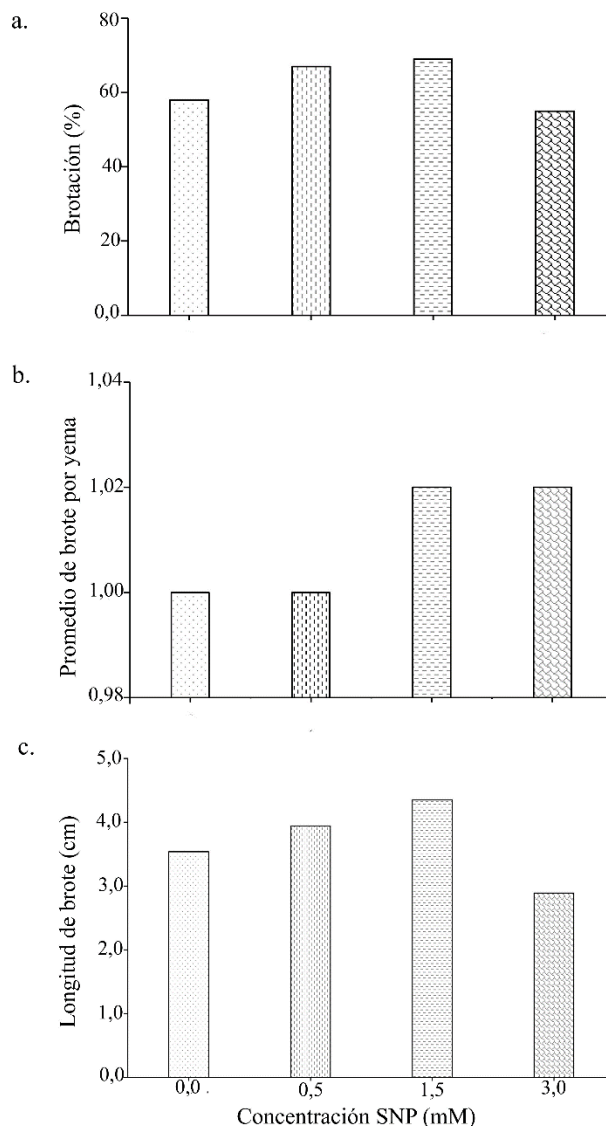


Figura 19. a. Efecto de los diferentes tratamientos de SNP sobre a. la brotación *in vitro* de *B. lako*, según una prueba de Chi cuadrado de Pearson; b. el promedio de brotes por yema, según una prueba de Chi cuadrado de Pearson y c. la longitud del brote más largo luego de dos semanas de cultivo *in vitro* de *B. lako* desde su establecimiento, según una prueba de Tukey. $n=36$ (0 mM), $n= 43$ (0,5 mM), $n= 34$ (1,5mM) y $n= 31$ (3,0 mM).

El oscurecimiento avanzó de manera progresiva, esto se evidenció con la reducción de los brotes de *B. lako* en todos los tratamientos de SNP y el testigo (Figura 20). Los brotes *in vitro* de *B. lako* cultivados en el control evidenciaron oscurecimiento a partir de la tercera semana respecto a los otros tratamientos (Figura 20a), sin embargo, no se reportan diferencias estadísticas ($p = 0,32$), por otro en el tratamiento con 0,5 mM de SNP en la semana cinco presentó una menor cantidad de brotes oscurecidos en comparación a los demás tratamientos y el control (Figura 20b), se reportan diferencias estadísticas ($p = 0,0076$). En cuanto, al experimento de 1,5 mM de SNP los brotes evidenciaron oscurecimiento a partir de la cuarta semana y en la semana siete el 80% de los brotes presentaban oscurecimiento en grado cuatro (Figura 20c) y por último, los brotes en el tratamiento con 3 mM de SNP al igual que el control presentaron oscurecimiento en la tercera semana de cultivo y avanzó de manera exponencial hasta la semana siete (Figura 20d) comportamiento similar en los otros tratamientos y control, no se encontraron diferencias estadísticas ($p = 0,88$).

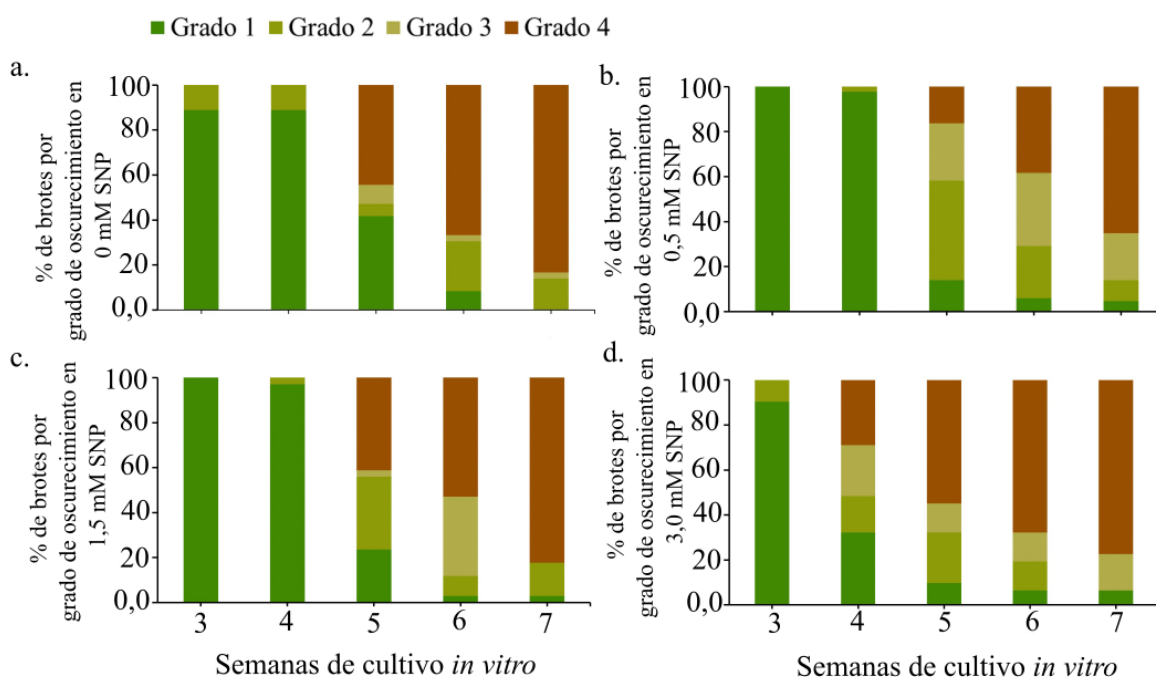


Figura 20. Efecto del SNP sobre el oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako*. a. Porcentaje de explantes de *B. lako* en 0 mM de SNP, b. 0,5 mM de SNP, c. 1,5 mM de SNP y d. 3,0 mM, de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado. Cada color corresponde al grado de oscurecimiento según la escala visual. Se utilizó el siguiente número de réplicas biológicas. 0 mM = 36; 0,5 mM = 43; 1,5 mM = 34; 3 mM = 31.

6. DISCUSIÓN

6.1. Descripción del oscurecimiento en brotes *in vitro* de *B. lako*

El oscurecimiento es un problema común en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, principalmente en plantas leñosas. Aunque existen múltiples estrategias para contrarrestarlo, aún representa una de las principales limitaciones en el cultivo *in vitro* de bambú (Dutta-Mudoi *et al.* 2013; Sandhu *et al.* 2018). Esta problemática se ha reportado en el cultivo *in vitro* de especies del género *Bambusa*, tales como, *B. balcooa* y *B. vulgaris* (Das y Pal 2005; González-González *et al.* 2013). *B. lako* no está exenta de este problema (Zamora-Chacón 2015). El presente estudio mostró que este fenómeno es visible durante el establecimiento del cultivo *in vitro* de *B. lako*, similar a lo observado en *B. balcooa* y *B. vulgaris* (Negi y Saxena 2011b; González-González *et al.* 2013). Los hallazgos de Das y Pal (2005) durante el establecimiento *in vitro* de *B. balcooa* presumen que esto se debe a que, después de la introducción *in vitro*, las yemas axilares con un oscurecimiento severo tienen menor capacidad ante las reacciones de oxidación conllevando a una menor competencia morfogénica. Autores, como Jiménez *et al.* (2021), mencionan que el oscurecimiento puede avanzar en el tejido desde la región apical a la base o viceversa. Para el caso de los brotes de *B. lako* el oscurecimiento avanzó de manera progresiva desde la base hasta la región apical del brote. Al respecto, se ha postulado que este tipo de evolución probablemente está relacionada con la exudación de compuestos fenólicos de la porción basal del brote (Mudoi *et al.* 2014).

En esta investigación se realizó la caracterización del color utilizando los canales de color RGB para brindar más información sobre el estado del oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako* en cada uno de los puntos de la escala de oscurecimiento. Es conocido que el color es utilizado como indicador para evaluar la condición de una planta, ya que durante su desarrollo atraviesa por ciertos procesos fisiológicos asociados con cambios de coloración, como es evidente durante la senescencia y la madurez (Dutta-Gupta *et al.* 2012). Además, utilizar canales RGB para describir el oscurecimiento es utilizado como indicador para determinar la calidad de ciertas plantas de interés comercial. Por ejemplo, se ha reportado que el oscurecimiento generalmente está asociado a reacciones de oxidación, como en el pardeamiento de aceitunas asociado con un incremento en la actividad de la enzima PPO en

la fracción soluble (Ben-Shalom *et al.* 1977). Tomando en consideración el color y la disección del tejido vegetal de *B. lako*, se encontró que el fenómeno aparece primero en los nudos y se extiende en dirección acrópeta. En el estudio de Yu *et al.* (2021), orientado a estudiar los cambios fisiológicos en brotes del bambú *Fargesia yunnanensis* provocados por las bajas temperaturas y almacenamiento, los autores reportan que el oscurecimiento inició en la parte internodal más cercana al nudo y lo asociaron con la presencia de ROS, MDA, fenoles totales y la actividad enzimática. Sin embargo, es necesario mencionar que la investigación de Yu *et al.* (2021) no se realizó en condiciones *in vitro*.

Con respecto al avance del oscurecimiento en dirección acrópeta observado en los diferentes grados presentados en la escala visual de los brotes *in vitro* de *B. lako*, Obsuwan *et al.* (2019) reportaron resultados parecidos a los de este estudio, ya que encontraron que el oscurecimiento en los brotes del bambú tropical *Thyrsostachys siamensis* se extendía de la región basal hasta la apical. Además, al igual que en esta investigación, los brotes se tornaron primero amarillos y posteriormente oscuros. Estudios, como el de Bhat *et al.* (2022), mencionan que este oscurecimiento está asociado a la exudación de compuestos fenólicos en la zona del corte en *Juglans regia* L. También es asociado a factores como, baja movilidad de nutrientes como calcio, el nivel y tipo de regulador de crecimiento, pH del medio, genotipo, momento y frecuencia de subcultivo, entre otros factores (Teixeira-da-Silva *et al.* 2020).

6.2. Optimización de pruebas bioquímicas en brotes *in vitro* de *B. lako*

El ensayo de FC ha sido utilizado para determinar el contenido total de fenoles en el cultivo *in vitro* de algunas especies de bambú, como por ejemplo *Dendrocalamus latiflorus*, *Bambusa oldhamii*, *Phyllostachys nigra* y *Bambusa balcooa* Roxb (Huang *et al.* 2002; Das y Pal 2005). Este método consiste en la reacción del extracto de plantas con el reactivo FC para formar un complejo azul cuantificable mediante espectrometría (Cicco *et al.* 2009). En algunos estudios se ha discutido el efecto que puede tener sobre los resultados la modificación de algunos parámetros, como el volumen final de la mezcla, tiempo de reacción, adición de reactivos, la longitud de onda, la conservación del tejido a bajas temperaturas, entre otros (Cicco *et al.* 2009; Fuente-Maqueda *et al.* 2020). En este estudio,

al evaluar el efecto de la reducción a la mitad de la masa inicial y el volumen del reactivo de extracción (metanol), no se encontraron diferencias estadísticas en la cantidad de PT. Lo anterior nos indica que la relación masa y solvente permite extraer la misma cantidad de polifenoles del tejido, probablemente debido a la interacción de los grupos funcionales de los componentes intracelulares del material vegetal extraídos con el solvente de extracción (Ayele *et al.* 2022).

Debido a la dificultad para macerar el material vegetal de brotes frescos *in vitro* de *B. lako*, fue necesario buscar alternativas para realizar la prueba de la PPO. Una opción fue macerar el tejido fresco con ayuda de un molino de café, tal y como lo realizaron Sommano *et al.* (2017) en *Backhousia myrtifolia* utilizando tallos de aproximadamente 25 cm de largo. La otra opción fue macerar el tejido con nitrógeno líquido, tal y como procedieron Yang *et al.* (2016) para brotes de *Phyllostachys praecox* f. *prevernalis*. Los resultados de este estudio muestran que el método de maceración no tuvo efecto sobre la actividad enzimática de la PPO; sin embargo, se encontraron diferencias al almacenar el tejido a -80°C , dependiendo del método de maceración empleado.

Para el caso del tejido macerado con nitrógeno líquido, la actividad enzimática de la PPO en los brotes de *B. lako* mostraron mayor estabilidad. Se ha mencionado que la pulverización por congelación con nitrógeno líquido es muy utilizada debido a la rápida vaporización del nitrógeno líquido, por su alto coeficiente en la transferencia de calor y tiempo corto de congelación (Zhu *et al.* 2020). Por otro lado, es conocido que una congelación en nitrógeno líquido evita la formación de grandes cristales de hielo, contribuye a conservar la integridad celular y evita la pérdida de la actividad de la PPO por el empleo de bajas temperaturas, tal como citan Wesche-Ebeling y Montgomery (1990). Por su parte, es posible que el tejido molido sin nitrógeno líquido (molino de café) se haya sometido a un alto estrés térmico y se haya liberado más enzima o quizás, al ser un ensayo discontinuo, la reacción no se detuvo antes de calentarla a temperatura ambiente para determinar los niveles de sustrato o producto y, por ende, se obtuvieron índices erróneamente altos, tal como lo señalan Zhu *et al.* (2020). Debido a la variabilidad en la actividad enzimática de la PPO en muestras no congeladas con nitrógeno líquido, para fines de este estudio, se optó por realizar el ensayo almacenando las muestras, previamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C .

En cuanto al MDA, al determinar el efecto de la reducción de la masa y el solvente en la cuantificación, se encontraron diferencias estadísticas. Probablemente este resultado se relacione a la interferencia de otros compuestos, como carbohidratos, presentes en el tejido vegetal. La prueba TBA para la determinación de MDA como método para la evaluación de la peroxidación lipídica en plantas tiene dificultades, como su baja especificidad de reacción y la absorción de otras moléculas (Taulavuori *et al.* 2001; Davey *et al.* 2005), por lo que se pueden sobreestimar las cantidades de MDA en los análisis (Davey *et al.* 2005). Aunque en la literatura se recomienda utilizar métodos más sensibles y con mayor especificidad, como cromatografía de alta resolución (Hodges *et al.* 1999), el análisis por MDA es muy utilizado debido a su bajo costo y rapidez (Davey *et al.* 2005).

6.3. Determinación del contenido de PT, actividad enzimática de la PPO y MDA en brotes *in vitro* de *B. lako* según la escala de oscurecimiento

Con frecuencia, el oscurecimiento *in vitro* se ha relacionado estrechamente con la acumulación de fenoles y a su polimerización enzimática, principalmente cuando se producen daños mecánicos en el tejido (Das y Pal 2005), aunque la concentración de fenoles puede variar entre especies y cultivares (Huang *et al.* 2002; Leccese *et al.* 2012). Se ha mencionado que el grado de oscurecimiento está ligado con el contenido fenólico y la reacción es atribuida al estrés causado por las condiciones *in vitro*, ya que en algunos estudios se ha reportado la acumulación de flavonoides como respuesta de defensa al oscurecimiento *in vitro* (Lee y Jaworski 1988; Murata *et al.* 1995; Wang *et al.* 2016; Yang *et al.* 2022).

De acuerdo con los resultados experimentales de este estudio, se reporta un aumento en la cantidad total de polifenoles en los brotes *in vitro* de *B. lako* a medida en que avanza el oscurecimiento, así como un aumento gradual de la PPO. Estos resultados son parecidos a los reportados por Xu *et al.* (2015), quienes manifiestan que el aumento en la cantidad de PT y la actividad de la PPO es consistente con el grado de oscurecimiento en el tejido *in vitro* de *Phalaenopsis*. Asimismo, Leng *et al.* (2009) correlacionaron el contenido total de polifenoles en pistacho con la severidad del oscurecimiento en los brotes; sin embargo, no encontraron cambios en la actividad de la PPO. Se encontró en este estudio una correlación positiva entre la concentración de fenoles y la actividad de la PPO en los grados de oscurecimiento de los brotes *in vitro* de *B. lako*. Estos hallazgos son similares a estudios que han indicado que el

aumento de la actividad de la PPO tiene una relación con el incremento en la concentración de compuestos polifenólicos ($R^2 = 0,66$) Sen y Alikamanoglu (2013). Además, se puede considerar que el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* está ligado a los niveles de expresión de la enzima, o bien tomar en consideración que, aunque los polifenoles actúan como potenciadores de la actividad enzimática, es probable que no todos sean polimerizados por la PPO o bien puede estar estrechamente relacionado a la afinidad de la PPO por sustratos específicos de polifenoles y no a la cantidad de estos compuestos, tal y como se ha mencionado con anterioridad (Wang *et al.* 1991; Derardja *et al.* 2022), esto puede explicar que la actividad de la PPO en el grado 2 y grado 3, no presentaran diferencias significativas entre ellos ni con los grados 1 y 4, situación contraria a lo observado entre estos últimos, donde la actividad fue mayor en el grado 4. Es por ello, que en futuros estudios se podría tomar en cuenta realizar un perfil de fenoles individuales para determinar los sustratos endógenos y tener un acercamiento al tipo de PPO presente en el tejido. Por último, también puede asociarse a la variabilidad de pigmentos verdes, oscuros y cloróticos encontrados a lo largo de los brotes en los grados 2 y 3. Esto concuerda con lo indicado por Laukkanen *et al.* (1999), quienes atribuyen la variabilidad de la actividad enzimática de la PPO en tejido *in vitro* de *Pinus sylvestris* a las coloraciones café, amarillas y verdes presentes en las muestras.

El MDA es un producto de la peroxidación lipídica involucrado en el estrés oxidativo, y ha sido utilizado para determinar el grado de peroxidación lipídica e integridad de la membrana celular en plantas micropropagadas (Das y Roychoudhury 2014; Talla *et al.* 2022). En este estudio se reporta un incremento de MDA desde el grado 1 hasta los grados 3 y 4. Este aumento en la concentración de MDA a medida en que avanza el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* es posible que indique una presencia elevada de ROS y que probablemente estén causando daños en las funciones celulares y la muerte del tejido por oscurecimiento debido a la interferencia sobre proteínas, lípidos, ADN entre otras biomoléculas (Dan 2008). Además, resultados como los de Sen y Alikamanoglu (2013) reportan una relación positiva entre la cantidad de MDA y PPO ($R^2 = 0,059$), por lo que ROS, como el H_2O_2 , estén promoviendo que enzimas como la PPO entren en contacto con sus sustratos fenólicos y los oxide dando como resultado pigmentos marrones (Yu *et al.* 2021). Por otro lado, el MDA al ser un marcador biológico de la peroxidación lipídica se sugiere que su aumento reduce la capacidad de regeneración en el tejido de *B. lako*, tal y como lo mencionan Laukkamen *et al.*

(2000) en su estudio sobre los cambios estructurales enzimáticos durante el oscurecimiento de callos de *Pinus silvestris*.

6.4. Cambios anatómicos en el tejido *in vitro* de *B. lako* en respuesta al oscurecimiento

Las observaciones histológicas en los diferentes grados de oscurecimiento lograron identificar una alta integridad estructural en los brotes verdes (grado 1), ya que presentaron señales de diferenciación en células del parénquima y células adyacentes a los haces vasculares. Esto era de esperarse, ya que los brotes no presentaban oscurecimiento. El estudio histológico también reveló la presencia de haces vasculares desarrollados que consisten en xilema y floema distribuidos en el tejido. Se sugiere que esto es un indicador de un buen desarrollo en los grados 1 y 2, lo cual concuerda con lo mencionado al respecto por Yang *et al.* (2022). En cuanto, a la presencia de almidón en células del parénquima en el grado 1 y la presencia de proteína en el tejido vascular, pared celular y en células del parénquima en todos los estadios de oscurecimiento, se ha mencionado que la actividad biológica en brotes de bambú consume una considerable cantidad de energía proveniente de la degradación de almidones y proteínas para su crecimiento (Yu *et al.* 2021). Es probable que la cantidad de almidón en los brotes verdes, la ausencia de este y una reducción de la proteína en los grados 2, 3 y 4 esté asociada a la disminución de la actividad metabólica en el tejido ocasionado por el oscurecimiento y subsecuentemente la muerte del tejido, tal como señalan Yu *et al.* (2021) y Galuszka *et al.* (2019), por lo que la acumulación de proteína en la zona distal esté relacionada con una alta actividad metabólica de las células ahí localizadas (Fisher 1968). Por otro lado, con respecto a la acumulación de carbohidratos, Yang *et al.* (2022) sugieren que una menor cantidad de granos de almidón es sinónimo de una carencia de recursos energéticos para el crecimiento y por consecuencia la pérdida de totipotencia en las células morfogénicamente competentes.

6.5. Localización de polifenoles y H₂O₂ en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Según la prueba de Hoepfner-Vorsatz los polifenoles se localizaron en los haces vasculares del tejido *in vitro* de *B. lako* en los diferentes grados de oscurecimiento. Por lo tanto, en este estudio se sugiere que la acumulación de polifenoles produce un bloqueo en los haces vasculares y por ende afecta la absorción de agua, minerales y nutrientes del medio y, subsecuentemente, provoca la muerte de los brotes *in vitro* de *B. lako*. Esto es concordante

con lo discutido en estudios previos de Xu *et al.* (2015) y Wang *et al.* (2016). En algunos estudios se ha mencionado que el tejido *in vitro* afectado por el oscurecimiento acumula más taninos en comparación con el tejido verde (Yang *et al.* 2022); sin embargo, se necesita realizar más investigación para relacionar la acumulación de taninos en el oscurecimiento del tejido de *B. lako*). Por otro lado, la tinción de azul de toluidina es ampliamente utilizada para resaltar componentes celulares, incluyendo polifenoles, paredes celulares lignificadas y no lignificadas, suberinas y taninos, por lo que se pueden obtener diversas tonalidades de color azul (Retamales y Scharaschkin, 2014), en este caso quizás también se esté delimitando el tejido lignificado en los haces vasculares.

En cuanto a la localización de ROS, como el H_2O_2 se encontró en los haces vasculares, tanto en el xilema como en el floema, resultados parecidos a los de Bestwick *et al.* (1997). Se ha reportado que el H_2O_2 desempeña un papel como señal de muerte celular y de la inducción de genes defensivos en células adyacentes en las plantas (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001). Por otro lado, análisis de correlación han reportado que los niveles de H_2O_2 se asocian con la actividad de la POD (Wang *et al.* 2021). Es conocido que la actividad de la PPO promueve la actividad de la POD por la generación de H_2O_2 a través de la oxidación de compuestos polifenólicos (Zhang y Shao 2015), y, por lo tanto, puede participar en el oscurecimiento del tejido. Sin embargo, se necesita más investigación para determinar si esta enzima está involucrada en el proceso de oscurecimiento de los explantes *in vitro* de *B. lako*. De igual manera, sería interesante en futuros estudios localizar la PPO, ya que Xu *et al.* (2015) la reportan localizada en los haces vasculares del tejido vegetal. Para ello, realizaron un estudio basado en el análisis de distribución de ARNm y de la proteína de la PPO en etapas tempranas de oscurecimiento en explantes *in vitro* de *Phalaenopsis*. Asimismo, al localizar la PPO mediante microscopía electrónica de barrido también se reporta su presencia en células de los haces vasculares (Onsa *et al.* 2000; Xu *et al.* 2015).

Dado que existe una localización de polifenoles y presencia de ROS como H_2O_2 principalmente localizados en los haces vasculares, como se mencionó antes probablemente se vean afectadas funciones de soporte mecánico, transporte de agua y nutrientes y comunicación entre los diferentes órganos debido al bloqueo de los haces vasculares. En estudios como los de Orozco-Cárdenas *et al.* (2001) se ha manifestado que la acumulación

de H₂O₂ se genera o se produce en exceso en respuesta a heridas en las paredes celulares de las células del haz vascular transportándolo en el agua a través del apoplasto y difundirse en células adyacentes.

6.6. Efecto del SNP en los brotes *in vitro* de *B. lako*

Se ha informado que el SNP actúa como donante de NO, una molécula bioactiva en estado gaseoso y que está involucrada en la transducción de señales en plantas sometida a estrés (Arasimowicz y Floryszak-Wieczorek 2007). Asimismo, en la literatura se menciona que el SNP promueve la multiplicación y regeneración de plántulas de *Dioscorea opposita* y *Valeriana jatamansi*. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el SNP mejora las tasas de multiplicación no se conocen a detalle (Xu *et al.* 2009; Pandey *et al.* 2020). En este estudio se encontró que el SNP no produjo un efecto en los parámetros de crecimiento, como la inducción de brotación, el número de brotes y la longitud del brote en el cultivo *in vitro* de *B. lako*. Esto contrasta con Karthik *et al.* (2019), quienes manifiestan que el SNP tuvo un impacto positivo en cuanto a la inducción, proliferación y el alargamiento de brotes en soya. Aunque se ha expresado que el SNP tiene mayor efecto en la propagación *in vitro* al combinarse con citoquininas derivadas de la adenina, como la benciladenina (Tan *et al.* 2013; Karthik *et al.* 2019). En el presente trabajo, la citoquinina empleada fue una difenilurea sustituida, thidiazuron, y no se observó un aumento en la capacidad de regeneración en brotes *in vitro* de *B. lako*.

En otras investigaciones también se ha expresado que el SNP como donador de NO actúa como antioxidante para reducir los niveles de toxicidad de H₂O₂ dado que disminuye la actividad de enzimas como catalasa, POD y PPO, las cuales, como se ha venido mencionando, están relacionadas con el oscurecimiento en el cultivo de tejidos (Hesami *et al.* 2018; Xu *et al.* 2009). Sin embargo, los resultados de esta investigación muestran que el SNP no redujo el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako*. Es probable que estos hallazgos sean diferentes a los reportados en la literatura, dado que el efecto del SNP es dependiente del genotipo, tal y como lo indican Sarropoulou *et al.* (2014).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

En conclusión, este estudio contribuye a comprender y caracterizar el proceso del oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* y algunos factores que podrían estar participando en su manifestación. Se reporta un aumento de la actividad de la PPO, contenido de FT y MDA desde que los brotes estaban verdes hasta que se encontraban completamente oscuro. Estos resultados revelan que el oscurecimiento en los brotes *in vitro* de *B. lako* probablemente esté relacionado con la respuesta al estrés oxidativo provocado por las condiciones *in vitro*. Aunque estos resultados pueden ser diferentes en otras especies de bambú con problemas de oscurecimiento. Por otro lado, en este estudio se evidenció la presencia de polifenoles en los haces vasculares lo que probablemente esté provocando un bloqueo en el tejido vascular e impidiendo la absorción de nutrientes y agua y, consecuentemente, conlleve al oscurecimiento y a la inminente muerte del tejido. El estudio anatómico en el tejido *in vitro* de *B. lako* reveló que el tejido de los brotes verdes o en grado 1 presentan reservas energéticas, como los gránulos de almidón, y la mayor acumulación de proteína en la parte distal de los brotes. En cambio, en los grados 2, 3 y 4 no se reportan estos mismos hallazgos. Se puede decir que quizás exista una disminución en el potencial de regeneración y reducción de la actividad metabólica a medida en que se oscurece el tejido. Por otro lado, la posible interacción entre el H_2O_2 y la POD quizás sea un indicador de la participación de esta enzima en el oscurecimiento; sin embargo, se necesita más investigación, aunque es necesario mencionar que la tinción del DAB fue tenue; esto probablemente esté relacionado con el tiempo de incubación de las muestras con DAB. No se reporta un efecto positivo del SNP en los brotes *in vitro* de *B. lako* ni en parámetros de crecimiento ni de oscurecimiento. Por último, debido a la poca literatura sobre el cultivo *in vitro* de *B. lako*, este estudio representa una fuente de información que describe la problemática del fenómeno de oscurecimiento en el cultivo *in vitro* de esta especie.

8. RECOMENDACIONES

Sumado a lo anterior, sería interesante analizar el perfil individual de los compuestos fenólicos para tener una idea de los sustratos presentes en el tejido y la afinidad de la PPO. En adición a esto, es recomendable cuantificar la cantidad de MDA utilizando métodos más sensibles y específicos como el HPLC. De igual manera, para hacer un estudio más integro, se podrían evaluar tinciones específicas de compuestos fenólicos, como taninos, o bien realizar un estudio histológico con microscopía electrónica de barrido. Por otro lado, hasta donde se sabe, no existe un estudio que integre análisis transcriptómico y metabolómico para comprender el oscurecimiento en el tejido *in vitro* de *B. lako*. De esta manera se podría encontrar genes relacionados a alguna ruta metabólica cuyo efecto tenga un impacto en las funciones biológicas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abohatem, M; Zouine, J; Hadrami, IE. 2011. Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae*. 130(1):344-348.
- Adams, LK; Benson, EE; Staines, HJ; Bremner, DH; Millan, S; Deighton, N. 1999. Effects of the lipid peroxidation products 4-hidroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of *in vitro* plant cells. *Journal of Plant Physiology* 155:376-386.
- Ainsworth, EA; Gillespie, KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2:875-877.
- Akinlabi, ET; Anane-Fenin, K; Akwada, DR. 2017. Regeneration, cultivation, and sustenance of bamboo. In: *Bamboo the Multipurpose Plant*. Springer, Cham, Suiza. pp. 39-86.
- Ali, G; Ali-akbar, M; Nasser, G. 2017. Mitigation by sodium nitroprusside of the effects of salinity on the morpho-physiological and biochemical characteristics of *Rubus idaeus* under *in vitro* conditions. *Physiology and Molecular Biology Plants* 23(1):73-83.
- Amiot, M; Forget, F; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica* 42: 237-247.
- Arasimowicz, M; Floryszak-Wieczorek, J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172(5):876-887.
- Arun, Muthukrishnan; Naing, AH; Jeon, SM; Ai, TN; Aye, T; Kim, CK. 2017. Sodium nitroprusside stimulates growth and shoot regeneration in chysanthemum. *Horticuture, Environment, and Biotechnology* 58(1):78-84.
- Ayele, DT; Akele, ML; Melese, AT. 2022. Analysis of total phenolic contents, flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Croton macrostachyus* root extracts. *BMC Chemistry* 16, 30.
- Azis, E; Batool, R; Akhtar, W; Rehman, S; Gregersen, PL; Mahmood, T. 2019. Expression analysis of the polyphenol oxidase gene in response to signaling molecules, herbivory and wounding in antisense transgenic tobacco plants. *3 Biotech* 9:55.

- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175.
- Balen, B;Tkalec, M; Pavoković, D; Pevalek-Kozlina, B; Krsnik-Rasol, M. 2009. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(1): 36-45.
- Bamboo Phylogeny Group (BPG). 2012. An updated tribal and subtribal classification of the bamboo (Poaceae: Bambusoideae). World Bamboo Congress. (9, 2012, Antwerp, Belgium).
- Banik, LR. 1995. A manual for vegetative propagation of bamboos. INBAR Technical Report. Canadá. p. 66.
- Ben-Shalom, N; Kahn, V; Harel, E; Mayer, A. 1977. Olive catechol oxidase. Changes during fruit development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28:545-550.
- Benavides-Acevedo M and Torres-Segura J (2022) Fast seed histology protocols: Benzene derivatives-free vs xylene-dependent. *Agronomía Mesoamerica* 33:51308.
- Bestwick, CS; Brown, IR; Bennett, MHR; Mansfield, JW. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell* 9:209-221.
- Bhat, SZ; Khalil, A; Nazir, N; Mir, MA; Khan, I; Mubashir, SS; Dar, MS; Wani, SH; Hossain, MA. 2022. In vitro prevention of browning in Persian Walnut (*Juglans regia* L.) cv. Sulaiman. *International Journal of Plant Biology* 13:330-342.
- Bisht, P; Pant, M; Kant, A. 2010. *In vitro* propagation of *Gigantochloa atroviolaceae* Widjaja through nodal explants. *Journal of American Science* 6:1019-1026.
- Chu, C. 1963. The application of PAS reaction as a stain technique in plant histology. *Acta Botanica Sinica*. 11:155-164.
- Cicco, N; Lanorte, MT; Paraggio, M; Viggiano, M; Lattanzio, V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91(1):107-110.
- Crawford, NM; Guo, FQ. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science* 10(4):195-200.
- Crozier, A; Jaganath, IB; Clifford, MN. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Report* 8:1001-1043.

- Dalal, MA; Sharma, BB; Rao, MS. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Horticulturae* 51(1-2):35-41.
- Dan, Y. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44:149-161.
- Das, K; Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:53.
- Das, M; Pal, A. 2005. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(1):109-112.
- Davey, MW; Stals, E; Panis, B; Keulemans, J; Swennen. 2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry* 347(2):201-207.
- Derardja, AE; Pretzler, M; Kampatsikas, I; Radovic, M; Fabisikova, A; Zehl, M; Barkat, M; Rompel, A. 2022. Polyphenol oxidase and enzymatic browning in apricot (*Prunus armeniaca* L.): Effect on phenolic composition and deduction of main substrates. *Current Research in Food Science* 5:196-206.
- Dransfield, J. 1981. The biology of Asiatic rattans in relation to the Rattan Trade and Conservation. In Syngé, H (Ed.). *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*. London. p. 179-186.
- Dransfield, J; Widjaya, EA. 1995. *Plant Resources of South–East Asia no.7, Bamboos*, Buku, Prosea, Bogor. p.189.
- Durán, N; Rosa, MA; D’Annibale, A; Gianfreda, L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31(7):907-931.
- Dutta-Gupta, S; Ibaraki, Y; Pattanayak, AK. 2012. Development of a digital image analysis method for real-time estimation of chlorophyll content in micropropagated potato plants. *Plant Biotechnology Reports* 7:91-97.

- Dutta-Mudoi, K; Proteem-Saikia, S; Goswami, A; Gogoi, A; Bora, D; Borthakur, M. 2013. Micropropagation of important bamboos: a review. *African Journal of Biotechnology* 12(20):2770-2785.
- Elwers, S; Zambrano, A; Rohsius, C; Lieberei, R. 2010. Histological features of phenolic compounds in fine and bulk cacao seed (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83:182-188.
- Fisher, DB. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92-96.
- Foyer, CH; Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 861-905.
- Fuente-Maqueda, F; Rodríguez, A; Majada, J; Fernández, B; Feito, I. 2020. Methodology optimization for the analysis of phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Food and Science and Technology International* 26(6): 520-534.
- Gałaszka, A; Gustab, M; Tuleja, M. 2019. In vitro morphogenetic responses from obligatory apomictic *Taraxacum belorussicum* Val. N. Tikhom seedlings explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 139:505–522.
- García-Ramírez, Y; Freire-Seijo, M; Pérez, B; Hurtado, O. 2011. Propagación *in vitro* de bambúes. *Biotecnología Vegetal* 11(3):131-142.
- George, EF; Debergh, PC. 2008. Micropropagation: uses and methods. In George, EF; Hall, MA; De Klerk, GJ (eds). *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition. Springer, New York, Estados Unidos. p. 29-64.
- Gielis, J; Oprins, J. 2002. Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos - from biotechnological dream to commercial reality. In: *Bamboo for sustainable development. Proceedings of the 5th International Bamboo Congress and the 6th International Bamboo Workshop*. San José, Costa Rica. 333-344 p.
- González-González, M; García-Ramírez, Y; Quialda, E; La O, M; Roque, B; Mena, E; Hurtado, O; Freire-Seijo, M. 2013. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland. *Biotecnología Vegetal* 13(1):33-39.
- Grosser, D; Liese, W. 1971. On the anatomy of Asian bamboo, with special reference to their vascular bundles. *Wood Science and Technology* 5:290-312.

- Hesami, M; Tohidfar, M; Alizadeh, M; Hosein-Daneshvar, M. 2018. Effects of sodium nitroprusside on callus browning of *Ficus religiosa*: an important medicinal plant. *Journal of Forestry Research* 31:789-796.
- Hodges, MD; DeLong, JM; Forney, CF; Prange, RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611.
- Holderbaum, DF; Kon, T; Kudo, T; Guerra, MP. 2010. Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience* 45(8):1150-1154.
- Huang, LC; Lee, YL; Huang, BL; Kuo, CI; Shaw, JF. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 38(4):358-365.
- Jafari, M; Daneshvar, MH. 2019. Effects of sodium nitroprusside on indirect shoot organogenesis and in vitro root formation of *Tagetes erecta*: an important medicinal plant. *Journal of Applied Sciences* 5(3):14-19.
- Jayabalan, M; Shah, JJ; Rajarathinam, K; Veerasamy, S. 1995. Histochemical localization of oxidases in *Parthenium argentatum*. *Phytomorphology* 45:9-14.
- Jégou, L. 2013. Color proportions of an image. Université de Toulouse-Le Mirail. Consultado el 6 de diciembre de 2022. https://www.geotests.net/couleurs/frequences_en.html#ce
- Jiménez, VM; Castillo, J; Tavares, E; Guevara, E; Montiel, M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:389-395.
- Jiménez, VM; Guevara, E. 2007. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In Jain, SM; Häggman, H (eds.). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Países Bajos. p.465-476.
- Jiménez, VM; Holst, A; Carvajal-Campos, P; Guevara, E. 2021. Standard protocols for *in vitro* propagation of bamboo with emphasis on axillary shoot proliferation. In Ahmad, Z; Ding, Y; Shahzad, A. (eds.). *Biotechnological Advances in Bamboo*. Springer, Singapore. p. 63-84.

- Judziewicz, EJ; Clark, LG; Londoño, X; Stern, MJ. 1999. American Bamboos. Washington-Londres, Smithsonian Institution Press. 398 p.
- Karthik, S; Pavan, G; Krishnan, V; Manickavasagam, M. 2019. Sodium nitroprusside enhances regeneration and alleviates salinity stress in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 19:101173.
- Khan, MN; Mobin, M; Abbas, ZK; Siddiqui, MH. 2017. Nitric oxide-induced synthesis of hydrogen sulfide alleviates osmotic stress in wheat seedlings through sustaining antioxidant enzymes, osmolyte accumulation and cysteine homeostasis. *Nitric Oxide* 68:91-102.
- Lantican, CB. 2009. Bamboo propagation: practical experiences of some private nursery operators in Laguna, Philippines. VIII World Bamboo Congress Proceedings. Thailand. pp. 6-15.
- Laukkanen, H; Rautiainen, L; Taulavuori, E; Hohtola, A. 2000. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20:467-475.
- Laukkanen, H; Häggman, H; Kontunen-Soppela, S; Hohtola, A. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum* 106(3):337-343.
- Leccese, A; Bartolini, S; Viti, R. 2012. From genotype to apricot fruit quality: The antioxidant properties contribution. *Plant Foods for Human Nutrition* 67:317-325.
- Lee, CY; Jaworski, AW. 1988. Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture* 39:337-340.
- Leng, P; Su, S; Wei, F; Yu, F; Duan, Y. 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta Horticulturae* 829:127-132.
- Liese, W. 1987. Research on bamboo. *Wood Science and Technology* 21:189-209.
- Liese W. 1998. The anatomy of bamboo culms. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). New Delhi, India. 15 p.
- Liese, W. 2001. Advances in bamboo research. *Journal of Nanjing Forestry University* 25(4):1-6.

- Lieurance, D; Cooper, A; Young, AL; Gordon, DR; Flory, SL. 2018. Running bamboo species pose a greater invasion risk than clumping bamboo species in the continental United States. *Journal for Nature Conservation* 43:39-45.
- Loh, JP; Kiew, R; Set, Ohn; Gan, LH. 2000. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism. *Annals of Botany* 5(85):607-612.
- Londoño, X. 1990. Estudio botánico, ecológico, silvicultura y económico-industrial de las Bambusoideae de Colombia. *Cespedesia* 16:51-778.
- Londoño, X. 2002. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo. Maestría en Construcción – Módulo Guadua. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
- MacAdam, JW; Nelson, CJ; Sharp, RE. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology* 99:872-878.
- Mansoor, J; Ali-Wani, O; Solitario, JK; Manhas, D; Kour, N; Derecho, A; Ahmad, A; Ahmad, P. 2022. Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants* 11(2):225.
- Martínez-Torres, JM. 2020. Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* (bambú), a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. 128 p.
- Merbs, SL; Nathans, J. 1992. Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* 356:433-435.
- Melvin, P; Bankapalli, K; D’Silva, P; Shivaprasad, PV. 2017. Methylglyoxal detoxification by a DJ-1 family protein provides dual abiotic and biotic stress tolerance in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 94:381-397.
- Mittler, R; Vanderauwera, S; Gollery, M; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10):490-498.
- Mohan, N; Dash, SP; Bobby, NM; Shetty, D. 2022. Study of bamboo as a building material – construction & preservation techniques and its sustainability. *Materialstoday Proceedings* 1(60):100-114.
- Mudoj, KD; Saikia, SP; Borthakur, M. 2014. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important

- bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro. African Journal of Biotechnology 13(19):1961-1972.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473–497.
- Murata, M; Tsurutani, M; Tomita, M; Homma, S; Kaneko, K. 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. Journal Agricultural and Food Chemistry 43(5):1115-1121.
- Musetti, R; di Toppi, LS; Martini, M; Ferrini, F; Loschi, A; Favali, MA; Osler, R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. European Journal of Plant Pathology 112:53-61.
- Negi, D; Saxena, S. 2011a. In vitro propagation of *Bambusa nutans* Wall. Ex Munro through axillary shoot proliferation. Plant Biotechnology Reports 5(1):35-43.
- Negi, D; Saxena, S. 2011b. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47:604-610.
- Onsa, G. H; Nazamid, S; Jinap, S. and Jamilah, B. 2000. Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): Partial purification, activation and some properties. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48:5041-5046.
- Orozco-Cárdenas, M; Narváez-Vásquez, J; a Ryan, C. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Cell 179-191.
- Pandey, S; Sundararajan, S; Ramalingam, S; Pant, B. 2020. Effects of sodium nitroprusside and growth regulators on callus, multiple shoot induction and tissue browning in commercially important *Valeriana jatamansi* Jones. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 142:653-660.
- Obsuwan, K; Duanqmanee, A; Thepsithar, C. 2019. In vitro propagation of a useful tropical bamboo, *Thyrsostachys siamensis* Gamble, through shoot-derived callus. Horticulture, Environment, and Biotechnology 60:261-267.
- Ping-Seng, L; Shuchai, S; Fang, W; Fei, Y; Yunfeng, D. 2009. Correlation between Browning, Total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. Acta Horticulturae 829:1-6.

- Poudyal, BK; Du, G; Zhang, Y; Liu, J; Shi, Q. 2008. Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for in vitro culture. *Frontiers of Agriculture in China* 2(3):321-330.
- Pradhan, N; Singh, P; Dwivedi, P; Pandey, DK. 2020. Evaluation of sodium nitroprusside and putrescine on polyethylene glycol induced drought stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni under *in vitro* condition. *Industrial Crops and Products* 154: 112754.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- Rajput, B; Jani, M; Ramesh, K; Manokari, M; Jogam, P; Allini, VR; Kher, MM; Shekhawat, MS. 2020. Large-scale clonal propagation of *Bambusa balcooa* Roxb. and industrial important bamboo species. *Industrial Crops and Products* 157:112905.
- Ramanayake, SMSD; Meemaduma, VN; Weerawardene, TE. 2006. In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). *Scientia Horticulturae* 110(1):109-113.
- Ramanayake, SMSD; Yakandawala, K. 1997. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Science* 129:213-223.
- Ray, SS; Ali, MN. 2017. Factors affecting macropropagation of bamboo with special reference to culm cuttings: a review update. *New Zealand Journal of Forestry Science* 47:17.
- Reeve, RM. 1951. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Technology* 26:91-96.
- Roxas, CA. 2012. Handbook on Erect Bamboo Species Found in the Philippines. College, Laguna, Ecosystems Research and Development Bureau, Department of Environment and Natural Resources. pp 19-132.
- Sandhu, M; Wani, SH; Jiménez, VM. 2018. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132:27-53.
- Sarropoulou, V; Dimassi-Theriou, K; Therios, I. 2014. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of the cherry rootstocks CAB-6P, Gisela 6, and MxM 14 using sodium nitroprusside. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 50:226-234.

- Saxena, S. 1990. In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Reports* 9(8):431-434.
- Saxena, S; Bhojwani, SS. 1993. In vitro clonal multiplication of 4-year-old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispathus* kurz. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 29:135-142.
- Schippers, JHM; Foyer, CH; van Dongen, JT. 2016. Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology* 29:121-128.
- Schoofs, J. 1992. Rapid propagation of fast-growing woody species. Oxon, UK, CAB International. 125 p.
- Selvarajan, E; Veena, R; Kumar, M. 2018. Polyphenol oxidase, beyond enzyme browning. In: Singh, J; Sharma, D; Kumar, G; Sharma, N. (eds) *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer, Singapore. pp. 203-222.
- Sharma, P; Sarma, KP. 2013. *In vitro* propagation of *Bambusa tulda*: an important plant for better environment. *Journal of Environmental Research and Development* 7(3):1216-1223.
- Sharma, A; Shahzad, B; Rehman, A; Bhardwaj, R; Landi, M; Zheng, B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24:2452.
- Shirin, F; Rana, PK. 2007. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnology Reports* 1: 141-147.
- Soderstrom, TR. 1981. Some evolutionary trends in the Bambusoideae (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68(1): 15-47.
- Sommano, S; Kumpoun, W; Yusuf, NA. 2017. Subcellular extraction and enzyme characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase in Cinnamon myrtle. *Acta Physiologia Plantarum* 39:36.
- Subiramani, S; Sundararajan, S; Sivakumar, HP; Rajendran, V; Ramalingam, S. 2019. Sodium nitroprusside enhances callus induction and shoot regeneration in high value medicinal plant *Canscora diffusa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 139:65-75.
- Sungkaew, S; Stapleton, CMA; Salamin, N; Hodkinson, TR. 2009. Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae;Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s. *Journal of Plant Research* 122:95-108.

- Talla, SK; Bagari, P; Manga, S; Aileni, M; Mamidala, P. 2022. Comparative study of micropropagated plants of Grand Naine banana during *in vitro* regeneration and *ex vitro* acclimatization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 42:102325.
- Tan, BC; Chin, CF; Alderson, P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vainilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 49:626-630.
- Tang, W; Newton, RJ. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167(3):621-628.
- Taulavuori, E; Hellström, EK; Taulavuori, K; Laine, K. 2001. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 52(365):2375-2380.
- Teixeira da Silva, JA; Nezami-Alanagh, E; Barreal, ME; Kher, MM; Wicaksono, A; Gulyás, A; Hidvégi, N; Magyar-Tábori, K; Mendler-Drienyovszki, N; Márton, L; Landín, M; Gallego, PP; Driver, JA; Dobránszki, J. 2020. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta* 252 (47):1-35.
- Turnbull, D. 2008. Bamboo. In: Sellin, H (ed.). *Encyclopaedia of the History of Science, Technology, and Medicine in Non-Western Cultures*. Springer. pp. 390-391.
- Turrens, JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552(2):335-344.
- van Dam, JEG; Wolter Elbersen, H; Daza Montaña, CM. 2018. Bamboo production for industrial utilization. In: Alexopoulou, E (ed.). *Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts*. Elsevier. p.175-216.
- Verma, A; Malik, CP; Gupta, VK. 2014. Sodium nitroprusside-mediated modulation of growth and antioxidant defense in the *in vitro* raised plantlets of peanut genotypes. *Peanut Science* 41:25-31.
- Wang, SY; Jiao, HJ; Faust, M. 1991. Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *Journal of Plant Growth Regulation* 10:33-39.

- Wang, Y; Wang, Y; Li, K; Song, S; Chen, J. 2016. Characterization and comparative expression profiling of browning response in *Medinilla formosana* after cutting. *Frontiers in Plant Science* 7:1897.
- Wang, H; Zhang, D; Fernández-Lorenzo, JL; Shen, H; Yang, L. 2022. Reactive oxygen species, nitric oxide and plant cell death associated with caspase-like protease activity during somatic embryogenesis in *Fraxinus mandshurica*. *Journal of Forestry Research* 33:1005-1017.
- Wesche-Ebeling, P; Montgomery, MW. 1990. Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. *Journal of Food Science* 55(5):1320-1324.
- Widjaja, EA. 1997. New taxa in Indonesian bamboos. *Reinwardtia* 11(2):57-152.
- Xu, C; Ru, Z; Li, L; Zeng, B; Huang, J; Huang, W; Hu, O. 2015. The effects of polyphenol oxidase and cycloheximide on the early stage of browning in *Phalaenopsis* explants. *Horticultural Plant Journal* 1(3):172-180
- Xu, J; Wang, W; Yin, H; Liu, X; Sun, H; Mi, O. 2010. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil* 326:321-330.
- Xu, J; Yin, H; Wang, W; Mi, Q; Liu, X. 2009. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. *Plant Growth Regulation* 59:279-285.
- Yang, H; Zhou, C; Wu, F; Cheng, J. 2010. Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. *Postharvest Biology and Technology* 57(1):72-76.
- Yang, TH; Lee, CH; Cheng, YW. 2016. Effects of different thermal modification media on physical and mechanical properties of moso bamboo. *Construction and Building Materials* 119:251-259.
- Yang, X; Xu, Q; Le, L; Zhou, T; Yu, W; Wang, G; Fu, FF; Cao, F. 2022. Comparative histology, transcriptome, and metabolite profiling unravel the browning mechanisms of calli derived from ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Journal of Forestry Research* doi.org/10.1007/s11676-022-01519-9.
- Yoruk, R; Marshall, MR. 2007. Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry* 27:361-422.

- Yu, L; Pei, J; Zhao, Y; Wang, S. 2021. Physiological changes of bamboo (*Fargesia yunnanensis*) shoots during storage and the related cold storage mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 12:731977.
- Zamora-Chacón, A. 2015. Introducción y brotación inicial *in vitro* de *Bambusa lako* (Poaceae: Bambusoideae). Colegio de Postgraduados y Universidad de Costa Rica. 31 p.
- Zandonadi, DB; Santos, MP; Dobbss, LB; Olivares, FL; Canellas, LP; Binzel, ML; Facanha-Okorokova, AL; Facanha, AR. 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Journal of Cheminformatics* 231:1025-1036.
- Zhang, X; Shao, X. 2015. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences* 33(2):109-117.
- Zheng, X; Lin, S; Fu, H; Wan, Y; Ding, Y. 2020. The bamboo flowering cycle sheds light on flowering diversity. *Frontiers in Plant Science* 11:381.
- Zhu, Z; Luo, W; Sun, DW. 2020. Effects of liquid nitrogen quick freezing on polyphenol oxidase and peroxide activities, cell water states and epidermal microstructure of wolfberry. *LWT - Food Science and Technology* 120:108923.