

Título. Utilización del Aloe vera L. en la composición de medios de cultivo para la micro propagación de la variedad comercial de plátano FHIA 18.

Autores MSc María JÓ García¹, MSc René Hernández Gonzalo¹, Ing. Darnovis Loaces Caballero¹, Ing. Maribel Rodríguez Serrano², Giap Nguyen Van¹.

Universidad de Pinar del Río. Cuba¹.

Biofábrica de Pinar del Río²

MSc María JÓ García mary@af.upr.edu.cu

MSc René Hernández Gonzalo reneh@af.upr.edu.cu

INTRODUCCION.

En el avance logrado por las ciencias biológicas en las últimas dos décadas han desarrollado técnicas que posibilitan estudio de las plantas a nivel celular y molecular. Estos nuevos enfoques conocidos colectivamente como Biotecnología se están convirtiendo en una herramienta poderosa para el mejoramiento de las plantas y el progreso de la Agricultura.

La Biotecnología vegetal experimenta hoy una evolución rápida que ha suscitado gran interés en la mayor parte de las naciones. En Cuba en 1985 se obtiene en un laboratorio de investigación las primeras poblaciones de plantas micro propagadas “in vitro” de varios clones de bananos, lo cual dio inicio a un amplio programa de reproducción de las variedades comerciales.

Un intenso trabajo de investigación y evaluación de los resultados en la práctica productiva, han posibilitado la introducción en las Biofábricas cubanas de varias innovaciones y mejoras en las técnicas de cultivo y manejo “in vitro” y “ex vitro”, dentro de los sistemas están: el uso de medios de cultivo simplificados y en estado líquido para algunas etapas del proceso así como la utilización de diferentes manejos según los requerimientos de la especie o variedad.

La tendencia actual en la propagación de plantas es el empleo de medios de cultivo cada vez más simples, lo que ha sido posible gracias al dominio sistematizado, que se tiene de los demás factores que influyen en el cultivo “in vitro”. Actualmente la alternativa más común, es que el investigador prepare su propio medio, este método es el más adecuado cuando se está realizando investigaciones.

Posiblemente la formación del medio para el cultivo de vitro plantas es más un arte que una disciplina por derecho propio, la experiencia es el mejor maestro en este tipo de trabajo, y éste es el mejor consejo u orientación que se le puede dar a un principiante. Sin embargo, se sabe que es un problema mayor estudiar todas las interrelaciones de los componentes orgánicos e inorgánicos de un medio de cultivo. No obstante normalmente, se puede utilizar un medio sencillo y luego complementarlo con diferentes formas, el “arte”

consiste en llegar empíricamente a la fórmula que le brinde a la vitro planta la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer. (Ponce, 2000)

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del extracto de Aloe vera en la fase de multiplicación de la micro propagación del plátano variedad FIAH 18.

MATERIALES Y METODOS.

El experimento se desarrolló en la Biofábrica , perteneciente a la Empresa de Semillas Varias del Ministerio de la Agricultura. Ubicada en la Avenida Borrego Reparto Hnos. Cruz de la Ciudad de Pinar del Río. Se utilizó explantes de plátano de la variedad comercial FHIA 18, estos provienen de meristemos apicales, y son del 4to. Sub cultivo.

Se utilizó el extracto de Aloe vera L. (sábila).

Forma de obtención del extracto. Se cosechó hojas adultas y maduras de sábila de 2 años de edad. Se conservaron a bajas temperaturas. Se lavó con detergente y abundante agua y se pusieron en Cloro comercial al 3 % durante 25 minutos, terminada esta operación se enjuagó con bastante agua y al final con agua estéril agua. Se extrajo el mucílago gelatinoso de forma manual.

Se utilizó diferentes concentraciones de MS, y al ir disminuyendo las mismas se agregó el extracto de Aloe vera en los medios como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1 Composición de los medios de cultivo simplificados.

	Testigo	T1 MS	T2 MS	T3 MS	T4 MS
	MS 100%	80%	60%	40 %	20%
Nitratos	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
Sulfatos	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
Haluros	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
PBOMO	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
EDTA-Fe	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
Comp. Vit.	1 mL	0,8 mL	0.6 mL	0.4 mL	0.2 mL
AIA	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL
6 BAP	0.80 mL	0.64 mL	0.48 mL	0.32 mL	0.16 mL
Sacarosa	30 g	24 g	18 g	12 g	6 g
Aloe vera	0	2 %	4%	6%	8%

Se ajustó el pH al medio y al extracto de Aloe vera a 5.8

Se estableció una densidad sobre la base de que el explante disponga de una determinada cantidad de medio de cultivo. Para determinar la densidad se tuvo en cuenta:

volumen interno, transparencia, capacidad de intercambio, forma del recipiente de cultivo, estado físico, composición y cantidad del medio de cultivo en el recipiente, dimensiones del explante, intensidad de luz disponible en las áreas de crecimiento, desarrollo foliar, hábito de crecimiento de la especie, habilidad de la especie para proliferación “ in vitro”. En cada tratamiento se utilizó 5 pomos en los cuales se sembraron 3 explantes por unidad.

Se seleccionó los explantes en condiciones de absoluta asepsia (cámara de flujo laminar) se procedió a eliminar los primordios foliares (decapitación) con la finalidad de inhibir la dominancia de la yema apical y proporcionar así el desarrollo de las pequeñas yemas axilares, así como la eliminación de los tejidos senescentes de la base de los brotes, quedando así, listo los explantes para ser sembrados. Se sembraron 75 explantes.

Los explantes se mantuvieron en cámaras de crecimiento con temperaturas entre 23 y 27°C con un foto período de 16 horas luz y una intensidad luminosa entre 2 – 4 lux obtenida a través de la luz solar.

Para verificar la calidad de la esterilización, los medios de cultivo se mantuvieron en reposo durante 24 a 72 horas

Para la identificación de los microorganismos se utilizó el método tradicional de apreciación visual de contaminantes, auxiliado de los manuales de clasificación según el grupo microbiano.

Se evaluó:

Longitud de la vitro planta cm.

Diámetro del seudo tallo Auxiliado por el pié de rey mm.

Número de hojas.

Hijos por explante (coeficiente de multiplicación)

Comportamiento morfogenético (rizogénesis)

El experimento siguió un diseño completamente aleatorizado, los datos se procesaron para comprobar si existían los principios de normalidad, aplicando un análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significación del 0.05 utilizando el paquete estadístico SPSS 10 .0.

Evaluación de la respuesta fisiológica de los explantes en cada tratamiento.

Para evaluar la respuesta fisiológica de los explantes en esta etapa de multiplicación, se tomó como referencia las especificaciones de calidad establecidas en las Biofábricas cubanas para el cultivo del plátano y bananos según (Pérez, 1994).

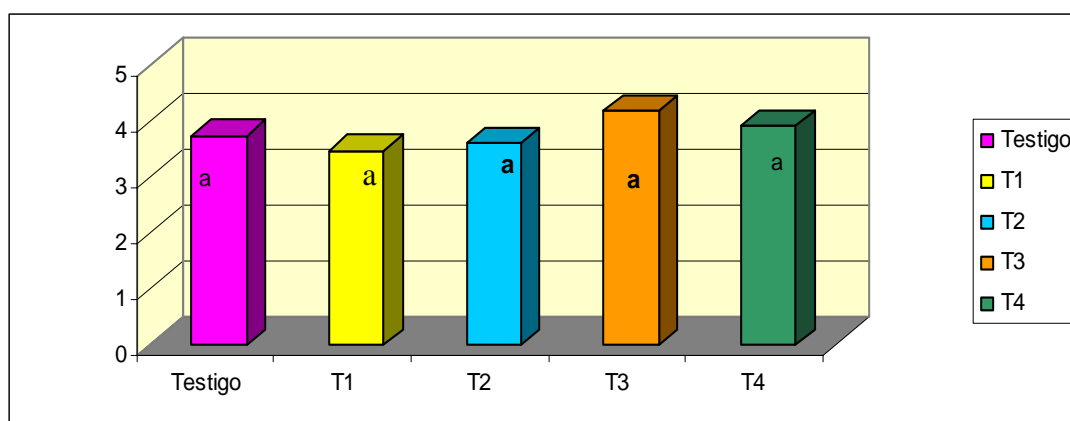
Tabla 2 Especificaciones de calidad establecidas en las Biofábricas cubanas para el cultivo del plátano.

Parámetros	Fase	Cultivo plátano.
Longitud de las plantas	II	Mayor e igual a 4.5 cm.
Número de hojas	II	2 o mas
Diámetro del pseudo tallo	II	Entre 0.4 – 0.8
Calidad fitosanitaria.	II	Planta libre de contaminación y daños físicos
Garantía de calidad.	II	Adecuado vigor y coloración

Efectos de los tratamientos en la longitud cm.

En el gráfico 1 no se observan diferencias significativas entre los tratamientos estudiados en cuanto a la longitud de la vitroplanta a los 21 días de establecido los explantes en la fase de multiplicación. El tratamiento de mejor comportamiento fue el enriquecido con un 6 % de extracto de Aloe vera y una reducción del 40 % de MS (T-3) alcanzando un valor promedio de 4.16 cm. , seguido del tratamiento T 4 con una reducción del MS al 20 % y enriquecido con un 8 % de sábila, con valor de 3.90 cm.

El testigo alcanzó un promedio de 3.73 cm de longitud de la plántula.



Letras diferentes indican diferencias significativas según Dócima Duncan para $p < 0,05$

Gráfico 1 Efecto de los tratamientos en la longitud (cm.) de las vitro plantas

El extracto de Aloe vera no ocasionó trastornos fisiológicos a los explantes y se pudo demostrar que no se detectaron brotes anormales, con hojas pequeñas ni deformadas o con poco desarrollo.

En este análisis se puede apreciar que la longitud de las vitro plantas están dentro de los rangos de calidad establecidos para el cultivo del plátano en las biofábricas (Pérez, 1994). Se puede señalar que la sábila contiene 13 de los 17 minerales necesarios para la buena nutrición y aporta 20 de los 22 aminoácidos conocidos, contiene enzimas naturales. (Yarón, 1995). Por lo que si disminuyes el medio de cultivo la sábila puede mantener los niveles de sustancias necesarias para el desarrollo de las plántulas.

Efectos de las dosis de extracto de sábila (A. vera) en relación con el diámetro del seudo tallo y el promedio de hojas.

Tabla 3 Promedio del diámetro del seudo tallo y número de hojas de los tratamientos

Tratamientos	Diámetro del seudo tallo mm.	Número de hojas.
Testigo 100 % MS 0 % (A. vera)	0.41 a	2.5 a
T1- 80 % MS 2% (A. vera)	0.4 a	2.1 a
T2- 60 % MS 4 % (A. vera)	0.42 a	2.3 a
T3- 40 % MS 6 % (A. vera)	0.4 a	2.2 a
T4- 20 % MS 8 % (A. vera)	0.4 a	2.2 a
ES	0,15	0,231
CV	1,85%	2,50%

Letras diferentes indican diferencias significativas según Dócima Duncan para $p < 0,05$

En la tabla 3 se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos todas las dosis reportan igual comportamiento equivalente a 0.4 mm del diámetro del seudo tallo, en relación al número de hojas ocurre algo similar , estos dos parámetros se incluyen dentro de los parámetros de calidad establecidos para el cultivo del plátano en las biofábricas cubanas. El análisis de los parámetros evaluados reveló la existencia de una uniformidad media, desde el punto de vista morfológico entre los brotes de un mismo recipiente y que las disminuciones de MS suplidas con el extracto de Aloe vera no tienen efectos negativos para los brotes.

Comparación del coeficiente de multiplicación.

Tabla 4 Coeficiente de multiplicación por tratamiento.

Tratamientos	Hijos por explante.
Testigo 100 % MS 0 % (A. vera)	1.5 b
T1- 80 % MS 2% (A. vera)	3.3 a
T2- 60 % MS 4 % (A. vera)	1.9 b
T3- 40 % MS 6 % (A. vera)	0.5 c
T4- 20 % MS 8 % (A. vera)	0.9 c
ES	0.5830
CV	1.20 %

Medias con las mismas letras no muestran diferencias significativas Duncan 0.05

La fase de multiplicación es la que determina la eficiencia del proceso y el coeficiente de multiplicación es el parámetro fundamental, en las variedades de banano los coeficientes de multiplicación van desde 2 hasta superiores a 4.

En la tabla 4 se muestra los resultados del coeficiente de multiplicación hay diferencias significativas siendo el tratamiento T1 el de mejor comportamiento 3.3 hijos por explantes seguido del T2 que no difiere significativamente con el testigo, los menores valores se observan donde hay menor concentración de MS y mayores de extracto de A. vera al 6 y 8 %.

De acuerdo a los resultados se ve que hay mejor equilibrio entre las concentraciones de MS al 80 % y el 2 % de A vera seguida de las concentraciones de MS al 60 % con el 4 % de A. vera, para el número de hijos por explantes.

Los tratamientos T 3 y T4 son los de peores resultados, se infiere que al parecer estos explantes comienzan a producir sus propias cito quininas, provocando una estimulación a la formación de brotes axilares y adventicios, evidenciándose estos resultados con el de Meins (1982) posteriormente fueron demostrados una vez mas por Evans y Bravo (1985). Los resultados obtenidos en estos dos tratamientos demostraron que hay que tener una fuente endógena de citoquinina para la inducción de brotación, ya que una pequeña cantidad de ella, puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento, es conocido que esta fuente es insuficiente para que se incremente el crecimiento y desarrollo “ in vitro “. En esta fase del cultivo las auxinas y las citoquininas pueden ser suprimidas, solo si el sistema es capaz de sintetizarlas.

Comportamiento morfogénico.

A los 10 días de establecido el experimento se pudo observar que la mayoría de los explantes se caracterizaron por presentar rizo génesis, una respuesta morfogénica

desfavorable. Igual respuesta obtuvo Lakshmi et al (1986) en *Eucalyptus grandis*, comprobaron que las bajas concentraciones de ANA promovieron el enraizamiento.

Durand Creswell y col (1985) comprobaron que el uso del PVP en soluciones, retiene los fenoles y otros compuestos exudados por el explante, que constituyen factores inhibidores de procesos morfogénicos como el enraizamiento. La falta de la adición a los medios de cultivo simplificados de PVP, permitió el desarrollo de la fenolización, y a esta se le atribuye el surgimiento de los procesos de la rizogénesis.

Según Gampel, (2002) el gel de Aloe vera contiene un 99,4% de agua. Más del 60% de los sólidos totales son polisacáridos mucilaginosos ligados a azúcares como glucosa, manosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, galactosa y ácidos urónicos. El mucílago está compuesto de diferentes polisacáridos neutros, ácidos y acetilados (mananos, glucomananos, galactomananos...), Los polisacáridos mucilaginosos son los principios activos responsables de la actividad biológica del gel de Aloe vera, y entre ellos destaca el acemanano: "Que ha despertado gran interés por sus propiedades farmacológicas y como componente activo importante del gel de aloe" y el aloérido: "Polisacárido de elevado peso molecular recientemente identificado, constituido por glucosa, galactosa, manosa y arabinosa, y que según parece posee una actividad inmunoestimulante superior a la del acemanano".

Siguiendo a Gampel, los restantes sólidos que componen el gel de Aloe vera,, son sales orgánicas y ácidos (glutámico, málico, salicílico, cítrico, lactato magnésico, oxalato cálcico), enzimas (celulasa, carboxipeptidasa, bradikininasa, catalasa, amilasa, oxidasa, tirosinasa), saponinas, taninos, esteroides, triglicéridos, aminoácidos (lisina, histidina, glutamina, arginina, ácido aspártico, asparagina, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina y triptófano), RNA y trazas de alcaloides, de vitaminas (betacaroteno, B1, B2, B3, B6, C, E, colina, ácido fólico) y de minerales (aluminio, boro, bario, calcio, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, sodio, fósforo, estroncio, silicio). Dentro de los aminoácidos presenta el triptófano que es el precursor del AIA, una auxina que influye en el enraizamiento.

Conclusiones

- La disminución de los medios de cultivo MS y la adición de extracto de sábila al 2, 4, 6, y 8(%) no mostraron diferencias significativas con el testigo 100 (%) MS para los parámetros longitud de las vitro plantas, diámetro del pseudo tallo y número de hojas

- Para el número de hijos / explantes el tratamiento del 80 (%) de MS con el 2 (%) de Aloe vera fue el mejor con 3.3 h/e.

-En la fase de multiplicación se observó un 26 % de rizogénesis.

Bibliografía.

- Álvarez M.G. Estudio de la viabilidad técnica y financiera del cultivo de sábila (A. vera L. en la zona Centro de Tamaulipas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tamaulipas 142. p. 1987.
- Evans, D.A. y Bravo S. Técnicas de cultivo aséptico para el mejoramiento del banano. Informe mensual No. 90 Unión de países Exportadores de Banano, Panamá Pp 42-47 1995
- Gampel, T.R Los usos terapéuticos del Aloe vera Jornada de Fitoterapia y Etnobotánica Jardín Botánico de Madrid 2002.
- Hu C.V. and Wang J.P. Meriste, shoot tip and bud culture. En Handbook of plant Cell Culture New York V 1 p 177 – 227 1983
- Lakshmi Sita G. Rani, S. Rao, S.K Propagation of Eucalyptus grandis by tissue culture Forest Research Institute. Peechi. Kerala India. P 318 – 321 1986.
- Mantovani, N.C. Estudo de regeneração “ in vitro” de Caixeta (Didymopanax morototoni) DissertaCao de Mastrado. 1997.
- Meins, F The nature of the cellular heritable change in cytokinine habituation Praeger Pub. New York p 202 – 210. 1982
- Orellana P. Tecnología para la micro propagación “in vitro” de Musa spp. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas Santa Clara. 1994.
- Pérez J. Instructivos técnicos de la micro propagación “in vitro” de la caña de azúcar y el plátano Ediciones internas. Universidad Central de Las Villas Santa Clara. 1994.
- Vázquez, B E y Torres S. Fisiología Vegetal Ediciones Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana 2001
- Yaron A. Characterization of Aloe vera gel before and after autodegradation and stabilization of the natural fresh gel. Phytotherapy Research Special Tissue p 11 - 513. 1995.