

## **Nuevas alternativas en la preparación de los medios de cultivo con la utilización del extracto de Aloe vera L.**

**AUTORES:** MSc. María JÓ García<sup>1</sup>, Msc. René Hernández Gonzalo<sup>2</sup>, Dr. Santos Bustios Dios<sup>2</sup>, Ing. Maylin Esteves<sup>3</sup>; Ing. Yusbel Echevarria<sup>3</sup>; MSc Ricardo Cruz Lazo<sup>2</sup>; MSc. Luis E. León<sup>2</sup>; MSc. Armando del Busto<sup>2</sup>  
Departamento de Biología<sup>1</sup>, Departamento Agropecuario<sup>2</sup> de la Universidad de Pinar del Río; Biofábrica de Pinar del Río<sup>3</sup>.  
E-mail mary@af.upr.edu.cu

### **Introducción**

**La sábila (*Aloe vera* (L) N.L. Burm**

**Historia, importancia y utilización del extracto de la sábila (*Aloe vera* (L) N.L. Burm)**

**Obtención del extracto de aloe vera**

**Composición química de la sábila (*Aloe vera* esp. *Barbadensis miller*)**

**Propiedades del *Aloe vera* estudiadas por diferentes Instituciones y Universidades del mundo**

**Cultivo “*in vitro*”. primeras contribuciones**

**Componentes del medio de cultivo**

**Rizogénesis. Enraizamiento in vitro**

**Complementos no definidos utilizados en la composición de medios de cultivo**

**Utilización del extracto de Aloe vera en la micropropagación**

**Micro propagación del plátano en biofábricas**

**Experiencia en las biofábricas**

**Bibliografía**

## INTRODUCCIÓN

El éxito que se obtenga en el cultivo de tejidos vegetales, el triunfo de esta tecnología y la aplicación de métodos “ *in vitro*” es debido fundamentalmente a un mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales en el cultivo de células y tejidos, sin el empleo de un medio adecuado se hace prácticamente imposible desarrollar esta técnica. Usando las sustancias químicas, las combinaciones necesarias y los cambios de nutrientes así como su forma química adecuada ha sido posible establecer medios de cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies. (APROCSAL 1994).

Se dice que la preparación del medio para el cultivo de vitroplantas es más un arte que una disciplina, la experiencia es el mejor maestro en este tipo de trabajo. Sin embargo, es un problema mayor el estudio de todas las interrelaciones de los componentes orgánicos e inorgánicos. No obstante, se puede utilizar también un medio sencillo y luego suplir de diferentes formas; el resultado consiste en llegar a la fórmula que le brinde a la vitro planta la mejor oportunidad de despertar su capacidad para crecer de forma empírica. Los investigadores han realizado múltiples estudios con el objetivo de optimizar la micropropagación mediante el perfeccionamiento de los medios de cultivo para especies de importancia comercial; estudios que se han volcado hacia la determinación de las concentraciones de sales, hormonas, vitaminas y demás componentes, estado físico del medio, pH, y otros factores determinantes en la obtención de explantes “ *in vitro* ” en las diferentes etapas de su desarrollo (Pérez Ponce, 1998).

La rizogénesis es el fenómeno de organogénesis mas generalmente implicado en la multiplicación vegetativa.

Los progresos de nuestros conocimientos sobre la rizogénesis condicionan por lo tanto el dominio de la multiplicación vegetativa. El estudio de este fenómeno pretende cada vez mas tener en cuenta las interacciones complejas de factores, pero queda dominado por el problema de la regulación hormonal y en particular por el papel de las auxinas en la organogénesis.( Hu y Wang 1983).

El proceso de rizogénesis está íntimamente ligado con la división celular, siendo práctica normal en horticultura y, sobre todo, en los viveros, aplicar auxinas a los esquejes para favorecer el enraizamiento. (Rojas 1993)

La planta de sábila y otras del género *Aloe* ha sido utilizada desde tiempos muy remotos y han figurado en las civilizaciones de África, Asia, Europa y en el Medio Oriente, durante miles de años. En nuestro país, a pesar de que es conocida hace menos de 500 años, existen muchos y muy diversos usos populares para esta planta, principalmente de tipo medicinal. También es utilizado en el cuidado facial y capilar mediante aplicación directa. Otro uso menos extendido es para preservar los vegetales de los insectos y animales domésticos.

Las propiedades de esta planta la hacen el sustituto ideal de los productos enzimáticos de la industria farmacéutica; el acíbar funciona como catalizador de las células vivas, ya que influye en las reacciones metabólicas de los tejidos proteicos gracias a la acción de sus enzimas, lo que permite disminuir la energía de activación de tal manera que la reacción se lleva a cabo en menor tiempo. (Vickery A.R. 1994)

Rodríguez H. (2004) refiere que se encontraron efectos estimulantes del crecimiento en los extractos estudiados. Correspondió al extracto de gel de *Aloe vera* el mejor comportamiento, particularmente con relación a la formación de raíces, superando incluso a los reguladores usados tradicionalmente como control, lo que demuestra la posible presencia de actividad auxínica en el mismo.

El gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm. ha demostrado su eficacia en la sustitución de reguladores sintéticos en medios de cultivos para el enraizamiento “*in vitro*” Rodríguez H (2006)

### **LA SÁBILA (*Aloe vera* (L) N.L. Burm)**

La Sábila (*Aloe vera*), es una planta que pertenece a la familia de las *liliáceas*.

Se parece a un pequeño maguey. Es perenne, de rizoma largo. Se propaga por división de mata. Y tiene un hábito de crecimiento herbáceo. El análisis fotoquímico de la sábila refleja que tienen aceites esenciales, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos, glucosa, proteínas y resinas. De la sábila se emplean la raíz, el tallo y las hojas. Es Originaria del continente Africano, habiendo sido introducida al nuevo mundo por los Jesuitas españoles en el año de 1590, Aunque hay más de 200 especies de sábila, probablemente hay sólo tres o cuatro con propiedades medicinales. De estas, *Aloe vera Barbadenis* (Miller), la cual es conocida también como *Aloe vera* (Linne), es la más

potente. *Aloe vera Barbadenis* es más bien parecido a un cactus pero de hecho pertenece a la familia a la que pertenecen la cebolla, el ajo y los espárragos. Esta planta alcanza su madurez en cuatro años cuando sus hojas son cosechadas. Las hojas son fileteadas y su gel interno es preservado y embotellado para elaborar un producto que es tan cercano al jugo de la planta natural. (APROCSAL 1994)

## **HISTORIA, IMPORTANCIA Y UTILIZACION DEL EXTRACTO DE LA SABILA (*Aloe vera* (L) N.L. Burm)**

El *Aloe vera* es una planta de las menos extendidas, y sin embargo la más fascinante del mundo. Posee una larga e ilustrada historia que data desde los años bíblicos. Una anécdota puede ser que la reina Cleopatra tomaba baños de *Aloe vera* para mantener su juventud. Dioscórides trata de unos y otros, y da los caracteres de las mejores suertes de acíbar en el capítulo 23 del Libro III. A mediados del siglo XVI, en los comentarios a dicho capítulo, la planta llamada *Aloe vera* común en gran parte de Italia, y se hallaba a cada paso plantada por los jardines y en los tiestos. En Andalucía existían grandes plantaciones de áloes en tiempo de los árabes, entusiastas propagadores del uso medicinal del acíbar.

Se tiene conocimiento que la sábila apareció por primera vez en la historia, alrededor del año 1500 a.c., en este primer registro se hace mención de una planta milagrosa de usos variados, conocida hoy en día en el mundo occidental como sábila ( *Aloe* ) por su gran potencial y sus aplicaciones al cuidado de la salud. Desde siglos el *Aloe vera* y sus poderes curativos han sido utilizados extensamente entre muchas culturas a causa de su eficacia en el tratamiento de quemaduras y la cura de heridas.

El uso de los áloes es muy antiguo, tanto en su utilización como catártica, como en relación con sus efectos regenerativos, antiinflamatorios, analgésico y bactericida externo. Generalmente se cita al Papiro de Ebers como la primera referencia al uso del *Aloe*, aunque existen otras anteriores en los Ayurveda, los Códices Chinos y las Tablas Babilónicas.

Los científicos han estudiado la sábila y ahora se sabe que contiene aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas, enzimas, proteínas, polisacáridos y estimulantes biológicos. Está demostrado que consumir jugo de sábila ayuda al organismo a

digerir completamente los alimentos, especialmente las proteínas en nutrientes que el organismo puede utilizar tanto externa como internamente.

Fueron investigadores japoneses quienes a partir de los 80 experimentaron en forma sistemática los polisacáridos contenidos en el gel del *Aloe*, entre los que se encuentran los glucomanos, los cuales constituyen aproximadamente un 0.2 - 0.3 % del gel fresco, además de elevados contenidos de galactosa, pentosa y ácidos urónicos. (Kollogé, S. 1997)

Vickery, A R. (1994) Además de la utilización directa de la sábila y de su gel o acíbar en la curación de diversas enfermedades, la sábila ha sido motivo de diferentes procesos industriales que han ampliado sus posibilidades de uso y han incrementado su demanda.

Las propiedades de esta planta la hacen el sustituto ideal de los productos enzimáticos de la industria farmacéutica; el acíbar funciona como catalizador de las células vivas, ya que influye en las reacciones metabólicas de los tejidos proteicos gracias a la acción de sus enzimas, lo que permite disminuir la energía de activación de tal manera que la reacción se lleva a cabo en menor tiempo.

Conaza (1992). Se utiliza en la perfumería y cosmetología donde se aprovechan más sus cualidades emolientes, humectantes, hidratantes y desinfectantes, así como su contenido de saponinas, glucósidos y polisacáridos en la elaboración de cremas faciales, champú tonificante, jabones, lociones para la piel, filtros solares y otros.

Conaza (1991) Recientemente se está haciendo uso del jugo para la preparación de bebidas refrescantes y saludables, dado su contenido en proteínas, aminoácidos, minerales, enzimas y otros complementos que le dan cualidades aperitivas, nutritivas, tónicas y reconstituyentes.

En el área agronómica, el jugo de sábila se ha usado experimentalmente como repelente e insecticida en larvas presentes en algunas plantas tuberosas, obteniéndose muy buenos resultados. De igual manera se ha reportado la experimentación para el control de enfermedades virales en papa, presentando una acción inhibitoria media en comparación con otros extractos de origen vegetal.

## **OBTENCION DEL EXTRACTO DE ALOE VERA.**

Según Conaza. (1990) Para obtener el extracto o acíbar de la sábila artesanalmente, se procede de la siguiente forma:

Se escogen las hojas más grandes procurando al hacer el corte, de no lastimar las más jóvenes. Se deben cortar de 8 a 12 hojas de la planta en forma transversal y se cuelgan de manera que la parte seccionada quede hacia abajo, con el objeto de que escurra el acíbar por 24 horas, de esta manera se recibe el jugo en un recipiente de lámina galvanizada cubierta de resina epóxica, colocando sobre baños de agua fría. Después de esto se envasa.

Según Vickery, A R. (1994) Otro método de extracción consiste en moler las hojas por cualquier medio, centrifugar los residuos, filtrar el jugo y envasarlo.

La producción promedio de acíbar obtenido de esta forma es de 10 mL por cada hoja de tamaño medio.

La extracción debe hacerse cuidadosamente para evitar que las proteínas se desnaturalicen y pierdan su actividad catalizadora, por esta razón debe evitarse que las hojas una vez cortadas sean expuestas al calor, a altas concentraciones salinas o pH extremos.

El manejo del acíbar en el transporte se hará a la menor temperatura y lo más rápido posible, y deberá refrigerarse una vez que ha sido extraído.

El jugo contiene dos fracciones: una fase acuosa llamada gel de *Aloe* y otra liposoluble denominada aceite de *Aloe*, a partir de estas dos mezclas se obtienen productos entre los que destacan los fármacos, cosméticos, solventes y perfumes.

El proceso moderno para la elaboración del jugo, consiste en someter a las hojas de *Aloe* a un tratamiento de corte y comprensión simultánea para extraer la mayor cantidad de jugo posible, después el extracto crudo pasa por las fases de desinfección, calentamiento, estabilización y envasado.

### **Oxidación con peróxido de hidrógeno.**

Conaza. (1992) Exposición a los rayos ultravioleta en presencia de catalizadores químicos.

Alta temperatura en poco tiempo (71-77°C durante o menos de 3 min.)

La última de las técnicas arriba mencionadas es la más recomendable, ya que introduce pocos cambios en la composición original del producto.

En Cuba el CIDEM (1996) tiene las especificaciones del extracto acuoso de Aloe vera siendo la metodología la siguiente.

Después de cosechadas las hojas fresca se lavan con agua corriente, deben ser almacenadas en frío antes 24 horas. Se someten a un proceso de bioestimulación durante 9 – 15 días protegiéndose de la luz.

Se lavan las hojas con agua corriente y posteriormente se lavan con agua desionizada. Se recogen las hojas limpias en un tanque de acero inoxidable y se procede a su molición.

Se mezcla con agua desionizada (relación 1: 1.5) con el reactor se extrae con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora, Posteriormente se calienta hasta la temperatura de ebullición y se refluja durante 30 mim.

Se enfría 50 – 60 ° C se filtra a través de gasa, recogiendo el extracto en un tanque de acero inoxidable.

Se le añade metil parabeno y el propil parabeno preservar en el alcohol etílico al 95% y agitar durante 30 mim. Para su completa disolución.

Se pasa a un tacho disolutor y se adiciona Metasulfito de sodio se agita y se filtra y se recircula hasta obtener un líquido transparente se enraza con agua desionizada y se homogeniza.

### **COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SÁBILA (*Aloe vera* esp. *Barbadensis miller*)**

La sábila se ha ganado el sobrenombre de “planta milagrosa” por los numerosos beneficios que aportan los aproximadamente 200 elementos que la componen. El análisis fotoquímico de la sábila refleja que contiene proteínas en 0.013 %, polisacáridos 0.2 – 0.3 %, resinas 40 – 80 %, aloína 20 %, aceites esenciales, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos, glucosa, agua y otros ( Retamar, 1995).

La sábila contiene 13 de los 17 minerales necesarios para la buena nutrición, aporta 20 de los 22 aminoácidos conocidos, ocho de estos son esenciales y deben ser proporcionados desde una fuente externa, ya que el cuerpo no los puede producir y está probado que consumir el jugo de sábila es una de las mejores fuentes para proporcionar al cuerpo estos aminoácidos. La sábila también contiene enzimas naturales y minerales necesarios para el organismo ya que las enzimas ayudan a realizar la reacción química de vitaminas, minerales y hormonas. ( Yaron, 1995).

Entre los elementos químicos que conforman la sábila se mencionan:

- Aminoácidos: (aporta 20 de los 22 que requiere el organismo) lisina, valina, leucina, fenilalanina, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y serina.
- Minerales: calcio, magnesio, potasio, cloro, hierro, zinc, cobre, cromo, azufre, aluminio, sodio y germanio.
- Oligoelementos: manganeso, calcio, potasio, sodio, aluminio, hierro, zinc, cobre, plata, cromo, fósforo y titanio.
- Vitaminas: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>12</sub>, C, ácido fólico y ácido nicotínico (niacina).
- Polisacáridos: celulosa.
- Carbohidratos: glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, acetilmanosa (acemannan).
- Prostaglandinas y ácidos grasos: ácido ganmalinoleico.
- Aceites esenciales: trazas de aloesinas.
- Enzimas: oxidasa, catalasa, amilasa, lipasa, fosfatasa alcalina.
- Antraquinonas: aloin, barbaloin y ácido aloético.

El germanio es un componente muy especial, que halla se en grandes cantidades en todas aquellas plantas consideradas milagrosa. El doctor Asai descubrió que las setas y el *Aloe vera* contenían germanio en grandes cantidades y demostró que este es de importancia capital para la vida de estas plantas debido a su papel catalizador, comparable al de la clorofila.



Su composición y propiedades físico-químicas y farmacológicas pueden variar en función de la lluvia o el riego, del terreno, de la época de recolección de las hojas y de su edad y almacenamiento, y según la forma de obtención del gel y su almacenamiento. Un 99,4% del peso del gel de *Aloe vera* es 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,...), responsables de la gran capacidad que tiene la planta para retener agua y gracias a la cual puede sobrevivir en condiciones de sequía. 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 áloe" 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".

Los restantes sólidos que componen el gel de *Aloe vera*, que también pueden contribuir a su actividad terapéutica, son sales orgánicas y ácidos (glutámico, málico, salicílico, cítrico, lactato magnésico, oxalato cálcico, ...), enzimas (celulosa, carboxipeptidasa, bradikininas, catalasa, amilasa, oxidasa, tirosinasa), sapogénicas, taninos, esteroides, triglicéridos, aminoácidos (lisina, histidina, glutamina, arginina, ácido aspártico, asparagina, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tiroxina, 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). No debe contener nunca en cantidades apreciables derivados hidroxiantracénicos o antraquinonas de acción laxante. ( Granados, S. y Castañeda, A. 1998)

## **PROPIEDADES DEL ALOE VERA ESTUDIADAS POR DIFERENTES INSTITUCIONES Y UNIVERSIDADES DEL MUNDO.**

- Nutritivo

- Estimulante del crecimiento celular
- Regenerador celular
- Antioxidante
- Antimicrobiano ( bactericida y fungicida )

### **Nutritivo.**

Aporte de elementos minerales esenciales.

Macro elementos:

Potasio, calcio, magnesio, fósforo, azufre.

Micro elementos:

Cloro, cobre, hierro, manganeso, zinc, boro.

Otros elementos esenciales:

Germanio, sodio, aluminio, cobre, plata, cromo.

### **Estimulante del crecimiento**

En la composición química del gel de *Aloe*, se encuentra el fosfato de manosa, su principal función es que actúa como agente de crecimientos de los tejidos. El ácido ascórbico se considera benéfico para el crecimiento, ya que puede retrasar la formación de sustancias semejantes a la melanina, que inhiben el crecimiento.

### **Regenerador celular.**

Los polisacáridos contenidos en el gel de *Aloe*, entre los que se encuentran los glucomananos, los cuales constituyen alrededor del 0.2 – 0.3 % del gel fresco y otros con elevados contenidos de galactosa, pentosa y ácidos urónicos, los hacen casi insustituibles como regeneradores titulares.

### **Antioxidante.**

La vitamina C (ácido ascórbico) se considera benéfico ya que este puede retardar el oscurecimiento de algunos tejidos recalcitrantes, debido probablemente a su capacidad para actuar como agente reductor.

### **Antimicrobiano.**

Los áloes muestran una actividad inhibitoria de algunos Bacillus, bloqueando la síntesis de los ácidos nucleicos en las bacterias, acción debida probablemente a las antraquinonas. El conjunto de antraquinonas (aloin, barbaloin y ácido aloético) produce un efecto antibiótico y antiviral. La saponina y aloetina presentan un carácter antiséptico y un amplio espectro antimicrobiano (bactericida y antiviroso) estos compuestos neutralizan el efecto de las toxinas microbianas. Se ha demostrado que desde el punto de vista biológico los taninos están relacionados con la resistencia de las plantas a las infecciones y se consideran potentes agentes antifúngicos. (Castillo E. N 2002)

### **CULTIVO “IN VITRO”.PRIMERAS CONTRIBUCIONES.**

El punto de partida en el cultivo *in vitro* es difícil de determinar, pero importantes contribuciones se remontan a 1860-1861 años en que Sacko y Knops descubrieron que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos orgánicos. El resultado de estas observaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva (solución Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usó como componente básico de medios de cultivo.

Rechinger, (1893) describió la formación de callos en fragmentos aislados de tallo y raíz. Haberlandt, (1902) asimiló todos estos conceptos existentes en aquel entonces y fue el que realizó los experimentos más importantes respecto al cultivo de tejidos, ya que propiamente cultivó células de mesófilo de tradescantia en un medio artificial. Haberlandt, sin embargo, no pudo obtener división celular en sus cultivos, la razón fue en parte debido al medio de cultivo relativamente simple, no obstante, una gran contribución de Haberlandt fue la especulación de la fitohormona que se llamó Traumatina.

Con todos estos conceptos fundamentales White, (1934) demostró que era factible cultivar con éxito órganos vegetales; demostró además que los tejidos vegetales en cultivo, ya sean células somáticas aisladas o formando agregados podían vivir normalmente *in vitro* y sin diferenciación.

Gautheret, (1955) como citólogo observó las células en cultivo y describió en detalle, el crecimiento *in vitro* de las células del cambium y la fisiología de células de zanahoria. Usó principalmente la solución de Knops como medio básico, suplementado con glucosa, extracto de levadura y cisteína.

Después de 1935, cuando conocieron las condiciones del crecimiento y la división de células homogéneas, aparecieron numerosos artículos en los que se experimentaban mejores condiciones para una rápida división celular, mayor velocidad del crecimiento y otros componentes del medio de cultivo. Así, Robbins, (1936), estudió el efecto de microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, manganeso y el boro eran necesarios para el cultivo de ápices radicales. Murashige y Skoog, (1962), estudiaron y propusieron la composición de los medios de cultivo al medio revisado para obtener una velocidad mayor en el crecimiento de células de *Nicotiana tabacum in vitro*.

Al finalizar la década de 1930, la ciencia fue estableciendo los nutrientes esenciales para elaborar medios de cultivo, como consecuencia, se determinó que los aminoácidos y las vitaminas desempeñaban un importante papel en la organogénesis.

Para el cultivo de ápices y meristemas no existe un medio universal, sin embargo, el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de plantas obtenidas *in vitro*.

En los años 1957 y 1958 se elaboraron los medios de cultivo necesarios para que a partir de grupos de células se pudieran regenerar nuevas plantas por procesos conocidos por morfogénesis y embriogénesis.

Skoog y Miller (1957) fundamentaron la hipótesis de que la iniciación de tallos y raíces en callos cultivados, podían ser regulados por rangos particulares de auxinas y citocinas. Se encontró que fragmentos de callos transferidos a medios líquidos y agitados, producían una suspensión que se podía propagar a través de subcultivos (Muir, 1953). El grupo de Steward realizó cultivos en suspensión de zanahoria, haciendo evidente que esa técnica ofrecía mayores potenciales para el estudio de muchas facetas de la biología celular (Nickel, 1956).

Nickel (1956), para estudios de fitofisiología y bioquímica, ha experimentado el cultivo masivo o cultivo en tanques con medios líquidos; además investigaron los efectos del abastecimiento del aire, control de pH, remoción de medio de cultivo y otros aspectos más.

El medio de White, (1934), citado por Orellana, (1994), fue el más utilizado en los primeros tiempos de la micropropagación, muchas mejoras han sido hechas desde entonces, siendo las más notables el mejoramiento de los niveles de N, P, K, la reducción del nivel de calcio y la precipitación de hierro a pH altos( Hu y Wang, 1983)

## **COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO**

### **Medio de cultivo**

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. ( Debergh, P. 1982)

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg et al. (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas.

### **Componentes minerales.**

Los componentes minerales esenciales para la vida de las plantas se dividen en:

#### **Macro elementos**

Se utilizan en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio.

#### **Micro elementos**

Aunque son necesarios en menor cantidad, juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas.

Los principales micro elementos son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cobalto y boro. Los micro elementos resultan indispensables para el crecimiento, intervienen como activadores de sistemas enzimáticos. Se suministran al medio de cultivo bien con el objetivo de evitar cualquier carencia o se utilizan a concentraciones mas elevadas con el objetivo de provocar una activación del crecimiento.

Las exigencias minerales varían con la especie, la naturaleza del tejido y su estado fisiológico, también varían con el método de cultivo y el tipo de órgano génesis estudiado.

Murashige y Skoog en (1962) propusieron un medio para la investigación del crecimiento óptimo de callos de tabaco (*Nicotina tabacum*). Este medio es netamente superior a los medios anteriormente usados para iniciar la órgano génesis y, particularmente, para la neoformación de yemas. (Medio MS)

A partir de estos resultados, el medio MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo "*in vitro*". Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citoquininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre órgano génesis en cultivo "*in Vitro*".

### **Componentes orgánicos.**

Dentro de los componentes orgánicos de los medios de cultivo tenemos azúcares, vitaminas, aminoácidos, productos orgánicos estimulantes y reguladores del crecimiento.

### **Azúcares.**

Los tejidos y células cultivadas "*in vitro*" son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego, resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima del azúcar en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g/L, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética.

### **Vitaminas.**

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos "*in vitro*" y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis. (Dr. González, S )

El compuesto que mas frecuentemente se añade a los medios de cultivo es el mio-inositol, se emplea en concentraciones entre 50 – 500 mg/L y su efecto se evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.

El ácido ascórbico (1 – 10 mg/L) y el ácido cítrico (50 –100 mg/L) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos.

### **Aminoácidos.**

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la órgano génesis y

en la multiplicación vegetativa "*in vitro*". Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la órgano génesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general.

### **Reguladores del crecimiento (fitohormonas).**

Según Drew, R.A. (2003): Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo "*in vitro*".

En los métodos de propagación "*in vitro*" se emplean ampliamente las auxinas; en la órgano génesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citoquininas. La importancia de las giberlinas en cultivo "*in Vitro*" está mucho más restringida.

El ABA (ácido abscísico) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia en casos más específicos. aminopurina o N6-benciladenina). Recientemente se ha descrito que la N-6- bencil aminopurina (BAP) o N6-benciladenina (BA) ha sido aislada de plantas y constituye también una citoquinina natural. En cultivos de tejidos, el BAP y las citoquininas sintéticas Kinetina y TDZ (thidiazuron) son las más frecuentemente usadas.

Las citóquininas estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y tienen un efecto sinérgico en este sentido con las auxinas. Se han reportado otros efectos de las citoquininas, por ejemplo: estimulan el alargamiento celular de discos de hojas etioladas; inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos "*in Vitro*" (morfogénesis); controlan la formación de proplastidios en cloroplastos; mantienen la maquinaria de síntesis de proteínas mediante la regulación de la síntesis del RNA; retrasan la senescencia; etc.

Las citóquininas que se usan con mayor frecuencia en los medios de cultivo son: la kinetina (KIN), la 6-bencil aminopurina (BAP), la 2-isopenteniladenina (IP) y la zeatina. El BAP se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo. Generalmente las citoquininas se evitan o se emplean en dosis muy débiles en los medios de enraizamiento porque presentan un efecto inhibitor sobre la rizogénesis.

Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos "*in Vitro*" son: La cantidad de luz: (irradiación) y la calidad de la luz:( espectro).

La alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad:( El foto período). Considerando estos aspectos, los tubos con los meristemos se ponen bajo luz fluorescente (en general de 1,000 a 3,000 Kw./m<sup>2</sup>) - en ocasiones es necesario utilizar una irradiación menor en los primeros días después del aislamiento- bajo un foto período de 14-16 horas y a una temperatura de 23-25°C para el desarrollo adecuado de las Vitro plantas.( Pérez L. 1992)



El cultivo *in vitro* se realiza dentro de espacios denominados cámaras de cultivo, diseñados para permitir el control del ambiente físico al que será expuesto el cultivo. Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente.

Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28°C.

Así, temperaturas bajas (del orden de 4--5°C) permiten superar los periodos de dormición de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos "in vitro" mientras que una temperatura constante de 20°C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas. (Grattopaglia, D y Machado, M.A. 1990)

La luz, definida como una forma de energía radiante que se nos manifiesta mediante la visión es, en realidad, parte de un fenómeno físico más amplio: la energía radiante (radiación), que puede ser descrito según dos modelos diferentes: el modelo ondulatorio (radiación electromagnética) y el modelo corpuscular.

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización,...) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor foto período *in vitro*. ( Crops Research Institute (CRI). 1995).

### **Consistencia del medio.**

El uso del medio para el enraizamiento es un asunto muy debatido, pues algunos autores prefieren el medio sólido y otros el medio líquido; el medio líquido al menos para las plantas leñosas han dado mejores resultados porque el mismo favorecen la difusión de las exudaciones tóxicas que producen las plantas en cultivo, fundamentalmente los compuestos fenológicos permite una mayor aeración y una mejor absorción de los nutrientes presentes en el medio. (García, 2000).

El medio para el cultivo de raíces *in vitro* puede ser en forma líquida o sólida, a merced del tipo de cultivo estando crecido para cualquier cultivo que requiera que los tejidos o las células de la planta a ser crecidas en la superficie del medio, debe ser salificado (mas concretamente llamado "galled" agar producido de algas marinas, es el tipo mas común del agente gelatinoso y es el ideal para estas aplicaciones. (Gamborg, 1968).

## **1.8.- RIZOGÉNESIS. ENRAIZAMIENTO IN VITRO**

### **Organogénesis**

Es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, o sea, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de este en un brote vegetativo existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa. Los brotes pueden formarse directamente a partir de explantes (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. (Pérez Ponce. 1998.)

El término cultivo de meristemas ha sido destinado para designar fragmentos de tejidos en un rango de 0.1mm – 1 cm o más. Sin embargo para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristemático más el primer primordio foliar en un rango de 0.1 – 0.5 mm (Herman, 1987; citado por Pérez Ponce. 1998). A partir de ese tamaño se considera cultivo de ápices.

### **Rizogénesis.**

La rizogénesis es el fenómeno de organogénesis mas generalmente implicado en la multiplicación vegetativa. ( Sivory M./Caso 0 . 1980)

Hu y Wang (1983) Señalan conocimientos sobre la Rizogénesis que condicionan por lo tanto el dominio de la multiplicación vegetativa. El estudio de este fenómeno pretende cada vez mas tener en cuenta las interacciones complejas de factores, pero queda dominado por el problema de la regulación hormonal y en particular por el papel de las auxinas en la organogénesis.

### **Origen de las raíces.**

Diferentes orígenes de los meristemas de raíz.

Los meristemos de raíz se distinguen en varias categorías según su origen.

- a) Los meristemos laterales de la raíz principal se forman de una manera espontánea en condiciones naturales.
- b) Los meristemos adventicios son producidos por órganos diversos, (tallo, tubérculo, bulbo, hoja, etc.,) ya sea espontánea o accidentalmente, como consecuencia de una herida.
- c) Los meristemos neoformados en el seno de un callo, en cultivo *in vitro* pueden ser considerados como un caso particular de meristemos adventicios.

### **Etapas de la formación del meristemo de raíz.**

La neoformación de los meristemos de raíz (como también de los meristemos de tallo) resulta siempre de una desdiferenciación celular provocada. Que conduce a la producción de células meristemáticas primarias y a la organización de un esbozo meristemático.

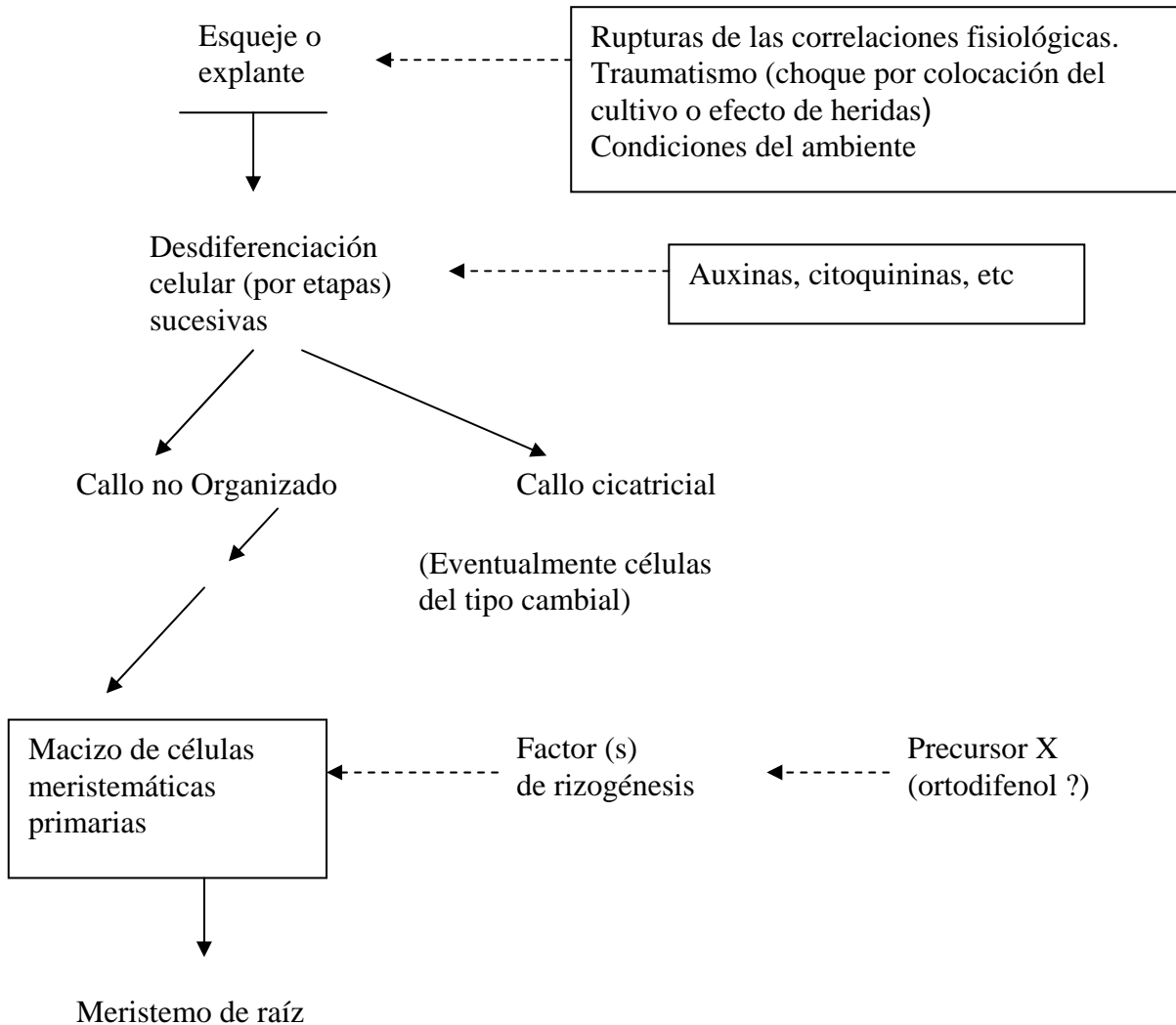
La desdiferenciación procede por etapas sucesivas, según la naturaleza de tejido original (células pericíclicas, células liberianas, parenquimatosas o cámbiales) existen diversas modalidades entre ellas.

- a) Las raíces adventicias pueden iniciarse en la base de una yema después de la neoformación previa de un callo cicatricial.
- b) Las raíces adventicias pueden igualmente ser iniciadas a partir de tejidos profundos. Lo más frecuente es que entonces sean formadas a partir del cambium. Las células que la originan sufren una
- c) desdiferenciación que conduce a la formación de células meristemáticas primarias.
- d) Las raíces adventicias pueden más raramente provenir de tejidos superficiales, como la epidermis, en este caso bastante raro, se encuentra en diversas familias como las crucíferas, como el mastuerzo, y el berro.

Estas raíces son entonces denominadas como exógenas en oposición al caso más general de las raíces endógenas.

## Etapas de la rizogénesis

(Esquema hipotético y simplificado)



### Regulación hormonal de la Rizogénesis.

Influencia estimuladora de la hoja o de la yema.

Numerosas experiencias de brotación, han demostrado claramente la influencia estimuladora que determinan las yemas sobre la Rizogénesis lo que evidencia la influencia de una sustancia con circulación polarizada, que es el origen del concepto de regulación hormonal de la Rizogénesis.

La o las sustancias estimulantes probablemente resultarían de la actividad fotosintética de las hojas, pero podrían igualmente provenir esencialmente de las hojas jóvenes en crecimiento activo y eventualmente del mismo ápice.

El estímulo proveniente de la hoja o de la yema es el estimulador más frecuente de la Rizogénesis. (Salisbury F/Ross. C, 1994)

### **Concepto de una rizocalina específica.**

Según investigaciones realizadas la neoformación de raíces sería desencadenada por la acción de una sustancia móvil sintetizada por las hojas, y que emigraría de una manera polarizada hacia la base del tallo. Esta sustancia hipotética, específica de la Rizogénesis, debería denominarse "rizocalina" y sería transportada por el floema y acumulada en las yemas, los cotiledones y las semillas.

### **Auxinas y Rizogénesis.**

El papel central de la auxina en el desencadenamiento hormonal de la Rizogénesis viene sugerido a la vez por las aplicaciones de auxinas exógenas y por las dosificaciones de la hormona.

La aplicación del AIA frecuentemente estimula el enraizamiento de los esquejes y se obtienen resultados similares con auxinas sintéticas.

Las más eficaces son generalmente el ANA, AIB AIP y el AIA, estas sustancias son ampliamente utilizadas en horticultura y en arboricultura.

Las auxinas intervienen básicamente en dos estados del enraizamiento:

- El primero, en el cual se forman los meristemas radicales, estado inicial de su crecimiento. Este a su vez se puede dividir en un estado activo de acción de las auxinas en el cual debe haber una continua presencia de auxinas, pudiendo estas venir de los brotes terminales o laterales o de una aplicación externa, y una segunda etapa, la cual se puede denominar como de auxinas inactivas, ya que estas están presentes en la raíz cuatro días mas pero no tienen ningún efecto adverso en su formación.

- En la segunda etapa se da la elongación de los primordios radicales, en esta la nueva raíz atraviesa la corteza hasta emerger de la epidermis del tallo, para esto un sistema vascular ya se formó en la nueva raíz y se ha fusionado a los tejidos vasculares del tallo, una vez llegado a éste punto ya no hay mayor respuesta a las auxinas.

Las semillas en desarrollo son un importante centro de producción de AIA, como se ha demostrado en semillas de maíz, que alcanzan su máximo cuando aún están como leche y, al madurar, el AIA forma ésteres con el mio-inositol.

En óvulos de algodón también se han medido cantidades elevadas de AIA.

En frutos, el contenido en AIA aumenta tras la polinización alcanzándose un máximo; así, en fresas se pasa de 3.6 mg de AIA a 127 mg de AIA por frutos a los 12 días de la polinización e iguales máximos se encuentran en manzanas, uvas, tomates y otros.

En raíces se ha detectado AIA, aunque más bien parece que procede de las partes aéreas. Se ha visto que en raíces de maíz, hay más en la estela que en el córtex y más contenido aún en la cofia.

Se puede concluir que los lugares más importantes de síntesis de auxina son: las hojas jóvenes en expansión, el tejido cambial, los ovarios inmaduros y semillas en desarrollo. Sin embargo, otros tejidos también tienen la capacidad de sintetizar AIA (hojas maduras, tallos y raíces). (Rojas Gardenias, 1993)

### **Interacciones de factores.**

Parece evidente en la actualidad que la auxina no es el único factor de Rizogénesis.

La aplicación de auxina sobre esquejes es ineficaz en numerosos casos y a veces la eficacia no es aclarada más que después de la primera aplicación,

después de ablación de las raíces neoformadas una segunda aplicación queda sin efecto.

Todo sucede como si un factor de Rizogénesis pre existente en el esqueje y movilizado por la auxina o se combinara con ella, fuera rápidamente agotado.

Como consecuencia de numerosas experiencias se ha formulado el concepto de “complejo rizocalínico”, que contemplaría al menos tres elementos: 1) un factor móvil desconocido sintetizado en las hojas a la luz y que emigra de forma polarizada, 2) la auxina, 3) un factor celular existente sólo en ciertas células que realizaría la fijación y la combinación de los dos primeros

Un cierto número de hechos sugieren que compuestos fenólicos podrían tomar parte del complejo rizocalínico. La aplicación de ortodifenoles exógenos sobre esquejes ha podido estimular la Rizogénesis en algunos casos. Numerosos trabajos han demostrado que compuestos difenólicos, tales como el ácido clorogénico y el ácido cafeico, son inhibidores de la auxina-oxidasa. La acción de los compuestos fenólicos podría ser directa o indirecta por protección de la auxina o estimulación de la síntesis de auxina.

Como todo fenómeno de organogénesis, la Rizogénesis es ciertamente desencadenada por interacciones entre “efectores” y “receptores sobre lugar”.

Si se conocen las sustancias (auxinas, compuestos fenólicos) y las condiciones que desencadenan o favorecen la neoformación de raíces, se ignora siempre los mecanismos fisiológicos íntimos. (Hu y Wang 1983)

### **Enraizamiento “in vitro”**

MC Comb y Newton (2003), afirman que en algunas especies, el enraizamiento in vitro puede ser el único método para el enraizamiento de plántulas sin embargo han descrito una técnica donde insertan las base de los brotes en una espuma flexible de poliuretano sumergido en un medio de enraizamiento líquido las plántulas enraizadas de esta manera pueden ser transferidas al suelo sin remover el soporte.

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser mas flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis. (Adelaja B. 1995).

### **SUPLEMENTOS NO DEFINIDOS UTILIZADOS EN LA COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

Existen una lógica bien documentada tras el uso de sustancias líquidas que se encuentran en forma natural, con el uso individual de estas sustancias se obtiene poco efecto por encima del esperado, parece que las sustancias de

esta naturaleza pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular (Nitsch, 1962; Lee et al., 1965; Paulet, 1970).

Se puede anticipar que los investigadores en los trópicos y subtrópicos tendrán acceso a una gama de líquidos estimuladores del crecimiento que son de origen novedoso, distintivos o incluso morfológicamente únicos (Steward, 1959; Shantz, 1966).

Después de que Gautheret observó que el extracto de levadura tenía efectos sobre las células cultivadas *in vitro*, muchos investigadores empezaron a buscar sustancias orgánicas que pudieran ejecutar algún efecto morfogenético.

### **Principales sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida.**

- Agua de coco.
- Jugos de frutas y hortalizas (plátano y tomate).
- Extractos de levaduras, malta y tubérculos de papa.
- Endospermo líquido de *Zea mays*.
- Caseína hidrolizada.

Posiblemente el evento más significativo ante los avances de la década de los 40, fue el descubrimiento de las cualidades nutricionales del endospermo líquido del coco. Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuente de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros.

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente



bajos podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí solas era eficiente.

El agua de coco es un medio muy completo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos, tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar, es rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se puede reemplazar por un medio salino basal.

Un medio de cultivo general preparado con reactivos analíticos, con un suplemento de agua de coco, muy raras veces resulta tóxico o deficiente a causa de los micronutrientes.

Posteriormente el éxito de Van Overbeek y col., (1941) en el cultivo de embriones aislados de *Datura* en un medio enriquecido con agua de coco, este extracto natural fue rápidamente adoptado por otros investigadores.

La combinación de 2,4-D con agua de coco, mostró un sorprendente efecto en la estimulación del crecimiento de tejidos cultivados de zanahoria y papa. (Caplin y Steward, (1948).

El uso del agua de coco y de 2,4-D en tubérculos de papa por Steward, (1951) y del agua de coco con ANA por Morel (1951) en las monocotiledóneas, fueron otros progresos importantes. Estas observaciones constituyen la base para el uso del agua de coco y sus sinergias en la nutrición de células y tejidos cultivados *in vitro*.

Muchos investigadores encontraron que el extracto de malta de cebada era benéfico como un suplemento, ya que ha demostrado ser una fuente estimuladora de algunos tejidos.

Los resultados acumulados de los estudios realizados de esta temática, se resumen de la siguiente forma: en un total de 166 pruebas (con preparaciones de fuentes naturales) con 63 compuestos, 123 dieron una respuesta positiva, mientras que 40 no dieron respuesta o fueron negativos. El análisis de los resultados de estas pruebas, refuerza el hecho de que diversos tejidos responden diferentemente a varios suplementos.

El uso del medio para el enraizamiento es un asunto muy debatido, pues algunos autores prefieren el medio sólido y otros el medio líquido; el medio líquido al menos para las plantas leñosas han dado mejores resultados porque el mismo favorecen la difusión de

las exudaciones tóxicas que producen las plantas en cultivo, fundamentalmente los compuestos fenólicos permiten una mayor aeración y una mejor absorción de los nutrientes presentes en el medio. (García, 2000).

El medio para el cultivo de raíces *in vitro* puede ser en forma líquida o sólida, a merced del tipo de cultivo estando crecido para cualquier cultivo que requiera que los tejidos o las células de la planta a ser crecidas en la superficie del medio, debe ser solidificado (mas concretamente llamado "galled" agar producido de algas marinas, es al tipo mas común del agente gelatinoso y es al ideal para estas aplicaciones. ( Gamborg, 1968).

### **Utilización del gel o extracto del *Aloe vera* (L) N.L. Burm.**

En el área agronómica, el jugo de sábila se ha usado experimentalmente como repelente e insecticida en larvas presentes en algunas plantas tuberosas, obteniéndose muy buenos resultados. De igual manera se ha reportado la experimentación para el control de enfermedades virales en papa, presentando una acción inhibitoria media en comparación con otros extractos.

Por su parte, el gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm., ha demostrado su eficacia en la sustitución de reguladores sintéticos en medios de cultivos para el enraizamiento *in vitro* de plantas medicinales y frutales en condiciones de campo, también, potencialmente por sus características, podría ser utilizado para estos fines. (Rodríguez H., 2006).

Rodríguez H.,(2004) Señala que se encontraron efectos estimulantes del crecimiento en los extractos líquidos de plantas medicinales estudiados., correspondiéndole al extracto del gel de *A. vera* el mejor comportamiento, particularmente con relación a la formación de raíces, superando incluso a los reguladores usados tradicionalmente como control, lo que demuestra la posible presencia de actividad auxinica en el mismo.

Jó María y col(2003) con diferentes concentraciones de MS adicionando 20 y 40 mL/L de extracto de *Aloe vera* en la micropropagación del plátano FIAH 18 obtuvo *in vitro* plantas con buena respuesta fisiológica y un enraizamiento excelente.

Jó María y col ( 2005 y 2006) señala que se encontraron respuestas fisiológicas en la fase de enraizamiento en la micropropagación del plátano FIAH 18 en la Biofábrica de Pinar del Río, utilizando diferentes concentraciones de MS adicionando 20 y 40 mL/L del extracto de *Aloe vera*.

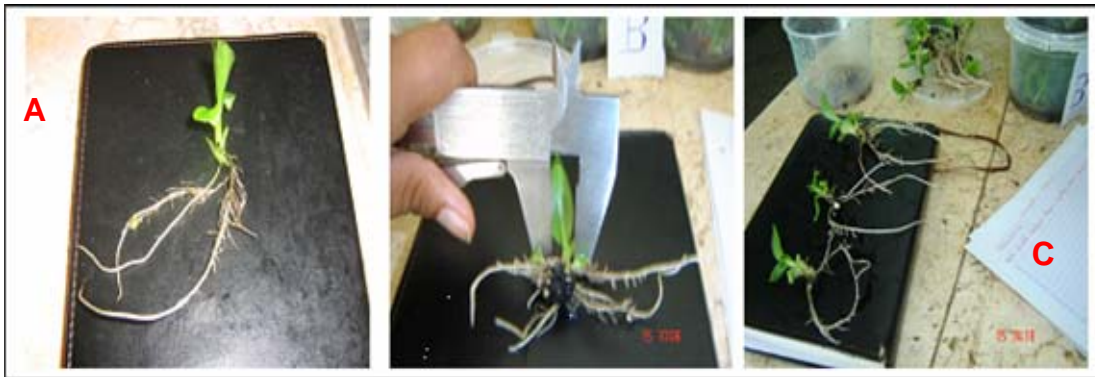


Figura: A Longitud de las raíces; B – Diámetro del pseudo tallo C- Número de raíces

## MICRO PROPAGACION DEL PLATANO EN BIOFABRICAS.

Se caracteriza por tener la capacidad de generar gran cantidad de plantas para la siembra en mediano plazo, en estado fitosanitario relativamente óptimo, en relación con algunas enfermedades. A partir de un ápice es posible lograr en el lapso de un año, centenares de plantas libres de nemátodos, hongos y de algunos virus y bacterias en comparación con el sistema tradicional Sandoval (1991). En el ámbito comercial se basa en el uso exclusivo del meristema o yema central para la propagación “*in vitro*”.

Este sistema presenta gran ventaja cuando se desea realizar intercambio de plantas (germoplasma) o siembra de musáceas en áreas relativamente nuevas. Pero el tipo, cantidad de insumos e infraestructura necesaria para garantizar un ambiente aséptico, incrementan los costos operativos y, consecuentemente, los costos del producto (plántulas) en relación con los sistemas de propagación antes mencionados. Ello constituye una de las principales desventajas para su uso masificado, principalmente entre los pequeños y medianos productores. (Grisales, 1994).

### Etapas de la micro propagación del plátano

Esta técnica ha sido utilizada en diferentes países (Cordeiro y Dos Santos, 1991; Crops Research Institute, 1995, Adaleja, 1995), y en Venezuela fue aplicada por primera vez por Hadad (1994) con notable éxito. A partir de este momento ha sido adoptada como alternativa de propagación rápida y masiva, pudiendo ser aplicada a cormos provenientes de plantas jóvenes o recién cosechadas.

Para su aplicación es necesario ubicar e identificar las yemas presentes en el cormo, lo cual permitirá que el sistema sea altamente eficiente. A continuación se describe de forma general los pasos a seguir para su aplicación. (Haddad 1994)

**Este proceso incluye varias fases:**

FASE 0: Preparación de la planta madre

FASE I : Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

FASE II : Multiplicación de brotes

FASE III : Enraizamiento

FASE IV: Aclimatación

**FASE 0: PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.

Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses, en un invernadero, en que se va a intentar cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición, del fotoperíodo y de la irradiancia recibida.

**FASE I: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO EN CONDICIONES DE ASEPSIA**

Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantos.

Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

Ya en condiciones de asepsia (se trabajará en cabinas de flujo laminar) se extraerán los explantes del material vegetal y se pondrán en cultivo en un medio de iniciación dentro de un bote de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.

## **FASE II: MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES**

Durante esta fase se espera que los explantes que sobre vivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar.

## **FASE III: ELECCIÓN DE UN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO DE LOS EXPLANTOS**

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente dos métodos:

### **ENRAIZAMIENTO IN VITRO**

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser mas flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis.

### **ENRAIZAMIENTO EX VITRO**

Los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita.

Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse.

Los explantes deben de plantarse en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en el laboratorio, o ponerlos en 'multipots' dentro de un invernadero en un área sombreada con "fog-system" o "mist-system".

## **FASE IV: ACLIMATACIÓN DE LOS EXPLANTOS ENRAIZADOS**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

Tanto si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cérea bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. (Alves E; Oliveira M. 1993).

## **EXPERIENCIA EN LAS BIOFÀBRICAS.**

### **Situación actual de Cuba**

Según Ponce (1998) en Cuba la propagación masiva de plantas comenzó a finales de la década de los 70, con laboratorios que producían de 100000 a 200000 vitro plantas anuales y paralelamente, los grandes centro científicos del país y de las universidades comenzaron a desarrollar tecnologías, no solo de cultivos de tejidos sino también de diagnóstico, saneamiento e identificación y caracterización de la variabilidad soma clonal.

En 1987 se construye la primera Biofàbrica en Cuba (primera generación) según el autor citado anteriormente y entre 1987 y 1993 se construyeron otras catorce que cubren la geografía agrícola de casi todo el país, surgió en el país el termino Biofàbrica que ya se maneja en muchos países a través del proceso investigativo y de la experiencia práctica, se ha desarrollado cuatro generaciones de Biofàbricas en términos de diseño; la más importante es la última, la cuarta generación a la que se le incorporó una fuerte componente de Investigación – Desarrollo.

### **Comportamiento de plátanos y bananas (*Musa spp*) cultivados en la biofàbrica**

Este es el cultivo de mayor volumen de propagación en el país, siendo así una de las especies que está en todas las Biofábricas, por lo cual ha sido una de las más estudiadas. Siendo hoy la micro propagación el principal sistema de reproducción para los clones cultivados de esta especie con producciones anuales entre 15 y 20 millones de vitro plantas.( Pérez P. 2000)

La micro propagación en este cultivo se ha empleado fundamentalmente para introducir de forma acelerada los nuevos clones resistentes a la Sigatoka negra (*Micosphaerella figiensis*), hasta diciembre de 1999 se habían plantado en el país mas de 10000ha de clones híbridos producidos en la Federación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ello representa el 10, 58 % del área total nacional sembrado con clones híbridos, esto se logró en un período de apenas cuatro años.

El clon de mayor área plantada es al FHIA 03 con 3783ha y FHIA 18 y FHIA23 con 2822ha y 2877ha respectivamente, distribuidos en todas las Provincias. (Ponce, et al 2000).

## **REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

Adelaja B. (1995). Técnica de multiplicación rápida en la explotación de bananos y plátanos. *Musafrica* 12(8): pág.6.

Alves E.; Oliveira M. (1993). Selección de material de propagación para siembra. CNPMF. Cruz das Almas. 2 p. *Compendiado en: Musarama (FR)*. 1993. 6(3): pág. 12.

Alzab C.; Abad M. (1996). Los sustratos en horticultura. *Revista Agrícola Vergel*. B: pág.146-152.

APROCSAL (1994) De Comunidad a Comunidad. Boletín No. 7 Asociación de promotores.

Boulay, M. (1985) Some practical aspects and applications of the micropropagation of forest trees. *International Symposium in vitro Propagation of the forest Species*. Bolonga. Itatly

Caplin, S.M.; Steward, F.C (1948). Effect of coconut milk on the Growth of explants from carrot. *Science* 108: pág.655-657.

- Castillo N.E. (2002) Productos que se pueden obtener de la sábila Frontera activa Salud/ Aloe o sábila.
- CASELL,(1991), A.C., (1991) Problem tissue culture. Culture contamination. Em: P Debergh y R. H. zimmernan (Eds) micropropagation, pág. 31-45 Kluwer Academic publishers,Dordrecht.
- CIDEM (1996) Especificaciones del extracto acuoso de Aloe vera. Fábrica de Medicamentos de la Empresa Provincial de Farmacias y ópticas. Pinar del Río.
- Conaza. (1990) Sábila ( Aloe vera ( L) Burn ). Apuntes (Mimeografiado). Saltillo Coah. México.
- Conaza (1991). Expediente técnico para el establecimiento de plantaciones de sábila (Mimeografiado). Saltillo, Coah. México.bila (Aloe vera (L) Burn). Apuntes (Mimeografiado). Saltillo Coah. México.
- Conaza. (1992) Datos básicos para la Estrategia Nacional de Mediano Plazo (1992-1999) De Desarrollo y Promoción de Exportación de Sábila (Mimeografiado) Saltillo, Coah. México.
- Conaza (1992). Aspectos técnicos y socioeconómicos de la sábila (Mimeografiado) Saltillo, Coah. México.
- Cordeiro Z; Dos Santos Soares filho, W. (1991). Propagación de bananos por división de rizoma. EMBRAPA/CNPMF. Banana en foca. (45):1-2. *Compendiado en:* Musarama (FR). 1993. 6(2): pág. 5.
- Cosmética Marpoma, revista española (2002), disponible en S.L<http://www.gestiopolis.com/canales6/mkt/investigacion-productos-con-aloe.htm> consultado el 07 de enero del 2007.
- Cultivo de sábila. (2001), disponible en la Pág. wed. [http://www.aloetrade.com.ar/el\\_aloe/historia.php](http://www.aloetrade.com.ar/el_aloe/historia.php) consultado el 07 de enero del 2007.
- Crops Research Institute (CRI). (1995). Técnica de división de cormos: tecnología apropiada para la propagación rápida de retoños de plátano. Musafrika 3(6): pág.1-2.



- Debergh, P. (1982) Physical properties of culture media emi fujiwara, A. Celd Plant tissue culture 1982 Japón Assoc. Plant tissue culture Tokyo pág.135-126.
- Debergh, P.C. e I.J. Maene, (1981).Ascheme for commercial Propagation plants of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort 14: pág. 335-345.
- Departamento Agroindustrial Fundación Chile, Enero (2003), disponible en [http://www.herbogeminis.com/propiedades\\_y.htm](http://www.herbogeminis.com/propiedades_y.htm) consultado el 12 de diciembre del 2006.
- Drew, R.A. (2003): "Applications of Biotechnology to Fruit and Nut Species".
- Dr. González, S.; Biotecnología Vegetal. "Métodos de Propagación "in vitro" en Plantas", Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Biología.
- Gamborg, O.L. (1968) Plants Tissue culture Biotechnology. In his Milestones "in vitro" cellular and Developmental Biology – Plants Cambriolge. Pág.84-92.
- García, M (2000) Propagación clonal "*in vitro*" del Eucalipto saligna. Pinar del Río. Cuba 100h Tesis (en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Forestales) Ministerio de Educación Superior.
- Gautheret, R. (1959). La cultura des tisúes végetaux, techniques et réalisation. Paris, Masson Cie.
- Grattopaglia, D y Machado, M.A. (1990) Micro propagación In; Torres, A.S. y Caldas técnicas y aplicaciones de tejidos de plantas Brasilia: ABCTP/EMBAPAPACNPH; pág.433.
- Granados, S. y Castañeda, A. (1998). Sábila planta agroindustrial del desierto U. A. de Chapingo, México.
- Grisales, F. (1994). Técnica rápida de multiplicación de plátano en Colombia. INFOMUSA (FR) 3(2): pág.7.
- Haddad G; Haddad O; Rodríguez H; Pargas R; Manzanilla E; Muñoz D. (1994). Multiplicación del plátano 'Hartón enano' mediante secciones de

Cormos. *In* Congreso Nacional de Fruticultura (5, 1994, Maracay). 1994, resúmenes. Maracay. pág. 56.

Haberlandt, G (1902), Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sber. Akad Wiss.Wien 111: pág.69-92.

Herman, E.B., (1987). Toward control of micro propagation contamination. Agricell Report 9: pág.33-35.

Hormonas, auxina, disponible en la pág. wed <http://www.aldeaeducativa.com/auxinas.htm>, consultado el 21 de enero del 2007.

Hu, C.V. and J.P.Wang. (1983). Meristem, Shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D, A; Ammirato, P.V. y Yameda, Y. (eds). Macmillan Publishing, New York. V. 1, pág.177-227.

Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC. (2002). disponible en <http://www.inec.ec>, consultado el 18 de noviembre del 2006.

INFOAGRO, cultivo del plátano, disponible en [www.infoagra.com](http://www.infoagra.com) fecha de consulta domingo 26 de noviembre del 2006.

Kartha, K. (1981). Meristem cultura and Cryopreservation: Methods and applications. En: Plant Tissue Culture, Methods and applications in Agriculture. T.A.Thorpe (Ed). New York: Academic Press. pág.118-211.

Kolloge, s. (1.997). Stainable agriculture. Agenda 2-The implementation of the action programme by the E.U. common agricultural policy.Plant reseach and development. Vol 45:8-21.

Mc Comb, J.A and Newton, I.J. (2003). Vegetative propagation of Eucalyptus: Using tissue culture and its application to forest improvement in Western Australia. In Proceeding <sup>5th</sup> International Congress on plant tissue and cell culture. Ed. A. Fujiwara. Tokyo, Japón, pág.721-722.

Morel, G. (1951). Tissue culture of Monocotyledons. Amer. J. Bot. 38: pág.138-140.

Muir, W. H. (1953). Culture condition favouring the isolation and growth of single Cells from higher plants in vitro. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison.

- Murashige, T y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, physical. *Plants* pág. 473-497.
- Nickel, L.G. (1956). The continuous submerged cultivation of plant tissue as single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 42: pág. 848-850.
- Nitsch, J.P. (1969) Experimental androgenesis in *Nicotiana glauca* pág. 383 – 404.
- Nitseh, J. P. (1962). Composés phénoliques et résistance végétale. *Ann. Physiology. Veg.* 4: pág. 211-225.
- Orellana, P. (1994). Tecnología para la micro propagación in Vitro de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. Universidad Central de las Villas.
- Paulet, P. (1970). Role des composés phénoliques dans organogénèse: Mémoires 1970. Société Botanique de France. P. pág. 91-94.
- Pérez L. (1992). Comparación de varios métodos de propagación en banano. *Corbana (CR)*. 16(38): pág. 28-33.
- Pérez J., (1994) Instructivos Técnicos de la micro propagación de in Vitro en la caña de azúcar y el plátano. Ediciones internas. Universidad central de las Villas. Santa Clara.
- Pérez Ponce, J. N.; P. Orellana.; M. Suárez y Valdez. (1998). Propagación masiva en biofábricas. En *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. P. 241-258. Pérez Ponce, J. N. (ed) Ediciones GEO. Cuba.
- Pérez Ponce, J.N. (1998). Propagación y mejora Genética de plantas por biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 390p.
- Pérez Ponce, J.N.; Miguel Suárez Catello Y Pedro Orellana Pérez (2000) Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba . *Biotecnología Vegetal* 200, 1:3-12. Instituto de la Biotecnología de las Plantas V.C.
- Rechinger, C. (1983). Untersuchungen über die Grenzen der Teilbarkeit im Pflanzenreich. *Abb. Zool. Bot. Ges., Wien*. 43: pág. 310-334.

- Retamar, J. A. (1995). Dos especies del género Aloe: Aloe arborescens Mill y Barbadosensis Mill. En *Essenze derivati agrumari*, N° 2, 1995.
- Rodríguez H, Echeverría HI (2002). Efectos alelopáticos de *Aloe vera* sobre otras especies de plantas medicinales en condiciones de laboratorio. *Rev Cubana Plant Med.* 7.
- Rodríguez H, Echeverría I. (2004). Efectos estimuladores del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de *Aloe vera* (L.) Burm. *Rev. Cubana Plant Med.* pág. 9.
- Rodríguez H. Echevarría I. (2006). Gel de Aloe vera L. N.L. Burm y harina de sagú como soporte sólido de medios de cultivo para plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* pág.11 (1).
- Salisbury F/Ross. C (1994). *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana.
- Sandoval J; Brenes G; Pérez L. (1991). Micro propagación de plátano y banano en el CATIE. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 186 p. (Serie Técnica. Informe técnico 22).
- Shants E. M. (1966). Chemistry of naturally occurring growth-regulatory substances *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 17: pág.09-438.
- Sivory M. /Caso O. (1980). *Fisiología Vegetal*. Editorial Hemisferio Sur
- Steward, F. C. (1951). A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut Milk. *Science* 113: pág. 518-520.
- Steward, F. C. (1959). The chemical regulation: Some substances and extracts which induce growth morphogenesis. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 10: pág.379-404.
- Skoog, F. y Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in Plant tissue culture in vitro: *Symp. Soc. Exp. Bio.* 11: pág. 118-131.
- Styer, D.J. y chin, C.K. (1983) Meristem and shoot – tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservatiobn pág.221 – 277.

Técnicas de biocelular, revista molecular disponible en la Pág. web <http://Www.Ub.Es/Biocel/Wbc/Tecnicas/Cap3.Htm> consultado 21 de noviembre del 2006.

This document was created with FREE version of Easy PDF.Please visit disponible en <http://www.visagesoft.com> for more details consultado el 07 de enero del 2007.

Vásquez E. y S. Torres Fisiología Vegetal " Ed. Félix Varela, Habana 2001 p pág.442.

Vasil C. (1994). Phenotycarol genotypic atability of tissue cultured plants H(Ed): pág. 73-91.

Van Overbeek, J., Conklin, M. E. and Blakeslee, A. F. (1941). Factors in coconut milk essential from growth and development of very young Datura embryos Science 94: pág.350-351.

Vickery, A R. (1994)" Aloe" En: G. Davidse, M. Sousa y A Chater (ed.) Flora mesoamericana. Vol. VI. UNAM, Missouri Botanical Garden, the Natural History Museum. México. pág. 31.

White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips. a liquid medium. Plant Physiology. 9: pág. 585-600.

Yaron, A. (1995). Characterization of Aloe Vera gel before and after auto degradation, and stabilization of the natural fresh gel. Phototherapy Research, 7: Special Tissue, pág.11-513.