

Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila)

Ángela María Matos Acurero

Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,
Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 23-03-06 Aceptado: 26-06-07

Resumen

Se logró la optimización de un protocolo para la micropropagación eficiente de *Aloe vera* L. (Zábila) a partir de yemas apicales utilizando medio Murashige y Skoog (MS) con sacarosa 3%, agar 1% y diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas. Las tasas de multiplicación más altas se obtuvieron con $2,69 \times 10^{-6}$ M de ácido naftalenacético (ANA) y $2,32 \times 10^{-5}$ M de kinetina. Asimismo, se probaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico y distintas condiciones de fotoperiodo. La concentración de ácido ascórbico que dio mejores resultados fue $5,7 \times 10^{-3}$ M, mientras que con 12 h de luz las tasas de multiplicación fueron más altas. El enraizamiento se logró sin necesidad de reguladores del crecimiento, mientras que la supervivencia de plantas bajo condiciones de invernadero fue del 71%. Estos resultados demuestran que el cultivo *in vitro* puede permitir la producción de gran número de plantas de *A. vera*, de gran importancia medicinal e industrial.

Palabras clave: *Aloe vera*; ANA; cultivo *in vitro*; kinetina; micropropagación.

Optimisation of the *in vitro* culture protocol for *Aleo Vera* L. (Zábila)

Abstract

It was established an optimised *in vitro* culture for efficient micropropagation of *Aloe vera* L. Murashige & Skoog (MS) basal medium was used supplemented with 3% sucrose and 1% agar. Different combinations of auxins and cytokinins were tested for apical buds proliferation activity. Higher multiplication rates were found with naftalen acetic acid (NAA) $2,69 \times 10^{-6}$ M and kinetin $2,32 \times 10^{-5}$ M. On the other hand, different concentrations of ascorbic acid and photoperiod conditions were probed. The best ascorbic acid concentration was $5,37 \times 10^{-3}$ M while it was found higher multiplication rates with 12h day light. Plants rooted well without plant regulators and it was observed a 71% plant survival under greenhouse conditions. These results showed that *A. vera in vitro* cultures can increased the number of plants.

Key words: *Aloe vera*; *in vitro* culture; kinetin; micropropagation; NAA.

Introducción

Aloe vera L. (Zábila) es una planta originaria de Sudáfrica (1-3), sin embargo, puede encontrarse en todo el continente africano y en las zonas más cálidas de América, Grecia, Italia y España (3, 4). Es de gran importancia por la cantidad de propiedades medicinales y cosméticas que posee. En este sentido, el cultivo in vitro se ha utilizado para la obtención de plantas de interés, ya que, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, se pueden desarrollar cientos de plantas en corto tiempo.

Los primeros en trabajar con cultivos in vitro de aloe fueron Groenewald y sus colaboradores (5), quienes lograron organogénesis en *A. pretoriensis*. Posteriormente, Racchi (6) obtuvo callos a partir de *A. ferox* Mill. En *A. vera*, la micropropagación ha sido lograda por Natali *et al.* (7), Meyer y van Staden (8) y Roy y Sarkar (9) utilizando medio MS.

La alta demanda comercial de zábila que existe hoy en día, ha hecho que el cultivo tradicional de esta planta se haga insuficiente para satisfacer el mercado actual; además, el establecimiento de cultivos in vitro es realmente dificultoso, por el alto contenido de compuestos fenólicos que causan oxidación de los medios. Esta serie de hechos y la urgente necesidad de propagar masivamente el aloe dada su importancia económica y medicinal, han conducido al mejoramiento de los métodos de propagación in vitro de *A. vera* con el objeto de incrementar la población de plantas y abaratar los costos por unidad. Por ello, este trabajo plantea la optimización de un protocolo de micropropagación para la obtención de gran número de plantas de *A. vera* a partir de yemas apicales. Se probarán diferentes condiciones de fotoperiodo y distintas combinaciones hormonales con el objeto de obtener altas tasas de multiplicación y plantas regeneradas que puedan ser aclimatadas.

Materiales y Métodos

Material vegetal y medios de cultivo

Las semillas de *A. vera* utilizadas en el presente trabajo fueron donadas por Joseph Clemens, de la Universidad de Arizona (USA) y se mantuvieron en nevera a 4°C hasta su utilización.

Los explantes de yemas apicales se obtuvieron de plántulas normales de 2 a 3 meses de edad crecidas in vitro a partir de semillas germinadas en agar 1% en condiciones estériles. Posteriormente, las yemas apicales fueron aisladas y se colocaron en frascos de cultivo (SIGMA) con 25 ml de medio MS (10), con sacarosa 3%, agar (SIGMA) al 1% y pH entre 5,7-5,8.

Los medios de cultivo, material de vidrio y utensilios se esterilizaron durante 20 min a 1 atmósfera de presión y 121°C. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar.

Diez yemas apicales provenientes de plántulas obtenidas de semillas se sembraron en medio MS sin hormonas y en cada uno de los medios descritos en la Tabla 1 (una yema por frasco de cultivo). De igual manera, se sembraron 10 yemas bajo diferentes fotoperiodos (12 y 16 h de luz) iluminadas con fluorescentes Grolux (F15 WT8/GRO) con intensidad de $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en cada cámara, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizaron subcultivos mensuales y se valoró la respuesta midiendo la tasa de multiplicación en cada subcultivo, expresada como el número de nuevas yemas formadas a partir del explante inicial.

La tasa de multiplicación obtenida en cada subcultivo y la longitud alcanzada por los nuevos brotes se expresaron como la media de todos los datos existentes, con un mínimo de 5 datos por cada medio de cultivo. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 1
Combinación de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo para la multiplicación de las yemas (concentración en M).

Medio de Cultivo	Auxinas		Citoquinina
	2,4D ¹	BA ²	Kin ³
MS(0)	–	–	–
MS (1)	9,05x10 ⁻⁸	2,22x10 ⁻⁶	–
MS (2)	2,26x10 ⁻⁶	4,4x10 ⁻⁶	–
MS (3)	4,52x10 ⁻⁶	2,22x10 ⁻⁵	–
MS (4)	2,26x10 ⁻⁶	–	4,65x10 ⁻⁷
MS (5)	4,52x10 ⁻⁶	–	9,29x10 ⁻⁷
MS (6)	4,52x10 ⁻⁶	–	2,32x10 ⁻⁶
MS (7)	4,52x10 ⁻⁶	–	2,32x10 ⁻⁵
MS (8)	4,52x10 ⁻⁷	–	2,32x10 ⁻⁵
MS (9)	2,26x10 ⁻⁶	–	2,32x10 ⁻⁵
MS (10)	4,52x10 ⁻⁶	–	2,32x10 ⁻⁵
	ANA ⁴	–	2,32x10 ⁻⁵
MS (11)	5,37x10 ⁻⁷	–	2,32x10 ⁻⁵
MS (12)	2,69x10 ⁻⁶	–	2,32x10 ⁻⁵

¹ 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. ² BA: 6-benciladenina. ³ Kin: kinetina. ⁴ ANA: ácido naftalenacético.

Utilización de antioxidantes en el medio de cultivo

Para evitar la oxidación y necrosamiento de los explantes, se probaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico que se añadieron al medio de cultivo. Estas fueron: 5,68x10⁻⁴; 2,9x10⁻³; 5,7x10⁻³ y 2,8x10⁻² M.

Enraizamiento y Aclimatación

Las yemas formadas en los medios fueron colocadas en medio MS con las sales reducidas a la mitad para el enraizamiento de las mismas. El proceso de aclimatación de las plantas in vitro consistió en: a) transferencia a un sustrato estéril turba-perlita (1:1), durante 30 días y b) transferencia a macetas en invernadero con sustrato de igual proporción que en la fase anterior, con humedad relativa del 80-100%.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados de los experimentos fueron estudiados mediante análisis de varianza de un factor y las diferencias entre medias se estimaron empleando el test de Duncan para un nivel de significación del 95% (p≤0.05).

Resultados y Discusión

Efecto del ácido ascórbico sobre la oxidación del medio de cultivo

Cuando se inició la siembra de yemas, se observó que éstas producían callos basales que al poco tiempo morían necrosados. En este sentido, Roy y Sarkar (9) utilizaron diferentes tipos de antioxidantes, entre ellos, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico y carbón activado (0,5-1,0 mg/L). En el

presente trabajo, de acuerdo con lo descrito por Rout *et al.* (11), se añadió ácido ascórbico al medio de cultivo; la mejor concentración fue $5,7 \times 10^{-3}$ M, observándose que los porcentajes de necrosamiento disminuían y que el color de los callos fue cambiando gradualmente de marrón a verde (Tabla 2). Además cuando los medios comenzaban a tomar color marrón, se pasaban a medio fresco para evitar su oxidación total.

Efecto del fotoperiodo en la multiplicación de yemas

Otro de los factores físicos importantes para el establecimiento de cultivos de tejidos es el fotoperiodo. En este trabajo, las yemas de *A. vera* colocadas en fotoperiodo de 12 h presentaron tasas de multiplicación superiores a aquellas con fotoperiodo de 16 h. Con 12 h, el número medio de nuevas yemas fue de 3,4 mientras que con fotoperiodo de 16 h la tasa de multiplicación máxima fue 2,3. Además, con 12 h, la tasa de multiplicación superior a 2 yemas nuevas comenzó a observarse a partir del cuarto subcultivo y sólo descendió a partir del décimo cuando el potencial genético disminuye por envejecimiento; sin embargo, con 16 h solamente el sexto subcultivo mostró una tasa superior a 2 (Figura 1). Otros autores han realizado estudios para observar el efecto del fotoperiodo en los cultivos. Tsuro *et al.* (12) usaron luz continua para

optimizar la multiplicación de yemas en *Lavandula vera*. En *A. vera* se ha utilizado luz continua para aumentar la tasa de multiplicación en cultivos de meristemos (7). Kintzios y Taravira (13) observaron que los cultivos de *Cucumis melo* se comportaban de forma distinta al ser incubados bajo diferentes condiciones de luz. Según los resultados presentados en este trabajo, en *A. vera* el fotoperiodo influye de manera importante en la tasa de multiplicación ya que con 12 h las tasas de multiplicación fueron más altas que con 16 h de luz. Por ello, en adelante, todas las yemas fueron cultivadas en fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Multiplicación de yemas apicales en medio MS sin hormonas (MS0)

Inicialmente, las yemas de *A. vera* fueron sembradas en medio MS sin hormonas (MS0), como medio control. Las yemas se mantuvieron en cultivo durante 12 meses, con subcultivos cada 30 días.

Como se observa en la Figura 2, la tasa de multiplicación aumentó a partir del quinto subcultivo, con una tasa máxima media de 2,745 yemas nuevas por explante con una longitud media máxima de 2,068 cm. A partir del séptimo subcultivo, la tasa de multiplicación comienza a disminuir, igualmente la longitud de las yemas.

Tabla 2
Efecto del ácido ascórbico sobre la oxidación por compuestos fenólicos en callos provenientes de yemas apicales de *Aloe vera* L.

Conc. ácido ascórbico (M)	Número de Callos	% de oxidación	% de necrosis
$5,7 \times 10^{-4}$	35	77	37
$2,9 \times 10^{-3}$	27	74	14
$5,7 \times 10^{-3}$	15	13,3	0
$2,8 \times 10^{-2}$	15	20	0

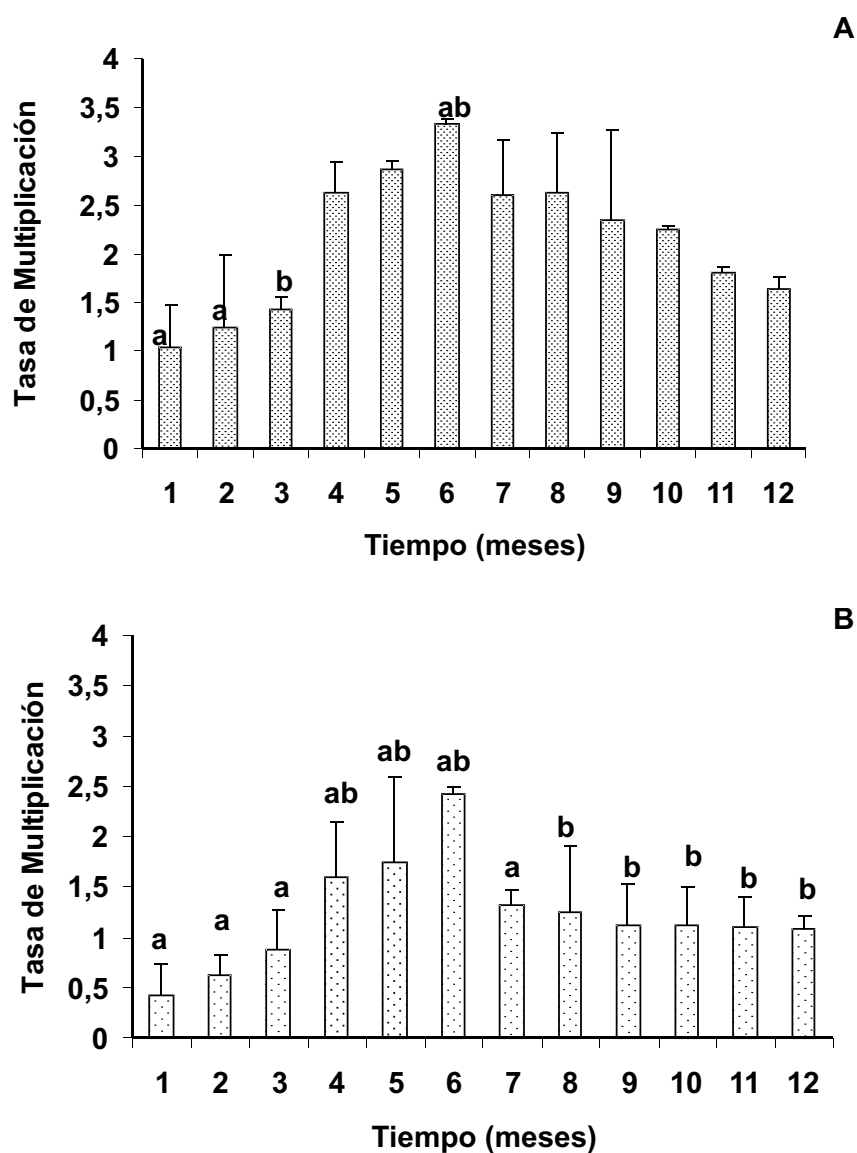


Figura 1. Multiplicación de yemas de *Aloe vera* en diferentes fotoperiodos. A: Fotoperiodo de 12 h de luz y B: Fotoperiodo de 16 h de luz. Valores con la misma letra o sin ella no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ (test de Duncan).

Efecto de la concentración hormonal sobre la multiplicación de yemas apicales

Las yemas apicales también se sembraron en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, con el fin de evaluar su efecto en la multiplicación y elongación de dichas yemas. Se

mantuvieron durante un periodo mínimo de 12 meses, con subcultivos cada 30 días.

De los medios probados, solamente se muestran los resultados de los medios MS3, MS4, MS8, MS9, MS10, MS11 y MS12, ya que fueron los que permitieron la obtención de mayor cantidad de material. A los medios MS3, MS4, MS8, MS9 y MS10, se les

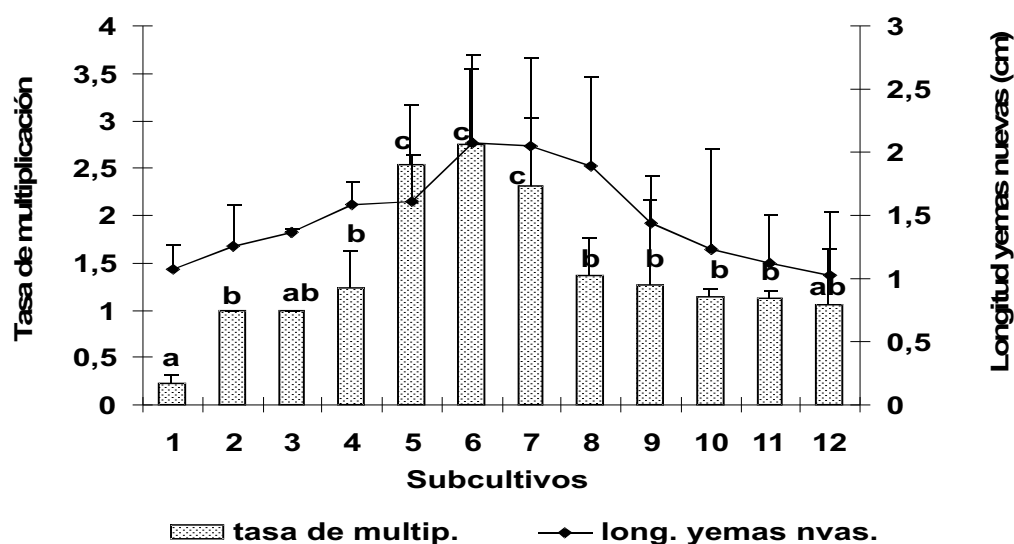


Figura 2. Tasa de multiplicación y longitud de yemas nuevas (media \pm D.E.) en medio Murashige y Skoog sin hormonas (MS0). Valores con la misma letra o sin ella no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ (test de Duncan).

adicionó 2,4-D como auxina mientras que los medios MS11 y MS12 contenían ANA.

La mayoría de los estudios en *Aloe* se han realizado utilizando 2,4-D como auxina. En los medios utilizados en este trabajo, se experimentó no sólo con esa auxina sino que también se probó ANA, combinando éstas con diferentes citoquininas, encontrándose las tasas de multiplicación más altas con las combinaciones entre ANA y kinetina. Por ejemplo, en el medio MS11, suplementado con $5,37 \times 10^{-7}$ M de ANA y $2,32 \times 10^{-5}$ M de kinetina, la tasa máxima de multiplicación fue de 4,8 yemas nuevas, sin embargo, al aumentar la concentración a $2,69 \times 10^{-6}$ M de ANA en MS12, manteniendo la misma concentración de kinetina, la tasa de multiplicación casi se duplicó, por lo que una relación 1:10 de auxina/citoquinina resultó óptima para la multiplicación (Figura 3). Meyer y van Staden (8), también obtuvieron altas tasas de multiplicación utilizando medio MS con $4,8 \times 10^{-6}$ M de ANA aunque sin añadir citoquinina. Otros autores han utilizado la combinación ANA/BA para micropropagar plantas del género *Aloe* (14-16).

Por el contrario, en otros estudios (5, 7, 9) se han obtenido tasas de multiplicación más altas utilizando 2,4-D más kinetina. En los ensayos llevados a cabo con los medios utilizando 2,4-D como auxina, el medio que resultó más efectivo fue el MS4 con $2,26 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D y $4,65 \times 10^{-7}$ M de kinetina, seguido del medio MS3 que contenía $4,52 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D y $2,22 \times 10^{-5}$ M de BA (Figuras 4 y 5). Iguales resultados obtuvieron Natali *et al.* (7), quienes lograron micropropagar *A. vera* con 2,4-D y kinetina; no obstante, cuando usaron 2,4-D y BA, observaron oxidación y formación de callos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que fue necesaria la presencia de auxinas y citoquininas para que se produzca una mayor proliferación de las yemas y que la combinación ANA/kinetina fue mejor que la de 2,4-D/kinetina para inducir la multiplicación de yemas en *A. vera*.

En cuanto a las longitudes de las yemas nuevas, en los medios MS11 y MS12, se encontró que al aumentar la concentración de ANA disminuye la longitud de las yemas obtenidas, igual ocurrió con los medios MS8,

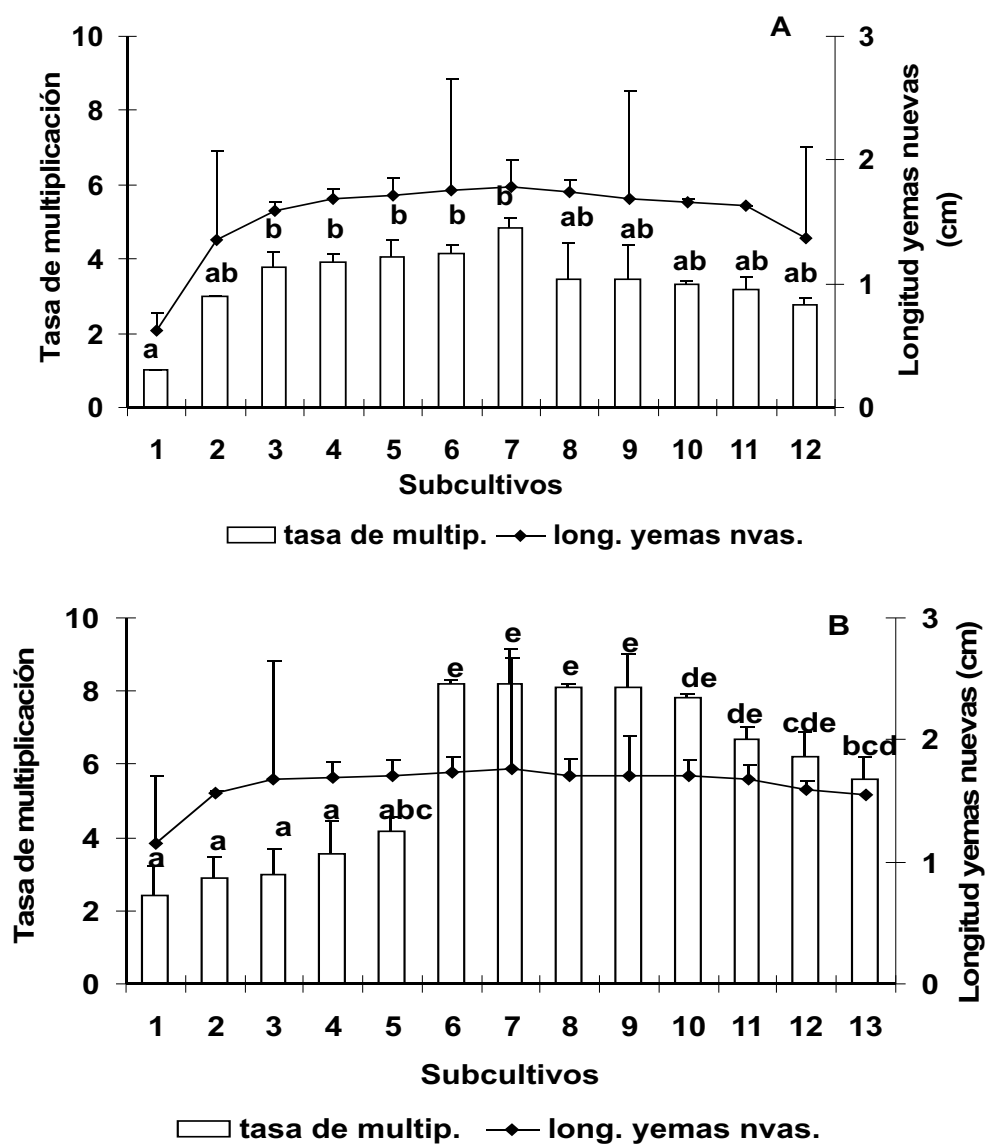


Figura 3. Tasa de multiplicación y longitud de yemas nuevas (media ± D.E.) en medios de cultivo utilizando ANA como auxina combinada con $2,32 \times 10^{-5}$ M de kinetina. **A**, medio MS11, con $5,37 \times 10^{-7}$ M de ANA y **B**, medio MS12 con $2,69 \times 10^{-6}$ M de ANA. Valores con la misma letra o sin ella no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ (test de Duncan).

MS9 y MS10 (Figura 5), al aumentar la concentración de 2,4-D. Sin embargo, las longitudes máximas se encontraron en el medio MS0, que no contenía hormonas, posiblemente porque en este medio se desarrolló menor número de yemas.

Se observó la existencia de una relación entre la tasa de multiplicación y la longitud de las yemas obtenidas, ya que, al aumentar la tasa de multiplicación también aumentaba la longitud de las yemas nuevas y al bajar ésta, disminuía el tamaño, independientemente del medio de cultivo usado, debido,

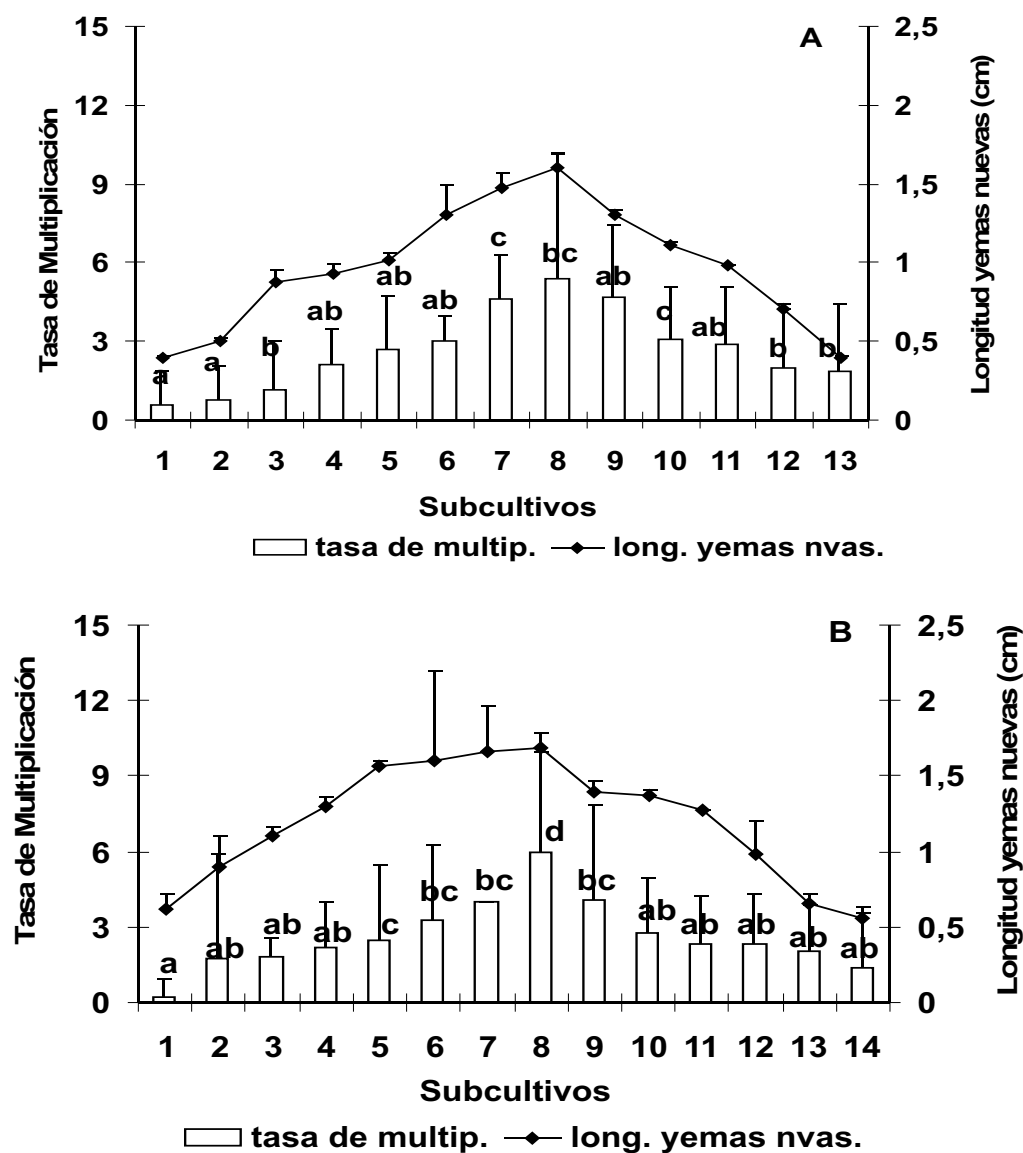


Figura 4. Tasa de multiplicación y longitud de yemas nuevas (media \pm D.E.) en medios utilizando 2,4-D como auxina. A. Medio MS3 con $4,52 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D y $2,22 \times 10^{-5}$ M de BA y B. Medio MS4 con $2,26 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D y $4,65 \times 10^{-7}$ M de kinetina. Valores con la misma letra o sin ella no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ (test de Duncan).

probablemente, al descenso de la capacidad de multiplicación de los cultivos (17).

El análisis estadístico realizado para comparar la capacidad de multiplicación de las yemas apicales en los medios, mostró que el medio MS12 permitió obtener las ta-

sas de multiplicación más elevadas durante más tiempo.

Las yemas obtenidas, independientemente del medio empleado, presentaron aspecto normal, con presencia de raíces en todos los medios (Figura 6).

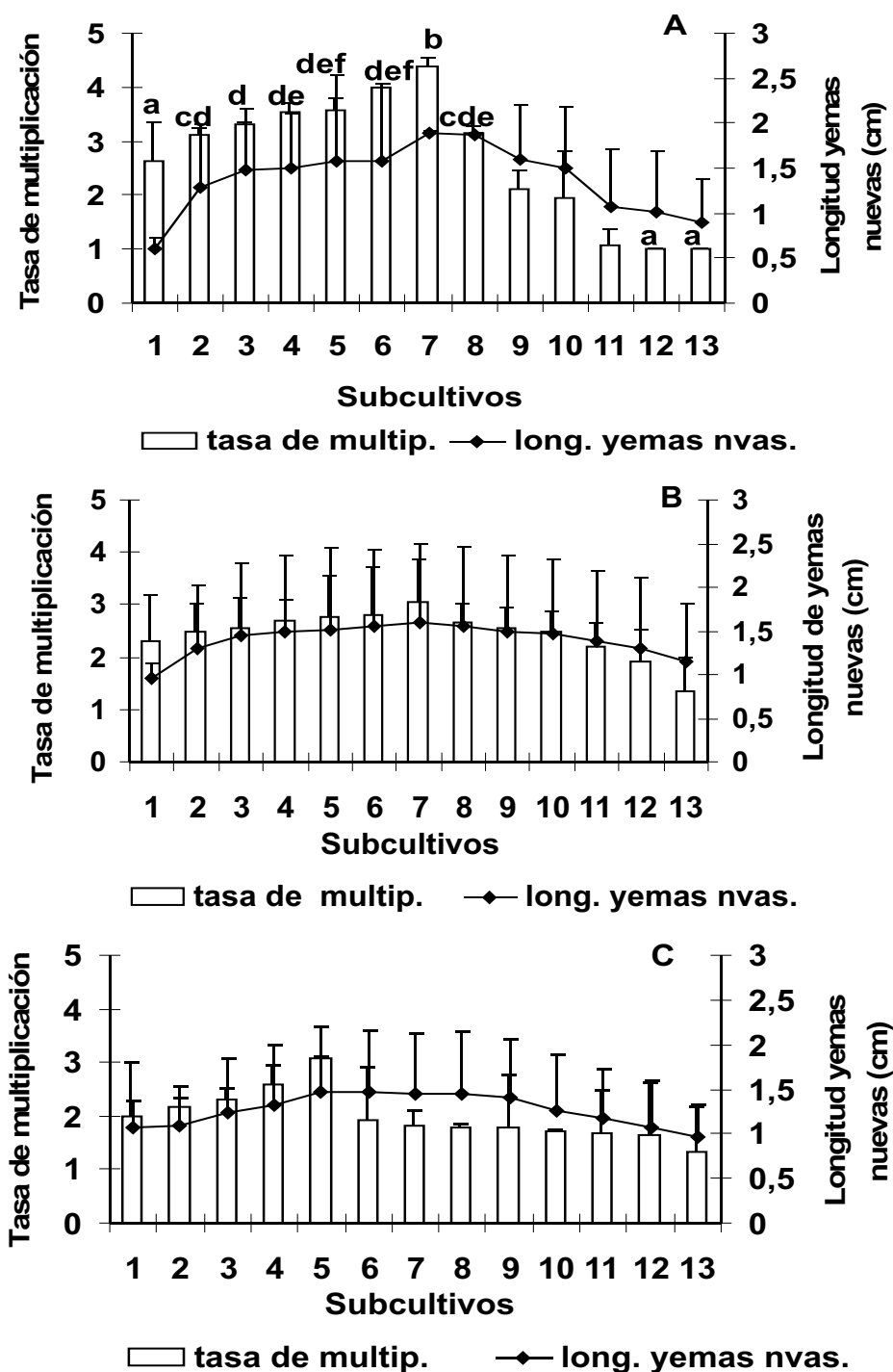


Figura 5. Tasa de multiplicación y longitud de yemas nuevas (media ± D.E.) utilizando 2,4-D como auxina combinada con $2,32 \times 10^{-5}$ M de kinetina. A, medio MS8, con $4,52 \times 10^{-7}$ M de 2,4-D, B, medio MS9, con $2,26 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D y C, medio MS10, con $4,52 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D. Valores con la misma letra o sin ella no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ (test de Duncan).

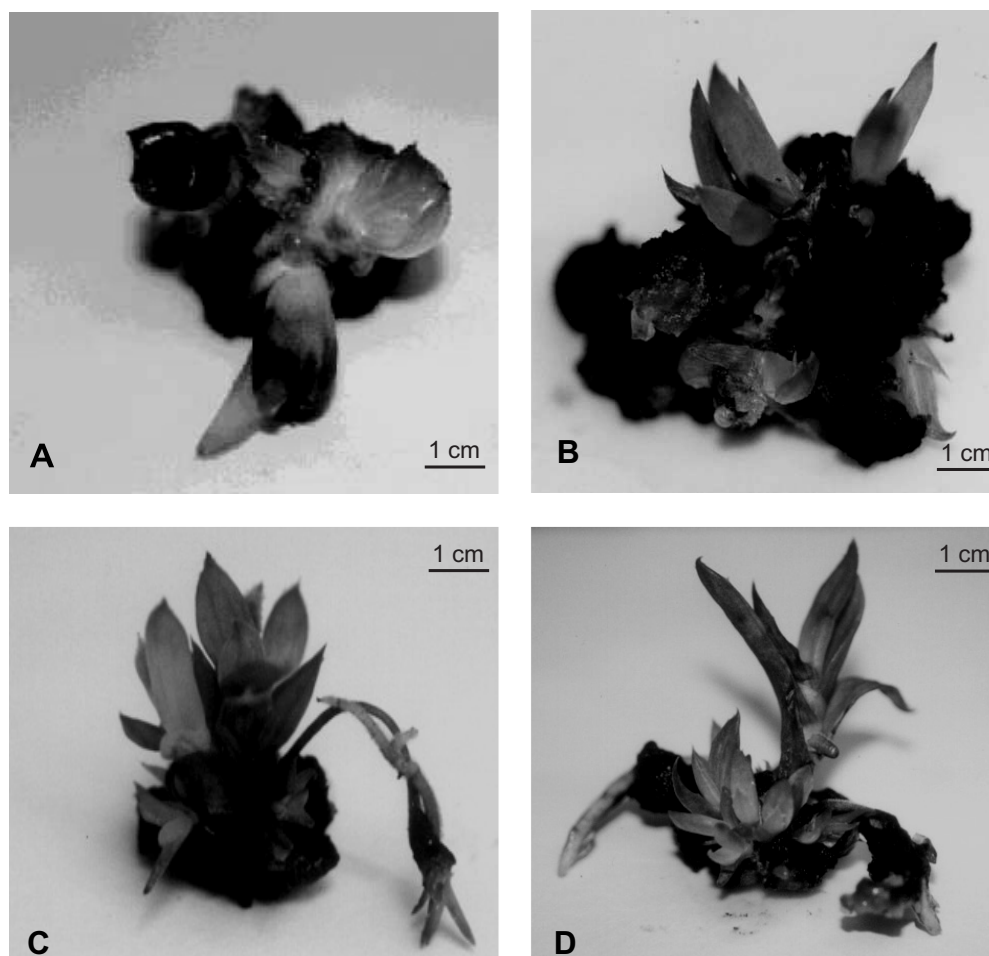


Figura 6. Yemas apicales de *Aloe vera*. A. En medio MS3 (2,4-D/BA), B. En MS4 (2,4-D/kinetina), C. Formación de estolón en yema en medio MS4, D. Formación de raíces y yemas. La barra representa 1 cm.

Enraizamiento y Aclimatación

El enraizamiento y aclimatación de las yemas obtenidas, se llevó a cabo con éxito en todos los medios (Figura 7A). Las raíces obtenidas en el medio control MS0 eran finas y ramificadas, en los otros medios se observaron raíces gruesas que permitían mantener el peso de la planta en el medio de cultivo (Figura 7B). La capacidad de enraizamiento depende de la interacción de complejos factores externos e internos (18). Así, en este trabajo, la mayoría de las plantas, en todos los medios usados, formaron raíces, por lo que no fue necesario el uso de reguladores

para inducir enraizamiento, quizás porque la concentración endógena de auxinas en esta planta es suficientemente alta como para promover el enraizamiento (19). Iguales resultados han sido descritos por Natali *et al.* (7) en *A. vera*, por Chukwujekwu *et al.* (19) en *A. polyphylla*, y por Skirvin y Chu (20) en cultivares de rosa. La funcionalidad de las raíces quedó demostrada con la supervivencia de las plantas durante la aclimatación.

Para la aclimatación de las nuevas plantas, éstas se transfirieron a recipientes

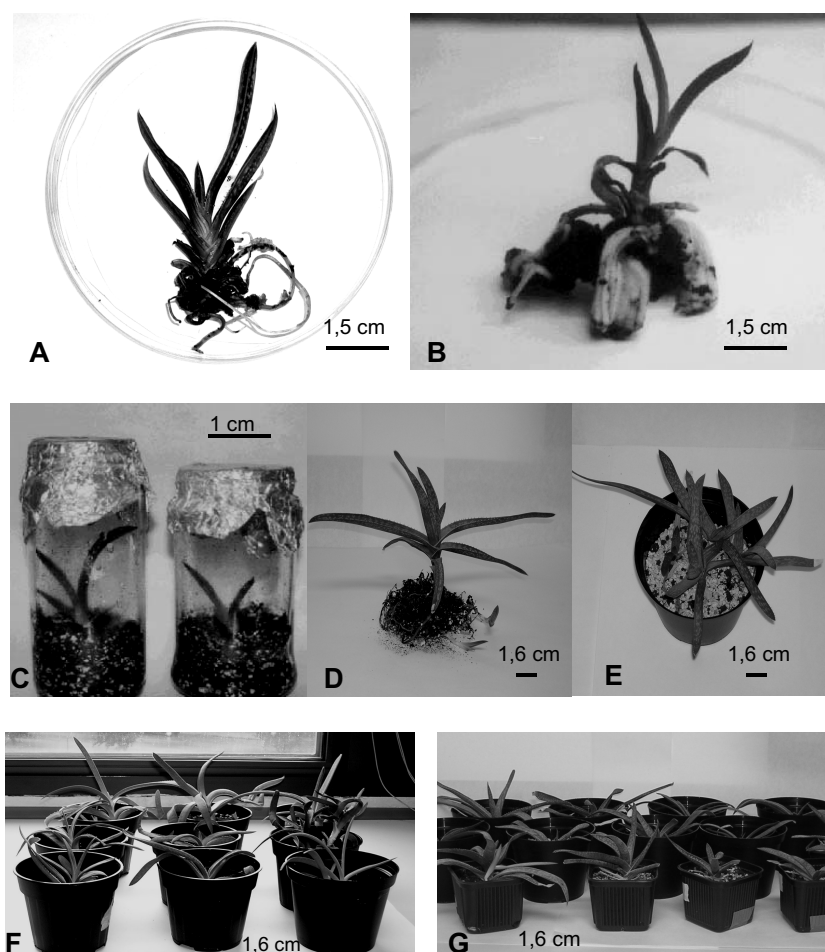


Figura 7. A. Raíces en medio MS0. B. Raíces en medio MS4. C., D. y E. Plantas de *Aloe vera* en fase de aclimatación. F. Plantas multiplicadas con fotoperiodo de 12 h de luz. G. Plantas multiplicadas con fotoperiodo de 16 h de luz.

con apertura gradual para la adaptación a condiciones ex vitro (no estéril y menor humedad relativa). Durante esta fase se obtuvo 100% de supervivencia. Finalizada la etapa anterior, las plantas se transfirieron a invernadero. En el momento de transferir las plantas a invernadero, la longitud media era de 5 cm, después de 6 meses, las plantas presentaban una longitud media de 11,25 cm (Figura 7C-E).

Se demostró que la capacidad de las plantas de *A. vera* para resistir la aclimata-

ción depende del fotoperiodo, ya que las que se multiplicaron con 12 h de luz presentaron un 71% de supervivencia en invernadero mientras que aquellas que se multiplicaron con 16 h luz, mostraron sólo un 50% de supervivencia. No se observaron diferencias en cuanto a la aclimatación entre los distintos medios utilizados. En cuanto a la morfología de las plantas, las obtenidas con 12 h de luz presentaban color verde intenso, mientras que las que crecieron con 16 h de luz, tenían color verde-marrón (Figura 7F-G).

Conclusiones

El protocolo desarrollado para la multiplicación de *A. vera* a partir de yemas apicales permite obtener buenas tasas de multiplicación utilizando ANA y kinetina. La adición de ácido ascórbico al medio de cultivo y la exposición de los cultivos a un fotoperiodo de 12 h de luz también son factores importantes. El enraizamiento ocurre in vitro, independientemente del medio de cultivo y sin aplicación de hormonas. La aclimatación se logró con altos porcentajes en invernadero.

Sin duda, los resultados obtenidos en el presente trabajo servirán de base para otros estudios y pueden ser aplicados para incrementar la población de plantas y contribuir, así, a satisfacer la alta demanda comercial de esta planta.

Agradecimientos

La autora agradece a Joseph Clemens de la Universidad de Arizona (U.S.A.) por la donación de las semillas de *Aloe vera* y a Lucía Medina y Marien De Bernardo por la asistencia técnica.

Referencias Bibliográficas

- BALLESTER J. **Los cactus y las otras plantas suculentas** Floraprint España, S.A. Valencia, España, 1978.
- IZCO J., BARRENO E., BRUGUÉS M., COSTA M., DEVESA J., FERNÁNDEZ F., GALLARDO T., LLIMONA X., SALVO E., TALAVERA S., VALDÉS B. **Botánica** McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, 1997.
- BRUNETON J. **Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants** Second Edition. Intercept Ltd., U.K., 1999.
- REYNOLDS G.W. **The Aloes of Tropical Africa and Madagascar** The Trustees of the Aloes Book Fund, Mbabane, 1966.
- GROENEWALD E.G., KOELEMEN A., WESSELS D.C.J. **Pflanzenphysiol** 75: 270-272, 1975.
- RACCHI M.I. Plant regeneration from callus culture of *Aloe ferox*. **Proc Int Congr Plant Tissue Culture** Bogotá, 1987.
- NATALI L., CASTORENA SÁNCHEZ I., CAVALLINI A. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 20: 71-74, 1990.
- MEYER H.J., VAN STADEN J. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 26: 167-171, 1991.
- ROY S.C., SARKAR A. **Scientia Horticulturae** 47(1-2): 107-113, 1991.
- MURASHIGE T., SKOOG F. **Physiol Plant** 15: 473-497, 1962.
- ROUT G.R., SAMANTARAY S., MOTTLEY J., DAS P. **Scientia Horticulturae** 81: 201-228, 1999.
- TSURO M., KODA M., INOUE M. **Scientia Horticulturae** 86(1): 81-88, 2000.
- KINTZIOS S., TARAVIRA N. **Plant Breed** 116: 359-362, 1997.
- ZENG S., PENG X. **Zhong Yao Cai** 23(2): 63-65, 2000.
- ABRIE A.L., VAN STADEN J. **Plant Growth Regulation** 33: 19-23, 2001.
- LIAO Z., CHEN M., TAN F., SUN X., TANG K. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 76: 83-86, 2004.
- GEORGE E.F. En: **Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1: The Technology** 2nd. edition. Ed. Exegetics Limited. Edington, Wilts. England, 1993.
- HYNDMAN S.E., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. **Hort Sci** 17: 82-83, 1982.
- CHUKWUJEKWU J.C., FENNELL C.W. AND VAN STADEN J. **South African Journal of Botany** 68: 424-429, 2002.
- SKIRVIN R.M., CHU M.C. **Hort Sci** 14: 608-610, 1979.