

Multiplicación *in vitro* de zábila en sistema de inmersión temporal

In vitro multiplication of zábila on the temporary immersion system

J. Vilchez¹, O. Ferrer² y N. Albany³

²Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela.

²Laboratorio de Cultivo de Tejido, Facultad de Agronomía. LUZ.

³Departamento de Química, Facultad de Agronomía. LUZ.

Resumen

En la actualidad diferentes especies son multiplicadas vía organogénica en los sistemas de inmersión temporal, ya que permiten incrementar la eficiencia de la micropropagación. Por ello se estudió el efecto de tres frecuencias (2, 3 y 4 veces/día) y tres tiempos (1, 2 y 3 min) de inmersión sobre la longitud de los explantes (LE), número (NB) y longitud de los brotes (LB). Con una frecuencia de inmersión de tres veces al día se obtuvieron valores para el NB de 2,75, LE de 6,04 cm y LB de 0,85; y con la inmersión de 1 min se alcanzó una LE de 5,01 cm; siendo estos valores superiores a los obtenidos en la multiplicación *in vitro* de zábila en medio semisólido.

Palabras clave: *Aloe vera* (L.) *Burm. f.*, frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión, RITA®.

Abstract

Nowadays, different species are multiplied in a organogenic way in the temporary immersion systems, since they allow to increase the micro propagation efficiency. For this reason, the effect of three frequencies (2, 3 and 4 times/day) and three times (1, 2 and 3 min) of immersion on the longitude of the explant (LE), number (NB) and longitude of the buds (LB) was studied. With a immersion frequency of three times a day, values for the NB 2,75, LE of 6,04 cm and LB 0,85 were obtained; and with the immersion of 1 min a LE it was reached of 5,01 cm; being these values superior to those obtained in the in vitro multiplication of aloe between semisolid medium.

Key words: *Aloe vera* (L.) *Burm. f.*, immersion frequencies, immersion times, RITA®.

Recibido el 9-1-2007 ● Aceptado el 30-4-2007

Autor para correspondencia e-mail: jvilchez@cantv.net; nilca_albany@cantv.net

Introducción

Los medios de cultivo para la propagación de plantas, en su gran mayoría, son utilizados en estado semisólido, lo cual se logra con el empleo de distintos agentes gelificantes como el agar, gelrite o phytigel. Sin embargo, en los protocolos de micropropagación, la fase de multiplicación es la más costosa debido al uso de gelificantes en los medios de cultivos y mano de obra especializada (4).

La utilización de medios semisólidos tiene una serie de inconvenientes como son lo engorroso del proceso de preparación, dosificación y manipulación y el aumento de los costos por unidad. Además, algunos cultivos responden negativamente a la adición de gelificantes. Por estas razones, han propiciado el uso de medios de cultivos en estado líquido, los cuales están ampliamente descrito como vía de reducción de los costos para la propagación *in vitro*; además de posibilitar la automatización de la micropropagación (4). Sin embargo, tienen la limitante de que no todas las especies responden igual al crecimiento, ni todos los genotipos dentro de una misma especie se comportan de igual manera en los medios líquidos. Adicionalmente se ha observado una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos, aunque no

todos los genotipos reaccionan de forma similar (4).

Una limitante del uso de medios líquidos es un serio desorden fisiológico conocido como hiperhidricidad que puede ocasionar en algunos cultivos cuando son mantenidos en contacto permanente con el medio líquido. En el caso de la zábila se ha utilizado medios de cultivos líquidos agitados durante fase de multiplicación vía organogénica, obteniendo explantes con mayor altura al compararlos con los obtenidos en medios gelificados, pero de igual capacidad de brotación (1).

Actualmente se han diseñado equipos para la utilización de medios líquidos en para la propagación masiva de plantas, basados en una inmersión temporal de los explantes (6), donde los problemas de hiperhidricidad se minimizan; ya que los explantes son colocados en contacto con el medio solamente durante unos minutos con una determinada frecuencia diaria o mediante un sistema de burbujeo, y adicionalmente la intervención de la mano de obra disminuye.

En razón a lo expuesto anteriormente, se estudio del efecto del sistema de inmersión temporal sobre la multiplicación *in vitro* de zábila (*Aloe vera* (L.) *Burm. f.*).

Materiales y métodos

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía

de la Universidad del Zulia, durante el periodo comprendido entre Enero y Septiembre del 2006.

Se utilizaron vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) de cinco subcultivos de edad, las cuales eran subcultivadas cada cuatro semanas.

Se evaluó la multiplicación *in vitro* de zábila en sistemas de inmersión temporal. El sistema de inmersión temporal utilizado, la unidad RITA® (Recipiente de inmersión temporal automatizado; CIRAD, Francia) cuyo funcionamiento y características son descritas por Etienne *et al.* (2).

En un primer ensayo se evaluaron tres frecuencias de inmersión (2, 3 y 4 veces al día) con un tiempo de inmersión de dos minutos y en un segundo ensayo se evaluaron tres tiempos de inmersión (1, 2 y 3 minutos) con una frecuencia de inmersión de tres veces al día. Para cada ensayo se utilizaron cuatro RITA® por tratamiento, cada uno con 200 ml de medio de cultivo. En cada RITA® se cultivaron ocho explantes y el tratamiento testigo lo constituyó un grupo de seis frascos de 500 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo semisólido (6 g.L⁻¹ de agargel) con 8

explantes en cada uno. En todos los casos, el medio de cultivo utilizado fue el Murashige y Skoog (MS) (3) suplementado con 3% sacarosa, 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,6 mg.L⁻¹ de AIB.

Los ensayos se realizaron en una cámara de crecimiento a temperatura de 26°C y bajo luz blanca fluorescente constante (12 Klux).

Después de 4 semanas de cultivo se evaluó la longitud del explante (LE) inoculado, el número de brotes (NB) y la longitud de los brotes (LB) obtenidos en los diferentes tratamientos. La longitud del explante y de los brotes, fue medida desde la base de la vitroplanta hasta el extremo distal de la hoja mas larga.

El ensayo fue analizado estadísticamente mediante una prueba de varianza simple y el diseño experimental fue totalmente al azar. Cuando se detectaron diferencias estadísticas se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey. Para el procesamiento estadístico se empleó el software analítico Statistix versión 8.0.

Resultados y discusión

En el primer ensayo los explantes iniciaron la emisión de brotes a los 10 días de sembrados en los RITA® y a los 15 días en el medio semisólido.

El análisis estadístico detectó diferencias significativas con relación al efecto de la frecuencia de inmersión sobre las variables evaluadas (cuadro 1). Con la frecuencia de inmersión de tres veces al día, los explantes crecieron (LE= 6,04 cm) y se multiplicaron

en mayor medida (NB= 2,75), pero los brotes nuevos fueron de menor tamaño (LB= 0,85 cm), indicando esto que el efecto del tratamiento fue sobre la emisión de brotes y el crecimiento del explante, lo que pudo deberse al contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo en los RITA®, el cual esta reducido a una delgada capa de medio de cultivo que se adhiere a los explantes por cohesión, y que se renueva en cada nueva inmer-

Cuadro 1. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre el número de brotes por explante (NB), longitud del brote (LB) y del explante (LE) en vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Frecuencia de inmersión	NB	LB (cm)	LE (cm)
Testigo (medio semisólido)	1,84b	1,09a	5,36b
2	1,12b	1,02a	5,30b
3	2,75a	0,85b	6,04a
4	1,43b	1,05a	5,33b

Letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de d prueba de comparación de medias de Tukey.

sión, al igual que la atmósfera gaseosa en el recipiente de cultivo, permitiendo un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un intercambio gaseoso más eficiente (5). Sin embargo, Albany *et al.* (1), reportaron en la misma especie valores superiores para la variable NB con un promedio general de 3,75 brotes por explante en medios semisólidos y líquido en agitación durante la fase de multiplicación.

En el segundo ensayo el análisis estadístico sólo detectó efecto del tiempo de inmersión sobre la variable LE (cuadro 2), mientras que los valores promedio para el NB y LB fue-

ron 2,55 y 0.4 cm, respectivamente. El mayor valor para LE fue de 5,01 cm y se obtuvo con el tiempo de inmersión de 1 minuto; este valor fue estadísticamente diferente de los demás tratamientos evaluados y superior a los reportados por Albany *et al.* (1), quienes obtuvieron una longitud de 3,85 cm, pero en medios de cultivos líquidos en agitación y de 2,83 cm en medios semisólidos. Las diferencias encontradas entre el tiempo de inmersión de 1 minuto y los demás tiempos evaluados pudieran ser debido a que un mayor tiempo de inmersión hay mayor posibilidad de hiperhidratación

Cuadro 2. Efecto del tiempo de inmersión sobre la longitud del explante (LE) en vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Tiempo de inmersión (min)	LE (cm)
Testigo (medio semisólido)	4,24b
1	5,01a
2	4,41b
3	4,05b

Letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de d prueba de comparación de medias de Tukey.

de los explantes, efecto que fue observado al finalizar del ensayo en algunos tejidos expuestos a los mayores tiempos de inmersión. Pérez *et al.* (4) señalan que en los tejidos

hiperhidricos se afectan dos de los procesos más importantes para el desarrollo de los explantes, como son la fotosíntesis y el intercambio gaseoso.

Conclusiones

Con una frecuencia de inmersión de tres veces al día se obtienen los mayores valores de número de brotes por explante (2,75) y la mayor longitud del explante (6,04 cm), pero la menor longitud del brote (0,85); mientras que

con el tiempo de inmersión de 1 minuto fue posible obtener explantes de 5, 01 cm de longitud, siendo estos valores superiores a los obtenidos en la multiplicación *in vitro* zábila en medio semisólido.

Agradecimiento

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CONDES de la Universidad del Zulia

por el cofinanciamiento a este proyecto No. CC-0633-04.

Literatura citada

1. Albany, N., J. Vilchez, S. León de Sierralta, M. Molina y P. Chacín. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 23: 213-222.
2. Etienne-Barry D., B. Bertrand, N. Vasquez y H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Reports 19:111-117.
3. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
4. Pérez, J., E. Jiménez y D. Agramante. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. p. 179-190
- En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
5. Preil, W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* cultura. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef-Eide, K. and W. Preil. (Ed). p. 1-20. Springer, Netherlands.
6. Teisson, C. y D. Alvard. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. Book of Abstracts. p. 25.