



PROPAGACIÓN *In Vitro* DE CULTIVARES DE *Moringa oleifera* Lam.

In vitro propagation of *Moringa oleifera* Lam. cultivars

Arturo Matos Ruiz[✉], Iris Capote Betancourt, Aurora Pérez Martínez, Yarianne Lezcano Más, Carlos E. Aragón Abreu, Danilo Pina Morgado, Karel Vives Hernández, Marcos Daquinta Gradaille y Maritza Escalona Morgado

ABSTRACT. Moringa has leaves, flowers and fruit with a high level of vitamins, minerals and proteins of interest for the food and medical industries. This species can be propagated by seeds or cuttings, methods that not suitable to introduce new cultivars. The aim of this research was to establish an *in vitro* propagation protocol of different cultivars of *Moringa oleifera* Lam. To disinfect seeds three different disinfection times were evaluated five, seven and nine minutes in 10 gL⁻¹ sodium hypochlorite. Two methods for *in vitro* micropropagation were used: conventional system (semi-solid culture medium) and temporary immersion bioreactor. In the *in vitro* rooting phase, four concentrations of the naphthalene acetic acid and Indole butyric acid auxins (0; 2,5; 5,0 and 7,5 μmol L⁻¹) were evaluated and also the kind of explant. The survival rates of the sprout during the acclimatization phase was evaluated in relation to their origin in the rooting phase. Besides the effect of the genotype on *in vitro* establishment and multiplication was determined. The disinfection of the Supergenius cultivar was better at seven minutes of treatment with sodium hypochlorite, with 54 % of germination. The Temporary Immersion Bioreactor increased the sprouts morphological quality and multiplication coefficient from 6,2 until 16,1 of the Supergenius cultivar. Rooting was successful without auxin and acclimatization survival was around 85 % at 35 days for shoots rooted without growth regulators, regardless of explant origin. It was shown that the genotype influenced the establishment and multiplication of explants.

RESUMEN. La Moringa posee hojas, flores y frutos con un alto contenido de vitaminas, minerales y proteínas de interés para las industrias alimenticias y médicas. Su reproducción es por semillas y estacas, métodos insuficientes si se desean introducir nuevos cultivares. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam. La desinfección de las estructuras embrión-endospermo con hipoclorito de sodio 1 % (V:V) se realizó a los cinco, siete y nueve minutos. La multiplicación *in vitro* se realizó por: sistemas convencionales (medio de cultivo semi-sólido) y biorreactores de inmersión temporal. En el enraizamiento *in vitro* se evaluó la concentración del ácido naftalen acético y el ácido indol butírico (0; 2,5; 5,0 y 7,5 μmol L⁻¹) y el tipo de explante. Se evaluó la supervivencia de los brotes en la aclimatización teniendo en cuenta la procedencia de la fase de enraizamiento. Se determinó el efecto del genotipo en el establecimiento y la multiplicación *in vitro*. La desinfección del cultivar Supergenius fue mejor a los siete minutos, con un porcentaje de germinación del 54 %. Los biorreactores de inmersión temporal incrementaron la calidad morfológica de los brotes y el coeficiente de multiplicación aumentó de 6,2 a 16,1 para el cultivar Supergenius. El enraizamiento se logró sin auxinas y la supervivencia en aclimatización fue de un 85 % a los 35 días para los brotes que se enraizaron sin reguladores del crecimiento, independientemente del explante de procedencia. Se demostró que el genotipo influyó en el establecimiento y multiplicación de los mismos.

Key words: cultivars, protocol,
plant growth regulators

Palabras clave: cultivares, protocolo,
reguladores del crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera Lam es un árbol de la familia *Moringaceae* (1). Esta especie es nativa de la zona de la India, Afganistán, Pakistán (2). Por su alta resistencia a condiciones de estrés, en la actualidad se encuentra extendida en gran parte del mundo, incluyendo América (3).

Esta planta es un recurso natural que posee gran utilidad como complemento alimenticio rico en vitaminas, antioxidantes, aceites, microelementos y proteínas (2). Además del beneficio para la industria alimenticia, en la medicina tradicional se utiliza para prevenir patologías asociadas a la carencia de elementos esenciales de la dieta, como la ceguera infantil (4). Igualmente se le atribuyen usos en la purificación de agua (5) y en la obtención de biodiesel (6). Algunos autores le adjudican, también, actividad bio-estimulante para el crecimiento de algunos cultivos^A. Recientemente se ha informado en la literatura la obtención de compuestos naturales a partir de esta planta para su uso a nivel agrícola y médico (5, 7). Debido a estas propiedades, el cultivo de esta especie se ha incrementado en los últimos años (5). Los métodos tradicionales como la siembra de semillas y estacas han sido los más utilizados para satisfacer la relación consumo/demanda (8). Sin embargo, las inversiones de tiempo y dinero en podas, preparación de terreno, siembra y cosecha, son grandes y en ocasiones limitan las potencialidades de uso.

En los últimos años, las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado en aras de obtener mayor cantidad de plantas de esta especie y ahorrar recursos materiales^B; sin embargo, son escasos los informes que lo referencian. Esto crea la necesidad de profundizar en las investigaciones concernientes a este árbol de gran importancia en la seguridad alimentaria, salud y agricultura^B. Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT[®]) se han utilizado con éxito para la propagación *in vitro* de plantas (9, 10). Estos sistemas semi-automatizados con el empleo del medio líquido favorecen la nutrición *in vitro*, así como la renovación de gases dentro del frasco de cultivo, lo que incrementa el crecimiento y el desarrollo de los brotes (9, 11). Además, se obtienen mejoras significativas en los indicadores morfo-fisiológicos de los brotes que garantizan mayor supervivencia y crecimiento de los mismos en condiciones *ex vitro* (12). El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam.

^A Yasmeeen, A. *Exploring the potential of moringa (Moringa oleifera) leaf extract as natural plant growth enhancer* [en línea]. Ph. D. thesis, Department of Agronomy, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 2011. [Consultado: 10 de febrero de 2016]. Disponible en: <<http://moringatrees.org/moringa-doc/moringa-natural-plant-growth-enhancer.pdf>>.

^B Artiga, S. M. E. *Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción in vitro de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos peciolares y vitro-explantos hipocotiledores y radiculares de Moringa oleifera* [en línea]. Tesis de Grado, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 2012, 25 p., [Consultado: 1 de febrero de 2016]. Disponible en: <<http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1057>>.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se colectaron frutos de siete cultivares de *Moringa oleifera* Lam (Supergenius, Criolla Ciego de Ávila, PKM-2, Paraguay, Guatemala, Plain y Criolla Holguín), en diferentes áreas del territorio nacional. Para la obtención de las semillas, se secaron los frutos a temperatura ambiente durante una semana. A las semillas se les quitó el tegumento, se trabajó con las estructuras embrión-endospermo y se seleccionaron las que poseían entre 0,8 mm y 1 cm de diámetro; se lavaron con detergente comercial durante cinco minutos y se enjuagaron tres veces con abundante agua corriente.

Efecto del tiempo de desinfección de las semillas de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

La desinfección de los explantes (estructuras embrión-endospermo) se realizó con hipoclorito de sodio 1 % (V:V) en agitación durante cinco, siete y nueve minutos. Posteriormente se colocaron individualmente en un tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo que estuvo compuesto por el 100 % de las sales MS (14), suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol y sin reguladores del crecimiento. El pH se ajustó a 5,7. Las condiciones de cultivo fueron de un fotoperíodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad¹ y un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 37 μmol m⁻²s⁻¹ (Luxómetro digital FAITHFUL modelo FT-710) a temperatura de 26±1 °C.

Se utilizaron 48 explantes por tratamiento. Después de siete días de cultivo se determinó el número de explantes contaminados. A los 21 días se evaluó el número de estructuras embrión-endospermo germinado y no germinado. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Multiplicación *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

A partir de las estructuras embrión-endospermo germinadas se obtuvieron dos tipos de explantes: ápices (segmento de tallo de 3 cm aproximadamente con un par de hojas) y segmentos nodales (segmento de tallo de 3 cm aproximadamente con dos nudos y dos hojas). Todos los explantes se colocaron en un medio de cultivo semi-sólido que contenía el 100 % de las sales MS (13), suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol y sin reguladores del crecimiento. El pH se ajustó a 5,7. La densidad de inóculo fue de siete explantes por frasco y el volumen de medio de cultivo fue de 25 mL. Las condiciones de cultivo se mantuvieron igual que en el experimento anterior. Los explantes se subcultivaron tres veces cada 21 días, manteniendo la misma composición del medio de cultivo.

Posteriormente se tomaron diez segmentos de tallos de aproximadamente 3 cm de longitud con dos nudos y dos hojas provenientes de la multiplicación convencional y se colocaron en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT®) (14) que contenían 800 mL de medio de cultivo líquido con igual composición que el anterior. Se realizaron tres inmersiones por día y el tiempo de inmersión fue de cuatro minutos. Se utilizaron tres BIT y cada explante constituyó una unidad experimental. Las condiciones de cultivo se mantuvieron igual que en el experimento anterior. Después de 21 días de cultivo se evaluaron los indicadores número de brotes por explante, longitud del brote, número de entrenudos, número de raíces, grosor del tallo, presencia de brotes hiperhídricos y además se calculó el coeficiente de multiplicación como el cociente entre el número de brotes finales y el número de explantes inicial.

Enraizamiento *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

Para el enraizamiento *in vitro*, se utilizó un medio de cultivo semi-sólido que estuvo compuesto por las sales MS (13), suplementado con 40 g L⁻¹ de sacarosa, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol y los reguladores del crecimiento ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) en varias concentraciones (0; 2,5; 5,0; y 7,5 μmol L⁻¹). El pH se ajustó a 5,7. Se utilizaron dos tipos de explantes, el de las bases de tallos de 3 cm de longitud aproximadamente con dos nudos y dos hojas y el segmento de tallo de 3 cm de longitud aproximadamente, con dos nudos y dos hojas. La densidad de inóculo fue de siete explantes por frasco y el volumen de medio de cultivo fue de 25 mL. Se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Se utilizaron 30 explantes por tratamiento. Cada explante constituyó una unidad experimental.

A los 21 días de cultivo, se evaluaron los indicadores altura de los brotes, número de entrenudos, número de raíces, longitud y grosor de la raíz más extensa.

Acclimatización de las plantas de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

Los brotes de aproximadamente 5 cm de longitud, con cuatro hojas y presencia de raíces provenientes de los diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro*, se colocaron en comprimidos de turba (jiffys). Las condiciones de cultivo fueron de 80±3 % de humedad relativa y 25±2 °C de temperatura (Termo Higrómetro digital TECPEL® modelo DTM- 303), fotoperíodo correspondiente al ciclo del día (16 horas luz/8 horas oscuridad) con un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 608 μmol m⁻²s⁻¹ y condiciones atmosféricas de concentración de CO₂ entre 375 y 400 μmol mol⁻¹ a las 12:00 pm. El riego se realizó con regadera una vez por día en el horario comprendido entre las 9:30 am y 11:00 am. Se utilizaron 30 plantas por tratamiento. Cada planta constituyó una unidad experimental.

A los 7, 14, 21, 28 y 35 días de cultivo se calculó el porcentaje de supervivencia de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de supervivencia} = (\text{número de plantas vivas} / \text{total de plantas}) \times 100$$

Efecto del genotipo en la germinación de semillas de *Moringa oleifera* Lam

A las semillas de los siete cultivares de *Moringa oleifera* Lam (Supergenius, Criolla Ciego Ávila, PKM-2, Paraguay, Guatemala, Plain y Criolla Holguín) se les realizó la desinfección de las estructuras embrión-endospermo con hipoclorito de sodio 1 % (V:V) en agitación durante siete minutos. Se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas para la germinación del cultivar Supergenius.

Se utilizaron 48 estructuras embrión-endospermo por cultivar. Después de siete días de cultivo se determinó el número de explantes contaminados. A los 21 días se evaluó el número de estructuras embrión-endospermo germinado y no germinado. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Efecto del genotipo en la multiplicación de *Moringa oleifera* Lam

Para evaluar el efecto del genotipo en la multiplicación se procedió de igual manera que con el cultivar Supergenius descrito previamente. Después de 21 días de cultivo en BIT se evaluaron los indicadores número de brotes por explante, longitud del brote, número de entrenudos, presencia raíces, grosor del tallo y presencia de brotes hiperhídricos. Además, se calculó el coeficiente de multiplicación como el cociente entre número de brotes final y número de explantes inicial.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario SPSS (15), el análisis de varianza simple, bifactorial y trifactorial (ANOVA) con diferentes niveles. Las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de rangos múltiple de Tukey (p<0,05). En algunos casos fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de desinfección de las semillas de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

En la Tabla I se muestra el efecto del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio 1 % (V:V) sobre el porcentaje de estructuras embrión-endospermo contaminadas, germinadas y no germinadas durante el establecimiento *in vitro*. El menor porcentaje de contaminación se obtuvo cuando la desinfección se realizó durante nueve minutos, con diferencias significativas del resto de los tratamientos. Por su parte, el mayor porcentaje de germinación le correspondió al tratamiento donde se utilizó el hipoclorito de

sodio 1 % (V:V) durante siete minutos, el cual difirió significativamente de los tratamientos de cinco y nueve minutos. También se pudo observar que con el aumento del tiempo de desinfección aumentó el porcentaje de semillas no germinadas a pesar de que el porcentaje de contaminación fue menor. Este comportamiento pudiera estar relacionado con un efecto fitotóxico del hipoclorito de sodio (16). A partir de estos resultados se seleccionó el tiempo de siete minutos como el adecuado para la desinfección de las semillas de moringa.

Multiplicación *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

En la multiplicación de *M. oleifera* Lam. cv Supergenius en el sistema convencional se obtuvo un elevado coeficiente de multiplicación (6,2) a pesar de no utilizar reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Esto pudiera asociarse fundamentalmente a la juvenilidad del material vegetal y a la ruptura de la dominancia apical que favoreció la activación de la brotación axilar así como, a un elevado contenido endógeno de fitohormonas como la zeatina^A (17), lo que pudo favorecer la formación de brotes axilares.

El uso de los BIT incrementó el coeficiente de multiplicación hasta 16,1 (Tabla II), demostrando el efecto positivo de este sistema de cultivo en la multiplicación de la *M. oleifera* Lam. cv Supergenius. Además, los indicadores morfológicos evaluados mostraron resultados favorables. El uso del medio de cultivo líquido y la renovación de la atmosfera gaseosa interna del recipiente de cultivo favorecieron la incorporación y asimilación de los nutrientes, incrementando el crecimiento y la acumulación de biomasa (14, 18).

Enraizamiento *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

El efecto de la concentración de dos auxinas (ANA y AIB) y el tipo de explante sobre indicadores morfológicos en la fase de enraizamiento *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam. cv. Supergenius se muestran en la Tabla III. El número de raíces fue mayor cuando se utilizó como explante segmentos de tallos con 5,0 µmolL⁻¹ de ANA y 7,5 µmolL⁻¹ de AIB, sin diferencias significativas entre sí.

Tabla I. Efecto del tiempo de desinfección de las estructuras embrión-endospermo de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

Tiempo (min)	Contaminadas (%)	Germinadas (%)	No germinadas (%)
5	39,55 c	31,35 b	29,10 b
7	24,96 b	54,24 a	20,80 c
9	18,00 a	36,00 b	46,00 a

Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas (p<0,05) (ANOVA un factor, Tukey) (n=48) Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $x' = 2\arccos(x/100)^{0,5}$

Tabla II. Indicadores morfológicos de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius luego de la multiplicación en BIT. Cada valor representa la media de 30 repeticiones

Longitud del brote (cm)	Número de entrenudos	Número de raíces	Grosor del tallo (mm)	Número brotes hiperhídricos	CM
4,9	4,2	1,9	3,1	0	16,1

Tabla III. Efecto de la aplicación de ANA y AIB en la fase de enraizamiento *in vitro* de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

Auxina	Concentración (µmol L ⁻¹)	Tipo Explante	Altura (cm)	Número entrenudos	Número de raíces	Longitud raíz más extensa (cm)	Grosor raíz más extensa (mm)
Control	0,0	Base	5,16 b	2,66 b	3,50 d	3,97 a	0,13 b
		Segmento de tallo	5,33 b	3,73 a	3,80 d	4,24 a	0,10 b
	2,5	Base	6,63 a	2,50 b	6,06 bc	3,60 ab	0,24 a
		Segmento de tallo	3,04 d	1,36 c	8,36 b	3,10 b	0,14 b
ANA	5,0	Base	4,18 c	1,86 bc	8,73 b	3,27 b	0,12 b
		Segmento de tallo	2,55 d	1,03 e	11,30 a	2,12 c	0,10 b
	7,5	Base	2,82 d	1,33 d	6,67 bc	3,57 b	0,11 b
		Segmento de tallo	2,64 d	1,10 e	7,36 b	3,49 b	0,11 b
	2,5	Base	5,42 b	2,36 b	3,80 d	3,60 b	0,10 b
		Segmento de tallo	3,80 cd	1,93 bc	4,70 cd	3,26 b	0,11 b
AIB	5,0	Base	4,90 bc	2,40 b	3,20 d	2,95 c	0,10 b
		Segmento de tallo	4,25 c	2,00 b	5,20 c	3,50 b	0,10 b
	7,5	Base	5,60 b	2,90 b	7,90 b	3,20 b	0,10 b
		Segmento de tallo	5,76 b	2,43 b	11,80 a	3,18 b	0,10 b

Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas (p<0,05) (ANOVA trifactorial, Tukey) (n=30) Para el tratamiento estadístico, los datos de número de entrenudos y número de raíces se transformaron de acuerdo con $x' = x^{0,5}$ y $x' = (x+0,5)^{0,5}$, respectivamente

La longitud de la raíz más extensa fue mayor en el control, independientemente del tipo de explante, sin diferencias significativas con el tratamiento en que se utilizaron bases de tallo con 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA. Este tratamiento también mostró el mejor resultado en cuanto al grosor de la raíz más extensa y la altura del brote, con diferencias significativas del resto de los tratamientos. El número de entrenudos fue superior para los segmentos de tallos del tratamiento control, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

En los explantes proveniente de la base del tallo se favoreció la formación de callo en la región basal, lo que afectó la formación de raíces. Esto pudiera estar relacionado con el incremento endógeno de la concentración de auxina, ya que se reconoce que la *Moringa* posee un elevado contenido de AIA y la adición exógena de ANA y AIB pudo provocar la división celular descontrolada dando lugar a la masa callosa (19). Esta condición en los explantes es no deseada ya que las raíces que se forman a partir de esta estructura son de baja calidad (20).

Aclimatación de brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius

La Tabla IV muestra el efecto de la aplicación de auxinas (ANA y AIB) durante el enraizamiento *in vitro* sobre el porcentaje de supervivencia de los brotes en la fase de aclimatación. El uso de auxinas en la fase de enraizamiento *in vitro*, independientemente del tipo y concentración, afectó notablemente la supervivencia de los brotes durante el transcurso del tiempo. El tratamiento control, donde no se utilizaron auxinas para el enraizamiento, mostró los mejores valores de supervivencia en todos los momentos evaluados, independientemente del tipo de explante utilizado. Luego de 35 días de cultivo la supervivencia fue de superior al 85 % para el tratamiento control. Para los tratamientos donde se utilizaron auxinas los valores de supervivencia al final de esta fase fueron muy bajos oscilando entre 0 y 6,6 %.

El comportamiento observado pudiera estar asociado a que las raíces formadas *in vitro* son poco funcionales y con escasos pelos adsorbentes, lo que no garantiza la nutrición de los brotes en la etapa inicial de la aclimatación (21). Además, en algunas plantas, las raíces *in vitro* se pierden durante el trasplante al sustrato, por lo que durante este proceso donde las plantas tienen que adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo y enfrentar las condiciones de estrés a las que son expuestas durante el tránsito *in vitro-ex vitro* podría afectar el porcentaje de supervivencia.

La aplicación de auxinas promovió el enraizamiento de los brotes; sin embargo, en el tratamiento control las raíces que se formaron son más funcionales, lo que garantizó la supervivencia durante la aclimatación. Esto pudiera estar asociado a que el suplemento de auxinas favorece la formación de callos en la base de los brotes que impide la funcionalidad de las raíces en condiciones *ex vitro* afectando la supervivencia de las plantas.

Efecto del genotipo en la germinación de semillas de *Moringa oleifera* Lam

En la Tabla V se muestra el efecto de la desinfección durante siete minutos con hipoclorito de sodio 1 % (V:V) sobre el porcentaje de estructuras embrión-endospermo contaminadas, germinadas y no germinadas durante el establecimiento *in vitro* de *M. oleifera* Lam cv Paraguay, Plain, PKM-2, Guatemala, Criolla Ciego Ávila, Criolla Holguín. Para los cultivares evaluados el porcentaje de contaminación fue inferior al del cultivar Supergenius, con excepción del cultivar Criolla Holguín que mostró un porcentaje de contaminación de 95,80 %. El mayor porcentaje de germinación se logró en los cultivares Criolla Ciego Ávila y Plain, sin diferencias significativas entre sí. Estos valores de germinación fueron superiores al obtenido con el cultivar Supergenius. La germinación del resto de los cultivares fue baja. El cultivar Criolla Holguín se vio severamente afectado por la contaminación y la no germinación de las estructura embrión-endospermo, por lo que no se pudo continuar con la experimentación con este cultivar.

Tabla IV. Porcentaje de supervivencia de los brotes de *Moringa oleifera* Lam cv Supergenius en la fase de aclimatación

Auxina	Concentración (mg L ⁻¹)	Explante	Supervivencia (%)				
			7 días	14 días	21 días	28 días	35 días
Control	0,0	Base	100,0 a	96,0 a	93,0 a	90,0 a	90,0 a
		Segmento de tallo	96,0 a	93,0 a	93,0 a	86,0 a	86,0 a
ANA	2,5	Base	73,0 bc	50,0 c	26,0 b	6,6 b	6,6 b
		Segmento de tallo	73,0 bc	46,0 d	20,0 c	0,0 c	0,0 c
	5,0	Base	73,0 bc	60,0 b	26,0 b	3,3 bc	3,3 b
		Segmento de tallo	66,0 c	50,0 c	23,0 bc	10,0 b	6,6 b
AIB	7,5	Base	70,0 bc	53,0 bc	26,0 b	3,3 bc	0,0 c
		Segmento de tallo	73,0 bc	60,0 b	30,0 b	10,0 b	6,6 b
	2,5	Base	80,0 b	60,0 b	23,0 bc	10,0 b	6,6 b
		Segmento de tallo	73,0 bc	63,0 b	26,0 b	6,6 b	6,6 b
AIB	5,0	Base	66,0 c	50,0 c	26,0 b	0,0 c	0,0 c
		Segmento de tallo	86,0 b	53,0 bc	30,0 b	0,0 c	0,0 c
	7,5	Base	76,0 b	56,0 bc	20,0 c	6,6 b	0,0 c
		Segmento de tallo	73,0 bc	60,0 b	16 c	10,0 b	3,3 b

Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas en cada momento de evaluación ($p \leq 0,05$) (ANOVA trifactorial, Tukey) ($n=30$). Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $x' = 2\text{arccoseno}(x/100)^{0,5}$

Tabla V. Efecto del tiempo de desinfección de las estructuras embrión-endospermo en diferentes cultivares de *Moringa oleifera* Lam

Cultivares	Contaminadas (%)	Germinadas (%)	No germinadas (%)
Paraguay	6,25 b	6,25 c	87,50 c
Plain	6,25 b	87,50 a	6,25 a
PKM-2	6,25 b	6,25 c	87,50 c
Guatemala	2,08 a	6,25 c	91,60 c
Criolla Ciego Ávila	8,30 b	91,60 a	0,00 a
Criolla Holguín	95,80 d	0,00 d	4,20 a
Supergenius	24,96 c	54,24 b	20,80 b

Porcentajes con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA un factor, Tukey) ($n=48$)
Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $x' = 2\arccos(x/100)^{0,5}$

Efecto del genotipo en la multiplicación de *Moringa oleifera* Lam

Los valores de coeficiente de multiplicación en sistema convencional de los cultivares de *M. oleifera* Lam (Paraguay, Plain, PKM-2, Guatemala y Criolla Ciego Ávila), se muestra en la Tabla VI. Los mejores resultados se obtuvieron con los cultivares Supergenius, Plain y Paraguay, sin diferencias estadísticas significativas entre sí. Los resultados más bajos se obtuvieron con el cultivar Criolla Ciego Ávila a pesar de ser la que mejores resultados mostró en cuanto a germinación de las estructuras embrión-endospermo con el 91,60 %.

Los valores de los indicadores morfológicos evaluados luego de la multiplicación en BIT de *M. oleifera* Lam se muestran en la Tabla VII. Para el indicador longitud del brote, los mejores resultados se obtuvieron para los cultivares Supergenius, Paraguay y Plain, sin diferencias estadísticas entre sí. Por su parte, el número de entrenudos fue superior en los cultivares Supergenius, Paraguay y PKM-2, sin diferencias estadísticas entre sí.

Tabla VI. Coeficiente de multiplicación en sistema convencional de diferentes cultivares de *Moringa oleifera* Lam

Cultivares	CM
Paraguay	5,8 a
Plain	6,0 a
PKM-2	5,3 b
Guatemala	4,8 b
Criolla Ciego Ávila	3,9 c
Supergenius	6,2 a

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas estadísticamente ($p \leq 0,05$) (ANOVA un factor, Tukey) ($n=30$)

Tabla VII. Indicadores morfológicos de brotes de diferentes cultivares de *Moringa oleifera* Lam. durante la multiplicación en BIT

Cultivares	Longitud del brote (cm)	Número de entrenudos	Número de raíces	Grosor tallo (mm)	CM
Paraguay	4,7 a	3,9 a	0,0 d	3,0 a	12,9 b
Plain	4,4 ab	3,2 b	0,6 c	3,2 a	7,5 c
PKM-2	3,6 c	3,5 ab	1,9 a	3,0 a	5,2 e
Guatemala	4,2 b	2,9 c	1,0 b	3,0 a	6,7 d
Criolla Ciego Ávila	3,5 c	3,4 b	0,0 d	3,0 a	5,1 e
Supergenius	4,9 a	4,2 a	1,9 a	3,1 a	16,1 a

Medias con letras diferentes para cada columna representan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA un factor, Tukey) ($n=30$)
Para el tratamiento estadístico, los datos de número de entrenudos se transformaron de acuerdo con $x' = x^{0,5}$ y para el número de raíces con $x' = (x+0,5)^{0,5}$

La formación de raíces se evidenció en todos los cultivares, excepto en Paraguay y Criolla Ciego Ávila, presentándose el mayor número de raíces en los cultivares Supergenius y PKM-2, sin diferencias significativas entre sí. El indicador grosor del tallo no mostró diferencias significativas entre los cultivares evaluados. Tampoco, se presentaron brotes hiperhídricos en ninguno de los cultivares. En cuanto al coeficiente de multiplicación, el mejor resultado le correspondió al cultivar Supergenius, seguido por el cultivar Paraguay. Para estos cultivares, el BIT incrementó en más de dos veces el coeficiente de multiplicación, mientras que para el resto de los cultivares este indicador no tuvo un incremento significativo con respecto al sistema convencional.

Los resultados demostraron el efecto del genotipo sobre la germinación de las estructuras embrión-endospermo y la multiplicación *in vitro*. Las diferencias observadas entre los cultivares pudieran estar relacionadas con el estado fisiológico y sanitario de la planta madre y de las semillas, así como el tamaño, edad y momento de toma de los explantes. Además, se conoce que la respuesta genotípica depende de la expresión génica de cada individuo, la cual depende del medio ambiente donde se desarrolla el individuo (22).

CONCLUSIONES

- Se logró un protocolo para la propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam, el cual se caracterizó por su efectividad en el número y calidad de los brotes. El mismo se caracterizó por la ausencia de reguladores del crecimiento durante el

establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento de los brotes lo cual incidió positivamente en los altos porcentajes de supervivencia logrados durante la aclimatización.

- ◆ Con el empleo de la técnica de inmersión temporal se alcanzó duplicar la tasa de multiplicación en algunos cultivares demostrando la efectividad de este método en la propagación de esta planta. Es evidente que los contenidos endógenos de auxinas y citoquininas en esta planta favorecieron la propagación *in vitro*, por lo que la obtención de extractos naturales y su evaluación en la morfogénesis *in vitro* de otras plantas son de gran interés y constituyen aspectos a abordar en futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonal, R. R.; Rivera, O. R. M. y Bolívar, C. M. E. "Moringa oleifera: una opción saludable para el bienestar". *MEDISAN*, vol. 16, no. 10, octubre de 2012, pp. 1596-1599, ISSN 1029-3019.
2. Villarreal, G. A.; Angulo, O. y Johana, K. "Review of characteristics and uses of the plant *Moringa oleifera*". *Investigación y Desarrollo*, vol. 22, no. 2, julio de 2014, pp. 309-330, ISSN 0121-3261.
3. del Toro, M. J. J.; Carballo, H. A. y Rocha, R. L. "Valoración de las Propiedades Nutricionales de *Moringa Oleífera* en el Departamento de Bolívar". *Revista de Ciencias*, vol. 15, 13 de febrero de 2012, pp. 23-30, ISSN 0121-1935.
4. Posmontier, B. "The Medicinal Qualities of *Moringa Oleifera*". *Holistic Nursing Practice*, vol. 25, no. 2, 2011, pp. 80-87, ISSN 0887-9311, DOI 10.1097/HNP.0b013e31820dbb27.
5. Martín, C.; Martín, G.; García, A.; Fernández, T.; Hernández, E. y Puls, J. "Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica". *Pastos y Forrajes*, vol. 36, no. 2, junio de 2013, pp. 137-149, ISSN 0864-0394.
6. Olson, M. E. y Fahey, J. W. "*Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas". *Revista mexicana de biodiversidad*, vol. 82, no. 4, diciembre de 2011, pp. 1071-1082, ISSN 1870-3453.
7. Yasmeen, A.; Basra, S. M. A.; Wahid, A.; Nouman, W. y Rehman, H. U. "Exploring the potential of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) as a seed priming agent in improving wheat performance". *TURKISH JOURNAL OF BOTANY*, vol. 37, no. 3, 3 de junio de 2013, pp. 512-520, ISSN 1300-008X.
8. Phiri, C. y Mbewe, D. N. "Influence of *Moringa oleifera* leaf extracts on germination and seedling survival of three common legumes". *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 12, no. 2, 2010, pp. 315-317, ISSN 1560-8530, CABDirect2.
9. Escalona, M. "Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts". *Prophyta Annual*, 2006, pp. 48-50, ISSN 0921-5506, 0921-5506.
10. Watt, M. P. "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation". *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 76, 20 de septiembre de 2012, pp. 14025-14035, ISSN 1684-5315, DOI 10.5897/AJB12.1693.
11. Peñate, L.; Concepción, O.; Aragón, C.; Rodríguez, R.; González Olmedo, J. L.; Escalona, M.; Cid, M. y Pina, D. "Evaluación del efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* en la calidad de plántulas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal". *Biotechnología vegetal*, vol. 7, no. 3, 2007, pp. 161-169, ISSN 1609-1841.
12. Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M. y Amancio, S. "The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions". *Plant Cell Reports*, vol. 31, no. 4, 2 de diciembre de 2011, pp. 757-769, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI 10.1007/s00299-011-1195-7.
13. Murashige, T. y Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, 1 de julio de 1962, pp. 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
14. Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M.; González, J. L.; Desjardins, Y. y Borroto, C. G. "Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems". *Plant Cell Reports*, vol. 18, no. 9, mayo de 1999, pp. 743-748, ISSN 0721-7714, 1432-203X, DOI 10.1007/s002990050653.
15. Pérez, L. C. *Técnicas estadísticas con SPSS 12: aplicaciones al análisis de datos*. edit. Pearson Prentice Hall, 2005, 824 p., ISBN 978-84-205-4410-6.
16. García, M. B.; Abeal, E. E.; Rodríguez, I. P. y Rodríguez, S. M. "Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño". *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 11, no. 2, 15 de octubre de 2009, pp. 127-135, ISSN 1909-8758.
17. de Feria, M.; Chávez, M.; Barbón, R.; La O, M.; Pérez, M.; Jiménez-Terry, F.; Quiala, E. y Agramonte, D. "Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*". *Biotechnología Vegetal*, vol. 9, no. 4, 2009, pp. 217-224, ISSN 1609-1841.
18. Jiménez, E.; Reyes, C.; Machado, P.; Pérez Alonso, N.; Capote, A.; Pérez, A. y Eichler Loebermann, B. "Multiplicación *in vitro* de *Morinda royoc* L. en Sistemas de Inmersión Temporal". *Biotechnología vegetal*, vol. 11, no. 2, 2011, pp. 115-118, ISSN 1609-1841.
19. Guillén, S.; Martínez-Palacios, A.; Martínez, H. y Martínez-Ávalos, J. G. "Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México". *Botanical Sciences*, vol. 93, no. 2, 2015, pp. 221-230, ISSN 2007-4298, DOI 10.17129/botsci.129.

20. Rodríguez, B. M.; Carrillo, L. R.; Chacón, F. M.; Hormazábal, V. N.; Tampe, P. J. y Tighe, N. R. "Enraizamiento in vitro y ex vitro de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile". *Gayana Botánica*, vol. 72, no. 1, junio de 2015, pp. 14-20, ISSN 0717-6643, DOI 10.4067/S0717-66432015000100002.
21. García, A. V.; Sandrea, Y.; Gonzalez, O.; Diaz, A.; Albarran, J. G.; Schmidt, A.; Salazar, E.; Mujica, Y.; Casado, R.; Fernandez, J. y R, C. M. "Micropropagación de plantas de lechosa en recipientes de inmersión temporal a partir de brotes axilares". *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 17, no. 1, 22 de mayo de 2015, pp. 70-78, ISSN 1909-8758, DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50718.
22. Orellana, P. P.; García, L.; Bermúdez, I.; Veitía, N. y Romero, C. "Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp. para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*". *Biotecnología vegetal*, vol. 2, no. 2, 2002, pp. 77-81, ISSN 1609-1841.

Recibido: 15 de mayo de 2015

Aceptado: 29 de enero de 2016

NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial

TUTORIAL

NÚMERO ESPECIAL

*Este número de la revista está dedicado
al X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg2015)*

El Centro de Bioplantitas es una institución de investigaciones científicas, adscrita a la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” del Ministerio de Educación Superior de Cuba. El mismo surge en 1987 como un laboratorio de investigaciones y micropropagación de plantas frutales. Desde 1992, tiene como misión desarrollar, aplicar y ofrecer tecnologías, productos, asistencia técnica y servicios académicos de excelencia en el marco de la Biotecnología Vegetal.

El grupo de investigadores, técnicos de laboratorio y otro personal auxiliar altamente calificados, han sido galardonados con premios relevantes de la Academia de las Ciencias de Cuba y con reconocimientos por la labor que realizan en la transferencia de resultados científicos y tecnológicos, la producción de vitroplantitas para el comercio internacional, y la educación postgraduada. Para el trabajo científico cuenta con seis laboratorios: Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, Agrobiología, Interacción Planta-Patógeno, Ingeniería Metabólica, Mejoramiento Genético de Plantas y Computación Aplicada. Todos con las mejores facilidades y un equipamiento de alta calidad para asegurar resultados relevantes.

El Centro de Bioplantitas desde 1997 y, como bienal, desarrolla su Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg), el cual constituye un marco excepcional para el intercambio de conocimientos y experiencias entre científicos, docentes y productores. En este se debaten en forma de Conferencia Magistrales, Talleres y Mesas Redondas durante sesiones de trabajo, los resultados más relevantes y los problemas más acuciantes que enfrenta la biotecnología vegetal cubana y mundial.

Por todo lo anterior, el Comité Organizador de BioVeg2015 en su décima edición se complace en presentarles una muestra representativa de 19 trabajos científicos completos recibidos y siente profunda satisfacción en invitarlos para el próximo BioVeg2017 que se desarrollará en la fecha 22-26 del mes de mayo.

Nota:

Durante el proceso de edición no se pudo acceder al trabajo de retoque y mejoramiento de imágenes, por lo que estas han sido insertadas con la misma calidad con la que enviaron sus autores.

La Editorial