

Artículo original

Efecto del extracto acuoso foliar de moringa en la fase inicial de aclimatización de piña

Lianny Pérez-Gómez^{1*}

Iris Capote-Betancourt¹

Lelurlys Nápoles-Borrero¹

Danilo Pina-Morgado¹

Claudia Linares-Rivero¹

Maribel Rivas-Paneca¹

Maritza Escalona-Morgado¹

Romelio Rodríguez-Sánchez¹

Aurora Terylene Pérez-Martínez¹

¹Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Cuba. CP 69450

* Autor para correspondencia. lianny@bioplantas.cu

RESUMEN

Las hojas de *Moringa oleifera* Lam. poseen varios constituyentes químicos como: aminoácidos, iones minerales, ascorbato, fitohormonas y metabolitos secundarios. Esto hace que sus extractos se utilicen para potenciar el crecimiento de algunas plantas. Además, se le adjudica actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés agrícola. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso obtenido de hojas de moringa en los cambios morfológicos de las plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* 'MD-2' en la etapa inicial de la aclimatización. Se evaluó el efecto de la concentración (diluciones de 1:4 y 1:8) y el tiempo de inmersión (0, 24, 48 y 72 horas) en el extracto acuoso de moringa previo a la aclimatización de plantas de piña. Además, se comparó el extracto acuoso de moringa y el Previcur[®] Energy LS 84 en la aclimatización de plantas de piña. Con la inmersión de las plantas de piña por 24 y 48 horas en el extracto acuoso diluido 1:4 y por 72 horas en extracto acuoso diluido 1:8 se logró el 100 % de supervivencia. Los indicadores morfológicos fueron mayores con la inmersión de plantas de piña por 72 horas en extracto acuoso diluido 1:8, luego de 42 días en aclimatización. No se apreciaron diferencias significativas en los indicadores

morfológicos de las plantas tratadas solo con Previcur® Energy LS 84 y con extracto acuoso diluido 1:8. En estos tratamientos no se observaron síntomas visibles de enfermedades.

Palabras clave: *Ananas comosus*, compuestos bioquímicos, bioestimulante, crecimiento

Recibido: 10/09/2018

Aprobado: 29/01/2019

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la *Moringa oleifera* Lam. se ha utilizado ampliamente en la alimentación humana y animal, en la medicina tradicional, en la producción de biodiesel y en la industria farmacéutica y cosmética ⁽¹⁻³⁾. Además, a sus extractos se les adjudican actividad bioestimulante debido a que son ricos en aminoácidos, iones minerales, ascorbato y fitohormonas ^(4,5). Esto hace que favorezca el crecimiento de algunas plantas, lo que permite su uso en distintas ramas de la agricultura. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, los extractos de hojas de moringa se han utilizado para estimular la germinación de las semillas de leguminosas y cereales, así como evaluar su efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas ^(6,7). La presencia en los extractos de moringa de fitoquímicos como cumarinas, flavonoides, terpenoides, carotenoides, taninos y compuestos fenólicos le confiere actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés agrícola ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

La piña (*Ananas comosus* var. *comosus*) es la tercera fruta de mayor producción mundial. Posee un agradable sabor y aroma, así como vitaminas C, B1, B6, ácido fólico y minerales como el K⁺ ⁽¹¹⁾. En el año 2016, su producción mundial ascendió a 25 809 038 toneladas y en Cuba a 48 501 toneladas ⁽¹²⁾. Para los países productores de piña y en particular para Cuba, la deficiencia de material de propagación es un problema que se presenta cuando se desea fomentar nuevas áreas o introducir una nueva variedad.

El híbrido ‘MD-2’ posee características de gran importancia económica, como son los altos rendimientos y la calidad de la fruta. Es uno de los cultivares con mayores volúmenes de importación como fruta fresca en los mercados de Estados Unidos y la Unión Europea ⁽¹³⁾. Sin embargo, las plantas cultivadas en el campo promedian apenas dos propágulos por ciclo productivo. Esto hace necesario establecer esquemas de producción de semillas a través de la biotecnología y evaluar su introducción en las condiciones de Cuba y, en específico, del territorio avileño.

El desarrollo de las técnicas de micropropagación ha tenido resultados altamente ventajosos en la propagación rápida y con calidad, de diversas especies de plantas económicamente importantes ⁽¹⁴⁾. En este entorno, el Centro de Bioplasmas, desarrolló un protocolo de micropropagación basado en el uso del medio líquido y la tecnología de inmersión temporal, unido a la implementación de un sistema semiautomatizado ⁽¹⁵⁾, que posibilita reducir el tiempo necesario para generar cantidades suficientes de vitroplantas destinadas a la creación de bancos de semillas básicas que permitan el fomento de plantaciones piñeras con semilla de alta calidad. Una de las etapas determinantes en el protocolo general de propagación es la aclimatización, debido a que las plantas experimentan cambios fisiológicos que pueden influir en las etapas siguientes. La piña posee un lento crecimiento, lo que dilata la duración de esta fase. Además, las plantas de piña durante la aclimatización pueden verse afectadas por oomicetes y hongos fitopatógenos, fundamentalmente, de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, produciéndose pérdidas importantes ⁽¹⁶⁾. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso obtenido a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. en los cambios morfológicos de las plantas de piña ‘MD-2’ en la etapa inicial de la aclimatización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal de piña (*Ananas comosus* var. *comosus*) ‘MD-2’ lo suministró el Laboratorio de Escalado y Transferencia Tecnológica del Centro de Bioplasmas. Se utilizaron plantas que provenían de la fase de enraizamiento *in vitro* (30 días) y se encontraban en un medio de cultivo que contenía: sales MS ⁽¹⁷⁾, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, sacarosa al 30 g L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl y 2,69 μmol L⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA).

Obtención y caracterización del extracto acuoso de hojas de moringa

Para obtener el extracto acuoso se utilizaron las hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv. Supergenius provenientes de plantas adultas de tres años, crecidas en la Estación Experimental “Juan Tomás Roig”, Centro de Bioplasmas, que poseían los componentes fitoquímicos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes fitoquímicos detectados en las hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius

Compuesto	Test o reactivo utilizado	Hojas
Cumarinas volátiles	NaOH	+
Saponinas	Formación de espuma	-
Triterpenos y esteroides	Reacción de Liebermann-Buchard	+
	Reacción de Salkowski	+
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-
Derivados antracénicos	Reacción de Borntrager	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+
Taninos	Gelatina-NaCl	-

- Ausencia del compuesto, + Presencia del compuesto.

Para la obtención del extracto acuoso se molieron 400 g de masa fresca de hojas de moringa con nitrógeno líquido en batidora comercial. La proporción de material vegetal y agua fue de 1:2.5 (m:v). La extracción se realizó durante una hora con agitación y posteriormente se filtró con gasa para eliminar el material vegetal. A continuación, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 15 000 x g y se colectó el sobrenadante. Al extracto acuoso se le determinó la concentración de proteínas ⁽¹⁸⁾, la concentración de carbohidratos ⁽¹⁹⁾ y la concentración de compuestos fenólicos solubles ⁽²⁰⁾ (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización del extracto acuoso obtenido a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius

	Extracto acuoso
Proteínas (mg g ⁻¹ MF)	8,27
Carbohidratos (mg g ⁻¹ MF)	53,8
Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ MF)	6,50

(mg g⁻¹ MF= Masa Fresca)

Efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en el extracto acuoso de moringa en la aclimatización de plantas de piña

Se seleccionaron plantas homogéneas enraizadas *in vitro* para su aclimatización, las cuales poseían entre 0,8-1,62 g de masa fresca, 8-10 cm de longitud, 4-6 hojas y 3-4 raíces, como establece el instructivo técnico para la propagación de la piña del Centro de Bioplantas ⁽²¹⁾. Se prepararon dos disoluciones del extracto acuoso de moringa: extracto diluido cuatro veces (1:4) y extracto diluido ocho veces (1:8). Las raíces de las plantas se sumergieron durante: 0, 24, 48 y 72 horas en las disoluciones. Se utilizaron 7,5 mL de las diluciones del extracto acuoso/planta.

Las mismas se colocaron el tiempo que duró la inmersión en cámaras de cultivo (KOXKA; mod. EC -1200F) con condiciones ambientales controladas. La temperatura (25 ± 1 °C), flujo de fotones fotosintéticos ($FFF=80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y humedad relativa ($HR=70$ %) se fijaron durante todo el experimento para favorecer el desarrollo del cultivo, el fotoperiodo fue de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad.

Las plantas fueron sembradas en envases plásticos con un volumen de $222,59 \text{ cm}^3$ con mezcla del sustrato tamizado de suelo Ferralítico Rojo y cachaza (derivado de la caña de azúcar) a una proporción de 1:1 (v/v). Las mismas fueron aclimatizadas en una casa de cultivo bajo condiciones de 80 ± 3 % de humedad relativa, 30 ± 2 °C de temperatura, luz natural con flujo de fotones fotosintéticos de $400\pm 25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y condiciones atmosféricas de concentración de CO_2 y fotoperiodo natural. Estas se asperjaron cada 10 días con una mezcla de fertilizante foliar que contenía 16,0 g de N-P-K cristalino y 1,0 g de Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120).

A los 42 días se determinó la supervivencia (%) de las plantas como el cociente del número de plantas vivas al finalizar esta etapa entre el número inicial de plantas (30 plantas). Además, se evaluaron los indicadores morfológicos: masa fresca (g), masa seca (g), longitud de la planta (cm), número de hojas, longitud de la raíz más larga (cm) y número de raíces por planta.

Comparación del extracto acuoso de hojas de moringa y el Previcur®

Energy LS 84 en la aclimatización de plantas de piña

Se diseñaron cuatro tratamientos: raíces sumergidas en agua destilada durante 72 horas (control), raíces sumergidas en extracto de moringa diluido ocho veces (1:8) durante 72 horas, raíces sumergidas en Previcur® Energy LS 84 (Bayer CropScience, $1.0 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$) durante tres minutos y una combinación de inmersión de las raíces en extracto de moringa diluido ocho veces (1:8) durante 72 horas y luego en Previcur Energy® durante tres minutos ⁽²²⁾.

Las plantas fueron sembradas y cultivadas en las mismas condiciones que en el experimento anterior. A los 42 días se evaluaron los mismos indicadores descritos en el experimento anterior.

Análisis estadístico

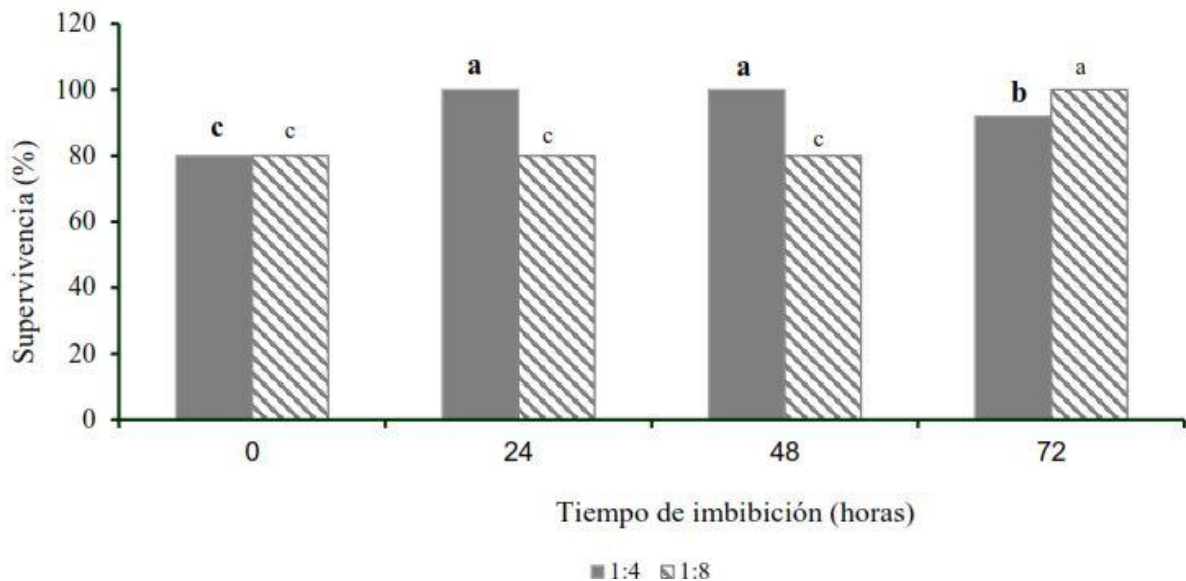
En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario SPSS Version 21 para Windows, SPSS Inc. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) simple y bifactorial (tiempo de inmersión y la dilución del extracto acuoso). Las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de rangos múltiple de Tukey ($p<0,05$) previa comprobación de los

supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En los indicadores supervivencia, número de hojas y número de raíces fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas. En ambos experimentos se utilizaron 30 plantas por tratamiento con un diseño experimental completamente aleatorizado. Los experimentos se repitieron tres veces. El porcentaje de supervivencia representa el promedio de las tres repeticiones (n=3). Para el resto de los indicadores evaluados cada planta fue considerada como una unidad experimental y representa el promedio de todas las mediciones individuales (n=90).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en el extracto acuoso de moringa en la aclimatización de plantas de piña

La Figura 1 muestra la supervivencia de plantas de piña luego de 42 días en aclimatización, posterior a la inmersión de las plantas en extracto de *Moringa oleifera* Lam diluido cuatro (1:4) y ocho veces (1:8) durante 24, 48 y 72 horas. Los mejores resultados se obtuvieron con la inmersión de las raíces de las plantas de piña por 24 y 48 horas en el extracto acuoso diluido 1:4, sin diferencias significativas con la dilución 1:8 por 72 horas. En estos tratamientos se logró el 100 % de supervivencia de las plantas. Por otra parte, las plantas cuyas raíces fueron sumergidas en extracto acuoso de moringa (1:4) por 72 horas, disminuyeron significativamente su porcentaje de supervivencia. Sin embargo, la dilución (1:8) necesitó 72 horas de inmersión para proporcionar un 100 % de supervivencia.



Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (n=3, ANOVA bifactorial; Tukey; $p \leq 0,05$)

Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $x' = 2 \arcseno(x/100)^{0,5}$. $ESx=16,2$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados

Figura 1. Efecto del tiempo de inmersión de las raíces de las plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* 'MD-2' en diluciones del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius en la supervivencia a los 42 días en condiciones ambientales controladas

En las plantas que murieron durante el experimento se observó flacidez en las hojas con síntomas de pudrición y coloración parda-negruzca hacia la base de las hojas. Esto pudiera estar asociado a la presencia de *Phytophthora parasitica* Dastur que es el principal patógeno que afecta al cultivo de la piña 'MD-2' durante la aclimatización⁽¹⁶⁾. No obstante, es necesaria la realización de análisis de laboratorio que permitan identificar si los daños se deben a la presencia de este patógeno.

La Tabla 3 muestra los valores de los indicadores morfológicos de las plantas de piña como respuesta a diferentes tiempos de inmersión en diluciones del extracto acuoso de hojas de moringa. El número de hojas y la masa fresca fueron significativamente superior cuando las plantas se sumergieron por 72 horas en extracto diluido 1:8, sin diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos donde se utilizó el extracto acuoso de hojas de moringa, independientemente de la dilución y el tiempo de inmersión. La longitud de la planta alcanzó los mayores valores cuando se utilizó el extracto diluido 1:4 por 48 horas y el extracto diluido 1:8 por 72 horas, sin diferencias estadísticas con los tratamientos donde se utilizó el extracto acuoso de hojas de moringa independientemente del tiempo de inmersión. La longitud de la raíz más larga fue mayor cuando la inmersión en el extracto acuoso de hojas de moringa se realizó por 48 y 72 horas, independientemente de la dilución. La masa seca no mostró

diferencias significativas entre las diluciones utilizadas, excepto cuando la inmersión se realizó en la dilución 1:4 por 72 horas. El número de raíces no mostró diferencia entre los tratamientos.

Tabla 3. Efecto del tiempo de inmersión y la dilución del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius sobre indicadores morfológicos de plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* ‘MD-2’ luego de 42 días en aclimatización

Dilución extracto	Tiempo (horas)	Número de hojas	Longitud planta (cm)	Número de raíces	Longitud raíz más larga (cm)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
	0	3,61 (13) b*	9,36 b	2,65 (7)	3,09 b	3,78 b	0,27 b
1:4	24	3,74 (14) ab	11,51 ab	2,65 (7)	3,19 b	4,02 ab	0,34 ab
	48	3,74 (14) ab	13,88 a	2,65 (7)	3,83 ab	4,77 ab	0,33 ab
	72	3,74 (14) ab	12,23 ab	2,65 (7)	4,07 ab	4,22 ab	0,30 b
1:8	24	3,74 (14) ab	11,76 ab	2,65 (7)	3,18 b	3,97 ab	0,34 ab
	48	3,87 (15) ab	11,47 ab	2,65 (7)	3,87 ab	4,13 ab	0,31 ab
	72	4,13 (17) a	14,48 a	2,83 (8)	4,58 a	4,97 a	0,39 a
ESx		0,24	1,7	NS	0,58	0,51	0,04

*Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (n=90, ANOVA bifactorial; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de hojas y número raíces se transformaron de acuerdo con $x' = x^{0,5}$. En la tabla se presentan los datos transformados y entre paréntesis aparecen los datos originales

El hecho de que la inmersión en la mayor dilución del extracto acuoso de moringa (1:8) a las 72 horas mostrara los mejores resultados, en cuanto a la supervivencia y los indicadores morfológicos, pudiera estar relacionada con que la viscosidad de esta disolución es menor, lo que favorece la entrada del agua y la penetración de iones minerales y otros nutrientes que benefician el crecimiento. Por esta razón, se seleccionó este tratamiento para continuar la experimentación debido a que la supervivencia y los indicadores morfológicos evaluados en las plantas mostraron una calidad superior.

Comparación del extracto acuoso de hojas de moringa y el Previcur®

Energy LS 84 en la aclimatización de plantas de piña

Luego de 42 días de cultivo, la supervivencia de las plantas tratadas con Previcur® Energy LS 84, extracto acuoso diluido ocho veces (1:8) y la combinación de ambos fue de 100 %; mientras que la del tratamiento control de 81 % (datos no mostrados).

En la Tabla 4 se muestran los valores de los indicadores morfológicos de las plantas de piña como respuesta a la inmersión, previo a la aclimatización en el extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam. y en el Previcur® Energy LS 84. La longitud de la planta y la longitud de la raíz más larga fueron superiores en las plantas tratadas con Previcur® Energy LS 84, sin diferencias significativas con el extracto acuoso diluido 1:8. La masa fresca mostró los mejores resultados en los tratamientos con Previcur® Energy LS 84 y el extracto acuoso diluido 1:8, sin diferencias significativas con el control. Los indicadores número de hojas, número de raíces y la masa seca no mostraron diferencias para los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Indicadores morfológicos de las plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* 'MD-2' en respuesta a la inmersión en el extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius y en Previcur® Energy LS 84, luego de 42 días en aclimatización

Tratamiento	Número hojas	Longitud plantas (cm)	Número Raíces	Longitud raíz más larga (cm)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
Control	3,74 (14)	9,38 c	2,64 (7)	3,30 b	3,39 a	0,29
Extracto acuoso (1:8)	4,00 (16)	14,60 a	2,82 (8)	4,53 a	3,55 a	0,37
Previcur® Energy LS 84	4,00 (16)	15,35 a	2,82 (8)	4,95 a	3,66 a	0,35
Extracto acuoso (1:8) + Previcur® Energy LS 84	4,00 (16)	12,30 b	2,64 (7)	2,60 b	2,72 b	0,25
ESx	NS	1,33	NS	0,52	0,24	NS

*Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (n=90, ANOVA de un factor; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de hojas y número de raíces se transformaron de acuerdo con $x' = x^{0.5}$. En la tabla se presentan los datos transformados y entre paréntesis aparecen los datos originales

Los indicadores morfológicos de las plantas que se trataron con la inmersión durante 72 horas en extracto acuoso diluido 1:8 seguido de tres minutos en Previcur® Energy LS 84 se vieron afectados. Es posible que los compuestos fenólicos y los aminoácidos aromáticos de las proteínas presentes en el extracto crudo de hojas de moringa interactuaran con el ingrediente activo del Previcur® Energy LS 84 (propamocarb fosetilato) generando compuestos químicos del tipo de los fenilcarbamatos. Estos compuestos son reconocidos por tener actividad

herbicida y pueden actuar como inhibidores de la mitosis o del transporte de electrones en los cloroplastos afectando del crecimiento de las plantas ⁽²³⁾.

Los resultados de esta investigación demostraron el efecto beneficioso del extracto acuoso de hojas de moringa sobre los indicadores morfológicos en la aclimatización de la piña ‘MD-2’. El contacto directo del extracto acuoso de hojas de moringa por 72 horas con las estructuras absorbentes de las raíces de las plantas de piña ‘MD-2’ pudo haber favorecido la entrada de minerales y compuestos orgánicos presentes en el extracto. Algunos autores reconocen el efecto estimulador del crecimiento de los extractos crudos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam., asociado a la presencia de aminoácidos, iones minerales como K^+ y Ca^{2+} , ácido ascórbico y compuestos fenólicos ⁽²⁴⁾.

Además, cuando se aplicó el extracto acuoso diluido 1:8, el Previcur[®] Energy LS 84 y la combinación de ambos tratamientos no se notaron síntomas visibles de enfermedades fungosas que aparecen en esta etapa crucial de la aclimatización, donde se reconoce que la mayor mortalidad de las plantas está asociada a *Phytophthora parasitica* Dastur ⁽¹⁶⁾. Este comportamiento observado con el extracto acuoso pudiera estar asociado a la presencia de compuestos fenólicos (Tabla 1), los que poseen reconocida actividad antimicrobiana ⁽²⁵⁾.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de hojas de moringa favoreció la etapa inicial de la aclimatización de la piña ‘MD-2’. La inmersión de las raíces de las plantas de piña por 72 horas en extracto acuoso diluido ocho veces (1:8) benefició el crecimiento de las plantas y no se apreciaron diferencias con el Previcur[®] Energy LS 84.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones se realizaron en el marco del proyecto nacional P131LH003028 “Obtención de extractos vegetales bioactivos, ricos en metabolitos secundarios para el control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola”, coordinado por la Dra. Martha Hernández de la Torre. Los autores agradecen la contribución al trabajo del Lic. Arturo Matos Ruíz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar DS. *Moringa oleifera*: a review on nutritive importance and its medicinal application. Food Science and Human Wellness. 2016;5(2):49–56. doi:10.1016/j.fshw.2016.04.001
2. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. *Moringa oleifera* seeds and oil: characteristics and uses for human health. International Journal of Molecular Sciences. 2016;17(12):2141–54. doi:10.3390/ijms17122141
3. Nadeem M, Imran M. Promising features of *Moringa oleifera* oil: recent updates and perspectives. Lipids in Health and Disease. 2016;15(1):212–20. doi:10.1186/s12944-016-0379-0
4. Sumathy R, Vijalakshmi M, Deecaraman M, Sankaranarayanan S, Bama P, Ramachandran J. Screening of secondary metabolites antioxidant and antimicrobial activity from the petals of *Moringa oleifera*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;3(6):1829–43.
5. Iqbal MA, Manan Saleem A, Ahmad B. Effect of seed invigoration techniques on germination and seedling growth of chinese sweet sorghum. Zenodo. 2015;2(2):1–4. doi:10.5281/zenodo.999917
6. Emongor VE. Effects of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract on growth, yield and yield components of snap beans (*Phaseolus vulgaris*). British Journal of Applied Science & Technology. 2015;6(2):114–22. doi:10.9734/BJAST/2015/14795
7. Yasmeen A, Basra SMA, Wahid A, Nouman W, REHMAN HU. Exploring the potential of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) as a seed priming agent in improving wheat performance. Turkish Journal of Botany. 2013;37(3):512–20. doi:10.3906/bot-1205-19
8. Al_husnan LA, Alkahtani MDF. Impact of moringa aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi *in vitro*. Annals of Agricultural Sciences. 2016;61(2):247–50. doi:10.1016/j.aos.2016.06.003
9. Chiejina NV, Onaebi CN. Phytochemical constituents and antifungal properties of *Chromolaena odorata* L. and *Moringa oleifera* Lam on fungal rot of cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. Asian Journal of Plant Sciences. 2016;15(1–2):35–41. doi:10.3923/ajps.2016.35.41
10. Goss M, Mafongoya P, Gubba A. *Moringa oleifera* extracts effect on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* Growth. Asian Research Journal of Agriculture. 2017;6(1):1–10. doi:10.9734/ARJA/2017/29835

11. Bartholomew DP. MD-2'pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineapple News*. 2009;16(8):2–5.
12. FAOSTAT. FAO Statistics Division [Internet]. Roma, Italia: Crops, Production; 2014 p. 175. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3590e.pdf>
13. Amar AT, Tong PS, Ng C. The MD2' Sperm Sweet' pineapple (*Ananas comosus*). *UTAR Agriculture Science Journal*. 2015;1(4):14–7.
14. Sahu J, Sahu RK. A review on low cost methods for *in vitro* micropropagation of plant through tissue culture technique. *UK Journal of Pharmaceutical Biosciences*. 2013;1(1):38–41. doi:10.20510/ukjpb/1/i1/91115
15. Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*. 1999;18(9):743–8. doi:10.1007/s002990050653
16. Hernández A, Muiño B, Rosón C, Cazola C. Hongos y oomycetes fitopatógenos en viveros de piña *Ananas comosus* (L.) Merrill en Ciego de Ávila, Cuba. *Fitosanidad*. 2011;15(3):137–42.
17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473–97. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248–54.
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P t, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28(3):350–6. doi:10.1021/ac60111a017
20. Gurr SI, McPherson J, Bowles DJ. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: Gurr S., McPherson J, Bowles DJ, editors. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*. Oxford, England: Oxford University Press; 1992. p. 51–6.
21. Villalobo A, González J, Santos R, Rodríguez R. Morpho-physiological changes in pineapple plantlets [*Ananas comosus* (L.) Merr.] during acclimatization. *Ciência e Agrotecnologia*. 2012;36(6):624–30. doi:10.1590/S1413-70542012000600004
22. Pino Y, Concepción OR, Santos R, González JL, Rodríguez R. Effect of previcur® energy fungicide on MD-2 pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) plantlets during the acclimatization phase. *Pineapple News*. 2014;(21):24–6.

23. Moreland DE. Biochemical mechanisms of action of herbicides and the impact of biotechnology on the development of herbicides. *Journal of Pesticide Science*. 1999;24(3):299–307. doi:10.1584/jpestics.24.299
24. Ashfaq M (University of A, Basra SMA (University of A, Ashfaq U (Government CU. Moringa: a miracle plant for agro-forestry. *Journal of Agriculture and Social Sciences (Pakistan)*. 2012;8(3):115–22.
25. El-Mohamedy RSR, Abdalla AM. Evaluation of antifungal activity of *Moringa oleifera* extracts as natural fungicide against some plant pathogenic fungi *in vitro*. *International Journal of Agricultural Technology*. 2014;10(4):963–82.

Effect of foliar aqueous extract of moringa in the initial acclimatization phase of pineapple

Lianny Pérez-Gómez^{1*}

Iris Capote-Betancourt¹

Lelurllys Nápoles-Borrero¹

Danilo Pina-Morgado¹

Claudia Linares-Rivero¹

Maribel Rivas-Paneca¹

Maritza Escalona-Morgado¹

Romelio Rodríguez-Sánchez¹

Aurora Terylene Pérez-Martínez¹

¹Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Cuba. CP 69450

* Author for correspondence. lianny@bioplantass.cu

ABSTRACT

Moringa oleifera Lam. leaves have several chemical constituents such as: amino acids, mineral ions, ascorbate, phytohormones and secondary metabolites. Consequently, these extracts can be used to improve growth in other plants. In addition, it is awarded antimicrobial activity against pathogens of agricultural interest. The objective of this work was to evaluate the effect of the aqueous extract obtained from moringa leaves on the morphological changes of the *Ananas comosus* var. *comosus* 'MD-2' plant in the initial stage of acclimatization. It was evaluated the effect of the concentration (dilutions of 1:4 and 1:8) and the immersion time (0, 24, 48 and 72 hours) in the aqueous extract of moringa previous to the acclimatization of pineapple seedlings. The aqueous extract of moringa and Previcur[®] Energy LS 84 was compared in the acclimatization of pineapple seedlings. It was achieved 100 % survival with the immersion of the pineapple seedlings for 24 and 48 hours in aqueous extract diluted 1:4 and for 72 hours in aqueous extract diluted 1:8. Morphological indicators were higher with the immersion of pineapple seedlings for 72 hours in aqueous extract diluted 1:8, after 42 days in acclimatization. Significant differences weren't observed in morphological indicators for

treated plants only with Previcur® Energy LS 84 and aqueous extract diluted 1:8. In these treatments weren't observed visible symptoms of diseases.

Key words: *Ananas comosus*, biochemical compounds, biostimulant, growth

INTRODUCTION

In recent years, the *Moringa oleifera* Lam., has been widely used in human and animal nutrition, in traditional medicine, in the production of biodiesel and in the pharmaceutical and cosmetic industry ⁽¹⁻³⁾. In addition, their extracts are attributed biostimulant activity because they are rich in amino acids, mineral ions, ascorbate, and phytohormones ^(4,5). This makes it favor the growth of some plants, which allows its use in different branches of agriculture. However, in most studies, extracts of moringa leaves have been used to stimulate germination of legume and cereal seeds, as well as to evaluate their effect on plant growth and development ^(6,7). The presence in moringa extracts of phytochemicals such as coumarins, flavonoids, terpenoids, carotenoids, tannins and phenolic compounds confers antimicrobial activity against pathogens of agricultural interest ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

The pineapple (*Ananas comosus* var. *Comosus*) is the third fruit with the highest production in the world. It has a pleasant taste and aroma, as well as vitamins C, B1, B6, folic acid and minerals such as K⁺ ⁽¹¹⁾. In 2016, its global production amounted to 25,809,038 tons and in Cuba to 48,501 tons ⁽¹²⁾. For pineapple producing countries and in particular for Cuba, the deficiency of propagation material is a problem that arises when it is desired to promote new areas or introduce a new variety.

The hybrid 'MD-2' has characteristics of great economic importance, such as high yields and the quality of the fruit. It is one of the cultivars with the highest import volumes as fresh fruit in the markets of the United States and the European Union ⁽¹³⁾. However, plants grown in the field average only two propagules per productive cycle. This makes it necessary to establish schemes for the production of seeds through biotechnology and to evaluate their introduction in the conditions of Cuba and specifically in Ciego de Ávila territory.

The development of micropropagation techniques has had highly advantageous results in the rapid and quality propagation of several economically important plant species ⁽¹⁴⁾. In this environment, the Bioplant Center developed a micropropagation protocol based on the use of liquid medium and temporary immersion technology together with the implementation of a semi-automated system ⁽¹⁵⁾, which makes it possible to reduce the time needed to generate

sufficient quantities of vitroplants destined to the creation of basic seeds banks that allow the promotion of pineapple plantations with high quality seed.

Acclimatization is due to the fact that the plants undergo physiological changes that can influence the following stages. The pineapple has a slow growth, which delays the duration of this phase. In addition, pineapple plants during acclimatization can be affected by oomycetes and phytopathogenic fungi, mainly of the genus *Phytophthora*, *Fusarium* and *Rhizoctonia*, producing important losses ⁽¹⁶⁾.

The objective of this work was to evaluate the effect of aqueous extract obtained from leaves of *Moringa oleifera* Lam. in the morphological changes of the pineapple plants 'MD-2' in the initial stage of acclimatization.

MATERIALS AND METHIDS

Plant material

The plant material of pineapple (*Ananas comosus* var. *Comosus*) 'MD-2' was supplied by the Technological Scaling and Transfer Laboratory of the Bioplant Center. Plants that came from the in vitro rooting stage (30 days) and were in a culture medium containing: MS salts ⁽¹⁷⁾, 100 mg L⁻¹ of myo-inositol, sucrose at 30 g L⁻¹, were used. , 1 mg L⁻¹ of thiamin-HCl and 2.69 µmol L⁻¹ of naphthalene acetic acid (ANA).

Obtaining and characterization of the aqueous extract of moringa leaves

To obtain the aqueous extract, the leaves of *Moringa oleifera* Lam were used. cv. Supergenius from adult plants of three years grown in the “Juan Tomás Roig” Experimental Station, Center of Bioplants that possessed the phytochemical components shown in Table 1.

Table 1. Phytochemical components detected in the leaves of *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius

Compound	Test or reagent used	Leaves
Volatile coumarins	NaOH	+
Saponins	Foaming,	-
Triterpenes and steroids	Liebermann-Buchard reaction	+
	Salkowski reaction	+
Flavonoids	Reaction of Shinoda	-
Anthracene derivatives	Reaction of Borntrager	-
Phenolic compound	FeCl ₃	+
Tannins	Gelatine-NaCl	-

- Absence of the compound, + Presence of the compound

To obtain the aqueous extract, 400 g of fresh mass of moringa leaves were milled with liquid nitrogen in a commercial blender. The proportion of plant material and water was 1:2.5 (m:v). The extraction was carried out for one hour with agitation and then filtered with gauze to eliminate the plant material. Next, the sample was centrifuged for 20 minutes at 15,000 x g and the supernatant was collected. The concentration of proteins ⁽¹⁸⁾, the concentration of carbohydrates ⁽¹⁹⁾ and the concentration of soluble phenolic compounds ⁽²⁰⁾ were determined to the aqueous extract and are shown in Table 2.

Table 2. Characterization of the aqueous extract obtained from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cv

Supergenius	
	Aqueous extract
Proteins (mg g ⁻¹ MF)	8,27
Carbohydrates (mg g ⁻¹ MF)	53,8
Phenolic compound (mg g ⁻¹ MF)	6,50

(mg g⁻¹ MF= Fresh mass)

Effect of concentration and time immersion in aqueous extract of moringa in the acclimatization of pineapple plants

Homogeneous plants rooted *in vitro* were selected for acclimatization, which had between 0.8-1.62 g of fresh mass, 8-10 cm in length, 4-6 leaves and 3-4 roots, as established in the technical instructions for the propagation of the pineapple of the Bioplants Center ⁽²¹⁾. Two solutions of the aqueous extract of moringa were prepared: extract diluted four times (1: 4) and extract diluted eight times (1: 8). The roots of the plants were submerged during: 0, 24, 48 and 72 hours in the solutions. 7.5 mL of the dilutions of the aqueous extract/plant were used.

They were placed for the duration of the immersion in culture chambers (KOXKA, mod EC-1200F) with controlled environmental conditions. Temperature (25±1 °C), photosynthetic photon flux (PPF = 80 mol m⁻²s⁻¹) and relative humidity (RH = 70 %) were fixed throughout the experiment to promote crop growth, photoperiod it was of 16 light hours and eight hours of darkness.

The plants were planted in plastic containers with a volume of 222.59 cm³ with a mixture of the sifted substrate of Ferralitic Red soil and filter cake (derived from sugarcane) at a ratio of 1: 1 (v/v). They were acclimatized in a house of culture under conditions of 80 ± 3 % relative humidity, 30 ± 2 °C temperature, natural light with photosynthetic photon flux of 400 ± 25 umol m⁻²s⁻¹ and atmospheric conditions of concentration of CO₂ and natural photoperiod.

These were sprayed every 10 days with a foliar fertilizer mixture containing 16.0 g of crystalline N-P-K and 1.0 g of Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120). At 42 days the survival (%) of the plants was determined as the quotient of the number of live plants at the end of this stage between the initial numbers of plants (30 plants). In addition, the morphological indicators were evaluated: fresh mass (g), dry mass (g), length of the plant (cm), number of leaves, length of the longest root (cm) and number of roots per plant.

Comparison of the aqueous abstract of moringa leaves and the Previcur[®] Energy LS 84 in the acclimation of pineapple plants

Four treatments were designed: roots submerged in distilled water for 72 hours (control), roots submerged in moringa extract diluted eight times (1: 8) for 72 hours, roots submerged in Previcur[®] Energy LS 84 (Bayer CropScience, 1.0 ml L⁻¹) for three minutes and a combination of immersion of the roots in moringa extract diluted eight times (1:8) for 72 hours and then in Previcur Energy[®] for three minutes ⁽²²⁾.

The plants were sown and cultivated under the same conditions as in the previous experiment. At 42 days, the same indicators described in the previous experiment were evaluated.

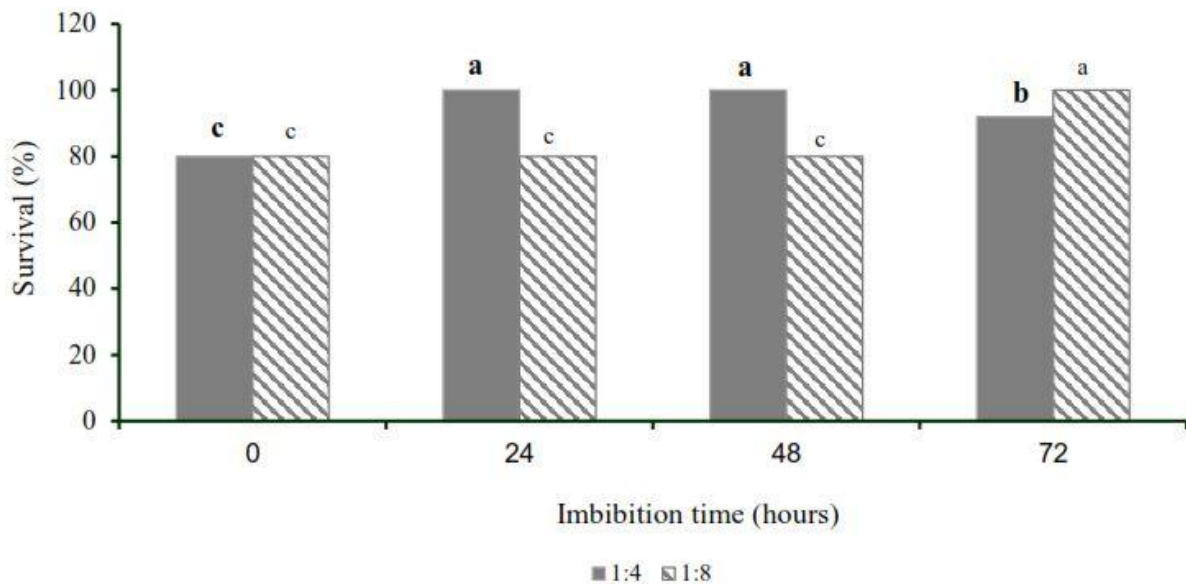
Statistical analysis

In the statistical processing of the data, the utility SPSS Version 21 for Windows, SPSS Inc. was used. The analysis of variance (ANOVA) simple and bifactorial (immersion time and dilution of the aqueous extract) was used. The means of the treatments were compared using Tukey's multiple range test ($p < 0.05$) after checking the assumptions of normality and homogeneity of variances. In the indicators survival, number of leaves and number of roots it was necessary to transform the data to achieve the assumptions of the parametric tests carried out. In both experiments, 30 plants were used per treatment with a completely randomized experimental design. The experiments were repeated three times. The percentage of survival represents the average of the three repetitions ($n=3$). For the rest of the indicators evaluated, each plant was considered as an experimental unit and represents the average of all the individual measurements ($n=90$).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the concentration and immersion time in the aqueous extract of moringa in the acclimatization of pineapple plants

The Figure 1 shows the survival of pineapple plants after 42 days in acclimatization, after immersion of the plants in extract of *Moringa oleifera* Lam diluted four (1:4) and eight times (1:8) during 24, 48 and 72 hours. The best results were obtained with the immersion of the roots of the pineapple plants for 24 and 48 hours in the aqueous extract diluted 1: 4, without significant differences with the dilution 1: 8 for 72 hours. In these treatments 100 % survival of the plants was achieved. On the other hand, the plants whose roots were submerged in aqueous extract of moringa (1: 4) for 72 hours, significantly decreased their percentage of survival. However, the dilution (1:8) required 72 hours of immersion to provide 100 % survival.



Averages with unequal letters differ statistically ($n = 3$, bifactorial ANOVA, Tukey, $p \leq 0.05$)

For the statistical treatment, the data were transformed according to $x' = 2 \arcsin(x / 100) 0.5$. $ESx = 16.2$. The data presented in the figure are not transformed

Figure 1. Effect of the time of immersion of the roots of the plants of *Ananas comosus* var. Comosus 'MD-2' in dilutions of the aqueous extract of leaves of *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius in survival at 42 days under controlled environmental conditions

Plants that died during the experiment showed flaccidity in the leaves with symptoms of rot and brownish-black coloration towards the base of the leaves. This could be associated with the presence of *Phytophthora parasitica* Dastur, which is the main pathogen that affects the

cultivation of the 'MD-2' pineapple during acclimatization ⁽¹⁶⁾. However, it is necessary to perform laboratory analyzes to identify if the damage is due to the presence of this pathogen. Table 3 shows the values of the morphological indicators of the pineapple plants in response to different immersion times in dilutions of the aqueous extract of moringa leaves. The number of leaves and the fresh mass were significantly higher when the plants were submerged for 72 hours in a diluted 1: 8 extract, without statistical differences with the rest of the treatments where the aqueous extract of moringa leaves was used, regardless of the dilution and the time of immersion. The length of the plant reached the highest values when the diluted extract was used 1: 4 for 48 hours and the extract diluted 1:8 for 72 hours, without statistical differences with the treatments where the aqueous extract of moringa leaves was used regardless of Immersion time. The length of the longest root was greater when the immersion in the aqueous extract of moringa leaves was carried out for 48 and 72 hours, independently of the dilution. The dry mass did not show significant differences between the dilutions used, except when the immersion was performed in the 1: 4 dilution for 72 hours. The number of roots showed no difference between the treatments.

Table 3. Effect of the immersion time and dilution of the aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves cv Supergenius on morphological indicators of plants of *Ananas comosus* var. Comosus 'MD-2' after 42 days in acclimatization

Dilution extract	Time (hours)	Number of leaves	Plant length (cm)	Number of roots	Longest root length (cm)	Fresh mass (g)	Dry mass (g)
	0	3,61 (13) b*	9,36 b	2,65 (7)	3,09 b	3,78 b	0,27 b
1:4	24	3,74 (14) ab	11,51 ab	2,65 (7)	3,19 b	4,02 ab	0,34 ab
	48	3,74 (14) ab	13,88 a	2,65 (7)	3,83 ab	4,77 ab	0,33 ab
	72	3,74 (14) ab	12,23 ab	2,65 (7)	4,07 ab	4,22 ab	0,30 b
1:8	24	3,74 (14) ab	11,76 ab	2,65 (7)	3,18 b	3,97 ab	0,34 ab
	48	3,87 (15) ab	11,47 ab	2,65 (7)	3,87 ab	4,13 ab	0,31 ab
	72	4,13 (17) a	14,48 a	2,83 (8)	4,58 a	4,97 a	0,39 a
ESx		0,24	1,7	NS	0,58	0,51	0,04

* Averages with unequal letters differ statistically for each indicator (n=90, bifactorial ANOVA, Tukey, p≤0.05). For the statistical treatment, the leaf number and root number data were transformed according to $x' = x^{0.5}$. The table shows the transformed data and the original data appear in parentheses

The fact that the immersion in the highest dilution of the aqueous moringa extract (1:8) at 72 hours showed the best results in terms of survival and the morphological indicators could be related to the lower viscosity of this solution, which favors the entry of water and the

penetration of mineral ions and other nutrients that benefit growth. For this reason, this treatment was selected to continue the experimentation because the survival and the morphological indicators evaluated in the plants showed a superior quality.

Comparison of the aqueous abstract of moringa leaves and the Previcur[®] Energy LS 84 in the acclimation of pineapple plants

After 42 days of culture, the survival of the plants treated with Previcur[®] Energy LS 84, aqueous extract diluted eight times (1:8) and the combination of both was 100 %; while that of the control treatment of 81 % (data not shown).

Table 4 shows the values of the morphological indicators of pineapple plants as a response to immersion prior to acclimatization in the aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves and in the Previcur[®] Energy LS 84. The length of the plant and the length of the longest root were higher in the plants treated with Previcur[®] Energy LS 84, without significant differences with the aqueous extract diluted 1: 8. The fresh mass showed the best results in the treatments with Previcur[®] Energy LS 84 and the aqueous extract diluted 1:8, without significant differences with the control. The indicators number of leaves, number of roots and dry mass did not show differences for the treatments evaluated.

Table 4. Morphological indicators of the plants of *Ananas comosus* var. *comosus* 'MD-2' in response to immersion in the aqueous extract of leaves of *Moringa oleifera* Lam. cv Supergenius and in Previcur[®] Energy LS 84, after 42 days in acclimatization

Treatments	Number of leaves	Length of plants (cm)	Number of roots	Longest root length (cm)	Fresh mass (g)	Dry mass (g)
Control	3,74 (14)	9,38 c	2,64 (7)	3,30 b	3,39 a	0,29
Aqueous extract (1:8)	4,00 (16)	14,60 a	2,82 (8)	4,53 a	3,55 a	0,37
Previcur [®] Energy LS 84	4,00 (16)	15,35 a	2,82 (8)	4,95 a	3,66 a	0,35
Aqueous extract (1:8) + Previcur [®] Energy LS 84	4,00 (16)	12,30 b	2,64 (7)	2,60 b	2,72 b	0,25
ESx	NS	1,33	NS	0,52	0,24	NS

* Averages with unequal letters differ statistically for each indicator (n = 90, one-way ANOVA, Tukey, p≤0.05). For the statistical treatment, the leaf number and root number data were transformed according to $x' = x^{0.5}$. The table shows the transformed data and the original data appear in parentheses

The morphological indicators of the plants that were treated with immersion for 72 hours in aqueous extract diluted 1: 8 followed by three minutes in Previcur[®] Energy LS 84 were affected. It is possible that the phenolic compounds and the aromatic amino acids of the

proteins present in the raw extract of moringa leaves interacted with the active ingredient of Previcur[®] Energy LS 84 (propamocarb fosetilate) generating chemical compounds of the phenylcarbamate type. These compounds are known to have herbicidal activity and can act as inhibitors of mitosis or electron transport in chloroplasts affecting the growth of plants ⁽²³⁾.

The results of this investigation showed the beneficial effect of the aqueous extract of moringa leaves on the morphological indicators in the acclimatization of the 'MD-2' pineapple. The direct contact of the aqueous extract of moringa leaves for 72 hours with the absorbent structures of the roots of the pineapple plants 'MD-2' could have favored the entry of minerals and organic compounds present in the extract. Some authors recognize the stimulatory effect of the growth of aqueous extracts of leaves of *Moringa oleifera* Lam., associated with the presence of amino acids, mineral ions such as K⁺ and Ca²⁺, ascorbic acid and phenolic compounds ⁽²⁴⁾.

In addition, when the aqueous extract diluted 1: 8 was applied, the Previcur[®] Energy LS 84 and the combination of both treatments showed no visible symptoms of fungal diseases that appear at this crucial stage of acclimatization, where it is recognized that the highest mortality of plants is associated with *Phytophthora parasitica* Dastur ⁽¹⁶⁾. This behavior observed with the aqueous extract could be associated with the presence of phenolic compounds (Table 1), which have recognized antimicrobial activity ⁽²⁵⁾.

CONCLUSIONS

The aqueous extract of moringa leaves favored the initial stage of the acclimatization of the 'MD-2' pineapple. The immersion of the roots of the pineapple plants for 72 hours in an aqueous extract diluted eight times (1: 8) benefited the growth of the plants and no differences were seen with the Previcur[®] Energy LS 84.

ACKNOWLEDGEMENT

The investigations were carried out in the framework of the national project P131LH003028 “Obtaining bioactive plant extracts, rich in secondary metabolites for the control of pests and diseases of crops of agricultural importance”, coordinated by Dr. Martha Hernández de la Torre. The authors are grateful for the contribution to the work of Degree. Arturo Matos Ruíz.