



ESTABLECIMIENTO DE LA PRIMERA ETAPA DE UN CULTIVO *IN VITRO* DE MORINGA (*MORINGA OLEIFERA* LAM.)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST STAGE OF AN *IN VITRO* CULTURE OF MORINGA (*MORINGA OLEIFERA* LAM.)

Laura Estefanía Aguirre González¹

Laura Cardona Bedoya²

Catherine Gómez López³

Alejandro Clavijo Maldonado⁴

Recibido: 28 de julio de 2017

Aceptado: 09 de octubre de 2017

Resumen

Se validó la primera etapa de un sistema de micropropagación para la especie vegetal *M. oleifera*, para lo cual en condiciones de asepsia, semillas, segmentos nodales y láminas foliares fueron sometidas a desinfección y sembradas en medio basal MS en cabina de flujo laminar. La incubación se realizó en completa oscuridad a temperatura de 28°C posteriormente se implementó un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad (16:8). Se alcanzó una germinación de 26,7% para semillas de las cuales se tomaron nuevamente explantes sembrados asépticamente alcanzando un 90% de viabilidad. Se obtuvieron 34 microbrotes los cuales fueron sembrados en medio MS sin inoculación de reguladores de crecimiento. *M. oleifera* demuestra ser una especie de alta capacidad de regeneración *in vitro* y de promoción de nuevos brotes, al tiempo que posee una importante tasa de crecimiento radicular.

Palabras claves: *Moringa oleifera*, micropropagación, germinación, desinfección, contaminación.

1. Colombiana. Tecnóloga en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Industria Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro para la Formación Cafetera del SENA. email: laura.sag@misena.edu.co
2. Colombiana. Tecnóloga en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Industria Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro para la Formación Cafetera del SENA, investigadora Grupo EAYER. email: lcardona21@misena.edu.co
3. Colombiana. Magíster Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro de Servicios y Gestión Empresarial, Gestora Línea Biotecnología y Nanotecnología Tecno Parque Nodo Medellín. Investigadora Grupo GIGAT. email: katherinegom@misena.edu.co
4. Colombiano. Magíster Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro para la Formación Cafetera, instructor e investigador Grupo BIOSAN, Investigador Grupo EAYER. email: alejandrocvmz@misena.edu.co

Abstract

The first stage of a micropropagation system for the *M. oleifera* plant species was validated. For this purpose, under asepsis conditions, seeds, nodal segments and foliar sheets were subjected to disinfection and seeded in MS basal medium in laminar flow cabin. The incubation was performed in complete darkness at 28 ° C for a photoperiod of 16 hours of light and eight of darkness (16: 8). A germination of 26.7% was obtained for seeds from which aseptically seeded explants were taken again reaching 90% of viability. Subsequently, 34 micro sprouts were obtained which were seeded in MS medium without inoculation of growth regulators. *M. oleifera* proves to be a species of high capacity of in vitro regeneration and of promotion of new outbreaks, while owning a significant rate of root growth.

Keywords– *Moringa oleifera*, micropropagation, germination, disinfection, contamination.

Introducción

Moringa oleifera, conocido comúnmente como moringa, es un árbol perteneciente a la familia Moringaceae, nativo de las regiones meridionales del Himalaya. Debido a sus cualidades, como alta tolerancia al calor y resistencia a las sequías (Olson y Fahey, 2011; Salem, 2016), además de su elevado contenido nutricional y beneficios terapéuticos (Caceres et al., 1992; Fuglie y Fuglie, 2001; Bonal, Rivera y Bolívar, 2012), ha sido ampliamente cultivado en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo (Martín et al., 2013), incluyendo América (Del Toro, Carballo y Rocha, 2012).

Todas las partes del árbol pueden ser aprovechadas de diferentes maneras, las hojas son una fuente de proteínas, calcio, hierro, vitaminas, aminoácidos y compuestos antioxidantes, por lo que es usada tanto en la alimentación humana como animal (Fuglie, 1999; Fuglie y Fuglie, 2001; Fahey, 2005; Sultana y Anwar, 2008; Olson y Fahey, 2011; Agramonte et al., 2014; Villarreal, Angulo y Johana, 2014). Igualmente se emplean como forraje, para el control de plagas y producción de biogás (Martín et al., 2013). Las semillas se han empleado para la alimentación, aplicación en la medicina (Anwar et al., 2007; Posmontier, 2011), fertilizante agrícola (Becker, Foild y Makkar, 2001) y en el tratamiento de aguas (Kardam, 2010; Martín et al., 2013). Su aceite es utilizado en la industria de perfumes y cosméticos (Tsaknis et al., 1999), además de su aplicación en la producción de biodiesel (Olson y Fahey, 2011). Debido a sus propiedades y múltiples aplicaciones el cultivo de *Moringa* representa una oportunidad potencial para agricultura sostenible y desarrollo de cultivos comerciales.

La importancia de la micropropagación de la moringa radica esencialmente en comprender mejor sus características de crecimiento bajo estas condiciones, la conservación de la especie ha sido altamente explotada, además de permitir la mejora de sus propiedades nutricionales obtenidas bajo este método a diferencia del cultivo convencional (Saini et al., 2012). Se ha descrito el cultivo *in vitro* de *M. oleifera* a partir de segmentos nodales o por semillas (Stephenson y Fahey, 2004; Islam et al., 2005; Steinitz et al., 2009; Marfori, 2010; Saini et al., 2012; Agramonte et al., 2014; Matos et al., 2016). El presente trabajo presentó los procesos de investigación aplicada en la Tecnoacademia Manizales como parte de la formación efectuada en el marco de la



estandarización de un sistema de cultivo *in vitro* de *M. oleifera* a partir de explantes y semillas, a las que posteriormente se le aplicaron procesos fitoquímicos.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se colectaron semillas en plantas adultas de *M. oleifera* de campo, las cuales se seleccionaron de acuerdo a la uniformidad en tamaño, sin evidencia de malformaciones o daños a nivel de la corteza, ausencia de humedad y de insectos colonizando las vainas. Cada una de estas fue empacada en un recipiente plástico limpio y debidamente rotulado y trasladado al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Tecnoacademia Manizales. Adicionalmente, se colectaron tallos jóvenes de las mismas plantas de los cuales se sembraron segmentos nodales y laminas foliares mediante propagación *in vitro*. Este material fue colectado ocho horas antes con el fin de evitar la deshidratación excesiva, empacado en recipientes plásticos herméticos, rotulados y transportados.

Establecimiento de medio de cultivo desinfección de material vegetal.

Se preparó medio basal MS-0 4,4 gr/L (Murashige y Skoog, 1962), 30 gr/L de sacarosa, 8 gr/L de agar-agar y 0,5 gr/L de carbón activado. El medio fue ajustado a pH de 5,7 a 5,8 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.5 N empleando un pH metro SI Analytics Lab 855. Posteriormente, se sometió a esterilización en autoclave Tuttnauer a 121°C durante 15 minutos. Se dispuso de 30 mL de medio de cultivo en frascos para compota, 10 mL en cajas

Petri y 6 mL en tubos de ensayo pequeños, este procedimiento se realizó bajo cabina de flujo laminar y en presencia de llama, cerrando cada recipiente y sellándolo con papel Parafilm.

Entre tanto que gelificaba el medio por enfriamiento, se procedió a la desinfección de las semillas, lo cual consistió inicialmente en remoción de la testa para acelerar la germinación, luego lavado con agua jabonosa 7%(v/v) de concentración de solución detergente manteniendo la agitación constante durante 15 minutos. Posteriormente se sumergieron en alcohol (EtOH) al 70% (v/v) durante un minuto, hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% (v/v) adicionado con dos gotas de una solución tensoactiva y disolvente de grasas (Tween 80) en 100 ml por seis minutos (figura 1-C), luego tres lavados con agua desionizada estéril y sumersión en 100 mL de ácido ascórbico a 200 ppm como antioxidante, por último secado en papel filtro estéril.

En la desinfección de hojas y tallos correspondiente a segmentos nodales se realizó el mismo proceso, solo que se redujo la concentración de NaClO a 3% (v/v) a fin de evitar fitotoxicidad. Antes de la siembra se realizaron cortes con pinzas y tijeras estériles en trozos de 1 cm² aproximadamente evitando la presencia de la nervadura central.

Las siembras se realizaron de manera aséptica, las semillas fueron sembradas en frascos para compota con 30 mL de medio, los tallos y láminas foliares en medio similar en tubos de ensayo y cajas Petri con 6 mL y 10 mL de medio respectivamente (figura 2). Para ninguno de los cultivos se empleó tratamiento hormonal. Todas las siembras se mantuvieron en oscuridad continua y temperatura aproximada de 28°C

hasta la germinación, luego se sometieron a fotoperíodo de 16:8 (16 horas luz y 8 de oscuridad) con luz blanca de tubos fluorescentes.

Posteriormente, de las plántulas germinadas, se seleccionaron aquellas que presentaran mayor tasa de crecimiento desarrollo radicular y foliar (figura 1-D a la G), las cuales en condiciones asépticas con la ayuda de pinzas y bisturí quirúrgico estériles se disecaron a fin

de obtener los ápices, los cuales nuevamente fueron sembrados en medio de cultivo similar al medio de siembra inicial (figura 1- H). El crecimiento se detectó aproximadamente a las dos semanas, por lo cual, bajo condiciones estériles se separaron los nudos obtenidos y se procedió a subcultivar en medio MS basal sin suplementación (figura 1-I). Se aplicó análisis estadístico completamente descriptivo.

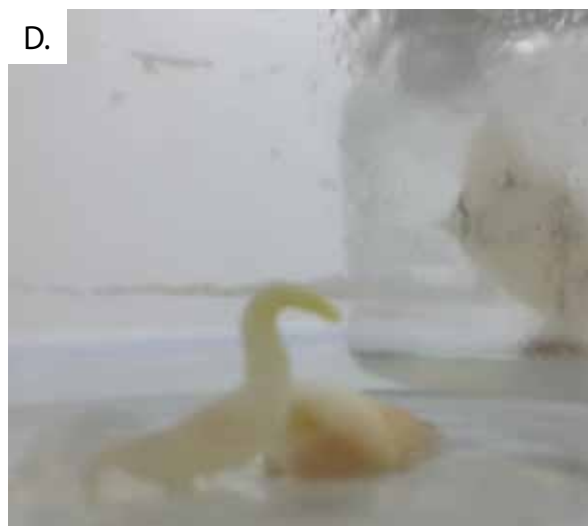






Figura 1. A. Semillas de moringa. B. Remoción de cutícula de semillas previa a su desinfección. C. Desinfección de semilla en NaClO. D. Germinación de semilla. E. Elongación de tallo en fotoperiodo. F. Crecimiento radicular de plántula. G. Desarrollo foliar de plántula. H. Segmento nodal extraído de planta micropropagada. I. Microbrotes de plántula micropropagada.

Fuente: Los autores.



Figura 2. Siembra de segmentos nodales de *M. Oleifera* en tubos de ensayo con medio basal MS.

Fuente: Los autores



Resultados y Discusión

El crecimiento de las plántulas se vio caracterizado por hojas de color blanquecino y tallo delgado lo cual fue cambiando a un color verde intenso y tallo engrosado al ser expuestas de manera continua a fotoperíodo.

Se detectó tasas de crecimiento en varias de las siembras razón de 1 cm diario alcanzando una altura de 10 cm en 15 días, aunque esta tasa de crecimiento no fue constante para todas las siembras. En adición, se observó un 26,7% de germinación en las semillas (Figura 1-D) las cuales brotaron solo hasta cuatro semanas después de la siembra y 0% de viabilidad de segmentos axilares y láminas foliares. Los porcentajes de contaminación fueron elevados donde el 28,9% corresponde a hongos filamentosos, bacterias o mixta en semillas, 89,5% por hongos especialmente y concomitante con fenolización en segmentos nodales y 17,1% por bacterias mayormente en láminas foliares. El restante de los explantes no tuvo actividad alguna de crecimiento.

De doce plántulas germinadas (26,7%) de manera exitosa, se seleccionaron cuatro que presentaron cualidades de crecimiento ideales, de estas se obtuvo siete segmentos apicales. No se observó contaminación y se tuvo una viabilidad del 90%. De estos siete segmentos se obtuvo 34 nudos o microbrotes los cuales no presentaron crecimiento al ser subcultivados.

Un sistema de cultivo *in vitro* exitoso implica condiciones asépticas adecuadas y un procedimiento de desinfección de material vegetal efectivo, al tiempo que se permita el bienestar de los tejidos sometidos evitando

fitotoxicidad. Adicionalmente, en el caso de la siembra de semillas de *M. oleifera*, es importante la remoción de la testa para estimular la germinación. Adicionalmente, se ha evidenciado que tiempos de exposición mayores de semillas en presencia de EtOH 70% y NaClO a concentración de 15% reduce la contaminación y aumenta la tasa de germinación hasta del 56% (Artiga, 2012), 80% (Muñoz, 2015), siendo para estos autores mayor porcentaje comparado con el presente estudio.

Si bien, los métodos de desinfección de semillas de *M. oleifera* varían en concentraciones y tiempos de tratamiento, las proporciones del medio de cultivo son semejantes entre los autores (Saini et al. 2012; Muñoz, 2015; Salem, 2016), por lo cual, es verificada la efectividad del medio basal MS para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de esta especie al inducir la producción de brotes (Stephenson y Fahey, 2005; Muñoz, 2015). Por otra parte, para la inducción de brotes o nudos a partir de láminas foliares y segmentos nodales, es importante la presencia de citoquinas como la N⁶-benciladenina (BA) que es un estimulante mitótico para tejidos no meristemáticos y de auxinas como el ácido 1-naftalén acético (ANA) que promueve el crecimiento y diferenciación celular y vitaminas como el myo-inositol el cual es constituyente fundamental de membranas biológicas (Tirado y Perea, 2011; Ramírez et al. 2012). En este estudio no se emplearon reguladores hormonales de crecimiento ni adición de vitaminas, por lo cual, es deducible la ausencia de desarrollo en estos explantes ni tampoco en los 34 subcultivos de nudos o microbrotes. Saini et al. (2012), hallaron que la aplicación de 4,44 µM de BA permite un óptimo desarrollo de segmentos nodales lo cual fue verificado posteriormente por Agramonte et al. (2014). También se han descrito efectos

favorables de BA y AIA en cultivos a partir de semillas en otras especies (Pedroza-Manrique, 2009). Salem (2016), realizaron la propagación de semillas de *M. oleifera* empleando 5 μ M de BA obteniendo crecimiento de plántulas de 5 cm después de cuatro semanas.

Segmentos nodales y láminas foliares son más sensibles a los procesos de desinfección, ya que entre menos tiempo de exposición a EtOH 70% y NaClO, habrá mayor índice de contaminación pero habrá mayor porcentaje de viabilidad de explantes, entre tanto, que mayor tiempo habrá una pérdida significativa de superficie biológicamente activa en los explantes, en especial si estos proceden de explantes jóvenes (Magaña n.d.). Agramonte et al. (2014), reportaron que el tratamiento de NaClO al 1,5% (v/v) permitió mayor número de brotes y al 2% menos contaminación pero indujo necrosis de tejidos, Matos et al. (2016) con NaClO al 2% durante nueve minutos obtuvo menor tasa de germinación pero también menor contaminación que los tratamientos de cinco y siete minutos, resultados similares fueron los hallados por Artiga (2012).

Se evidenció que el carbón activado en concentración de 0,5 gr/L favorece el desarrollo radicular tras la germinación de semillas de *M. oleifera*, lo cual concuerda con Pedroza-Manrique (2009), además se evidencia menor presencia de fenolización en segmentos nodales.

Conclusiones

M. oleifera es una especie rústica con alta capacidad de regenerar y multiplicar nuevos brotes, al tiempo que posee una importante tasa de crecimiento radicular. Sin embargo, tal

capacidad se ve afectada drásticamente a causa de fenómenos de contaminación sea fúngica o bacteriana. Ante esto, es importante la correcta desinfección del material vegetal ya que es el principal factor de fracaso en la labor de cultivos in vitro. Por lo tanto, se debe contar con un plan de bioseguridad estricto en el cual se puedan controlar diferentes factores contaminantes: biológicos, químicos y físicos que puedan afectar la viabilidad del material micropropagado.

La sumersión de explantes en ácido ascórbico y la presencia de carbón activado en el medio de cultivo juegan un papel importante al controlar la fenolización y estimular el crecimiento del tejido vegetal, además, de tener efecto sinérgico con varios reguladores de crecimiento y diferenciación celular, especialmente para segmentos nodales.

El desarrollo de un sistema de micropropagación de *M. oleifera* implica la apertura a otros frentes de investigación, como la exploración fitoquímica de sus constituyentes, disponibilidad de material vegetal viable y sano para emprendimiento es sistemas silvopastoriles, alimentación humana y animal, manejo de aguas y biomateriales.

En procedimientos posteriores de micropropagación de *M. oleifera* se pretende incrementar los tiempos y concentraciones en las fases del tratamiento de desinfección, esto es aplicable especialmente en semillas al ser resistentes; para explantes como segmentos nodales y láminas foliares solo se modificarían los tiempos a fin de evitar fitotoxicidad. En adición, se pretende evaluar los efectos de reguladores como BA, ANA y myo-inositol.



Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo con el suministro de material vegetal a la Hacienda Guadalupe, del mismo modo a los Centros de Automatización Industrial en la Tecnoacademia Manizales, a TecnoParque Nodo Manizales del Sena Regional Caldas y a los revisores quienes con sus observaciones han contribuido en la mejor calidad del presente manuscrito.

Referencias

- Agramonte, D., Pons-Corona, M., Pérez, M., García-Águila, L., Freire-Seijo, M., & Jiménez-Terry, F. (2014). Obtención de plantas *in vitro* de *Moringa oleifera* Lam. var. PKM criolla a partir de segmentos nodales. *Biotecnología Vegetal*, 14(4).
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy research*, 21(1), 17-25.
- Artiga, S.M.E (2012). Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido callogénico a partir de laminas foliares, segmentos peciolares y vitro-explantos hipocotiledonares y radicales de *Moringa oleifera*. Zamorano, Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria, Honduras. pp. 32.
- Becker, K., Foild, N., & Makkar, H. P. S. (2001). The Potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *Dar Es Salaam*.
- Bonal, R, Rivera RM, & Bolívar ME (2012) *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. *MEDISAN*, 16(10): 1029-3019.
- Caceres, A., Saravia, A., Rizzo, S., Zabala, L., De Leon, E., & Nave, F. (1992). Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(3), 233-237.
- Del Toro Martínez, J. J., Carballo Herrera, A., & Rocha Román, L. (2012). Valoración de las propiedades nutricionales de *Moringa oleifera* en el departamento de Bolívar. *Revista de Ciencias*, 15, 23-30.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1(5).
- Fuglie LJ (1999) The miracle tree: *Moringa oleifera*: natural nutrition for the tropics. Church World Service, Dakar.
- Fuglie, L. J., & Fuglie, J. (2001). The miracle tree: The multiple attributes of *Moringa* (No. SB 317. M67. M57 2001).
- Islam, S., Jahan, M. A. A., & Khatun, R. (2005). In vitro regeneration and multiplication of year-round fruit bearing *Moringa oleifera* L. *J Biol Sci*, 5, 145-148.
- Kardam, A., Raj, K. R., Arora, J. K., Srivastava, M. M., & Srivastava, S. (2010). Artificial neural network modeling for sorption of cadmium from aqueous system by shelled *Moringa oleifera* seed powder as an agricultural waste. *Journal of Water Resource and Protection*, 2(04), 339.
- Magaña, M. (n.d.). Developing a Standardized *in vitro* sterilization method for field-grown

- Moringa oleifera* explants. Department of Science, Faculty of Science and Technology. University of Belize. pp. 29.
- Marfori, E. C. (2011). Clonal micropropagation of *Moringa oleifera* L. The Philippine Agricultural Scientist, 93(4), 454-457.
- Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E., & Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Pastos y Forrajes, 36(2), 137-149.
- Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E., & Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Pastos y Forrajes, 36(2), 137-149.
- Matos Ruiz, A., Capote Betancourt, I., Pérez Martínez, A., Lezcano Más, Y., Aragón Abreu, C. E., Pina Morgado, D., & Escalona Morgado, M. (2016). Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. Cultivos Tropicales, 37, 49-56.
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. Revista mexicana de biodiversidad, 82(4), 1071-1082.
- Muñoz, A.J.M. (2015). Desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* y transformación genética de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam). Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 83.
- Pedroza-Manrique, J.A., Serrato-Muñoz, L.C., Castaño-Robayo, M. (2009). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl.. *In vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología, 12, (2), 86-102.
- Posmontier, B. (2011). The medicinal qualities of *Moringa oleifera*. Holistic nursing practice, 25(2), 80-87.
- Ramírez, H., Guevara, M.H., Escobar, P.R.H. (2012). Los reguladores de Crecimiento. En: Cultivo de Tejidos Vegetales Conceptos y Prácticas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Pág. 65-80.
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2012). Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. 3 Biotech, 2(3), 187-192.
- Salem, J. M. (2016). *In vitro* propagation of *Moringa oleifera* L. under salinity and ventilation conditions. Genetics and Plant Physiology, 6(1-2), 54-64.
- Steinitz, B., Tabib, Y., Gaba, V., Gefen, T., & Vaknin, Y. (2009). Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(1), 65-71.
- Stephenson, K. K., & Fahey, J. W. (2004). Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. Economic botany, 58(sp1), S116-S124.



- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879-884.
- Tirado, P.A.T., Perea, D.M. (2011). Cultivo de Tejidos Vegetales Cultivo de células y tejidos vegetales. En: *In Vitro* manual de prácticas de laboratorio. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia. Pág. 21-24.
- Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Dourtoglou, V., & Spiliotis, V. (1999). Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 47(11), 4495-4499.
- Villarreal Gómez, A., & Ortega Angulo, K. J. (2014). Review of characteristics and uses of the plant *Moringa oleifera*. *Investigación y Desarrollo*, 22(2), 309-33