

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Propagación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. (Asphodelaceae) a partir de yemas apicales. Panamá, 2005.

Por:

José David Romero Quintero

Asesor:

Ivonne del C. Oviedo E.

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología

Provincia de Chiriquí, República de Panamá

2005

26/8/05

B.R.S.S.

Proeffi

Don

e1

15089

DEDICATORIA

A Dios por otorgarme sabiduría e inteligencia.

A mis padres y hermana quienes fueron mi fuente de inspiración.

A mis abuelos, tíos, primos por apoyarme y animarme a continuar y,

A mis amigos y profesores por el estímulo de superación.

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por concederme el privilegio de la vida y estar a mi lado en todo momento,

A mis queridos padres por su paciencia y haber inculcado siempre en mí un espíritu de superación,

A mi hermana por su ayuda incondicional y mis tíos por su total apoyo en mis estudios,

A mis amigos por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio ocupó mi tiempo y esfuerzo,

A los profesores Ivonne del C. Oviedo, Rafael Rincón y Pedro Caballero por compartir sus conocimientos, asesoría y colaboración en esta investigación.

Agradezco a la profesora Clotilde Arrocha y Yira Miranda por facilitarme el material vegetal para realizar este proyecto,

A todos los profesores que han contribuido con mi educación y desarrollo profesional,

A Janet Samudio y Daira Icaza quienes me brindaron su asistencia en el laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas por permitirme utilizar el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela de Biología para hacer este estudio y,

A todas aquellas personas que de una forma u otra han estado conmigo y me han enseñado que la lucha es la condición esencial de la victoria; el esfuerzo tenaz vence las dificultades y la perseverancia supera en logros a la inteligencia y al dinero.

INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
Aspectos generales de la propagación	4
1. Propagación de <i>Aloe barbadensis</i> Mill.	6
1.2. Propagación a cielo abierto	8
1.2.1. Suelo	10
1.2.2. Clima	10
1.2.3. Riego	11
1.2.4. Fertilización	11
1.2.5. Control de malezas	12
1.2.6. Enfermedades	12
1.2.7. Cosecha	13
1.2.8. Rendimiento	14
1.3. Propagación en invernadero	14
2. Cultivo de tejidos vegetales	15
2.1. Micropropagación	17
2.2. Tipos de micropropagación	18
2.3. Etapas de la micropropagación	19
2.4. Reguladores del crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	21
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Aloe sp.</i>	23

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
	1. Desinfección del material, área de siembra y crecimiento	27
	2. Selección del explante	28
	3. Desinfección del explante	28
	4. Preparación del medio de cultivo	29
	5. Siembra del explante	29
	6. Evaluación del explante <i>in vitro</i>	29
	7. Siembra y aclimatación de los explantes <i>ex vitro</i>	29
	8. Evaluación del explante <i>ex vitro</i>	30
	9. Análisis de los resultados y datos obtenidos	30
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
V.	CONCLUSIONES	49
VI.	RECOMENDACIONES	51
VII.	BIBLIOGRAFÍA	53
VIII.	ANEXOS	57

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Crecimiento promedio (cm) de explantes de <i>A. barbadensis</i> en medios MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas	58
Cuadro 2. Número promedio (cm) de hojas en explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas	58
Cuadro 3. Crecimiento promedio (cm) de raíces en explantes de <i>A. barbadensis</i> en medios MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas	59
Cuadro 4. Número promedio (cm) de raíces en explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas	60
Cuadro 5. Crecimiento promedio (cm) de brotes laterales en los explantes de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas	61
Cuadro 6. Promedio de brotes laterales en explantes de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), a las diez semanas	62
Cuadro 7. Número de plántulas aclimatadas en el invernadero (diez por cada tratamiento), procedentes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. barbadensis</i>	62

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Esquema de los pasos realizados en la propagación <i>in vitro</i> de <i>A. barbadensis</i> a partir de yemas apicales	31
Fig. 2. Crecimiento longitudinal promedio (cm) de los explantes de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), diez semanas después de la siembra	33
Fig. 3. Curvas de crecimiento promedio (cm) de explantes de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.....	34
Fig. 4. Curvas de crecimiento promedio (cm) de raíces en explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.....	36
Fig. 5. Número promedio de raíces en explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) al final de diez semanas.....	39
Fig. 6. Número promedio de raíces en explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.....	39

Fig. 7. Curvas del crecimiento promedio (cm) de brotes laterales de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.....	41
Fig. 8. Promedio de brotes laterales por explantes de <i>A. barbadensis</i> en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) a las diez semanas.....	42
Fig. 9. Porcentajes de supervivencia de explantes de <i>A. barbadensis</i> cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) aclimatados en el invernadero.....	45

RESUMEN

Se propagó *in vitro* plantas de *Aloe barbadensis* Mill. a partir de yemas apicales. Las yemas fueron disectadas de material de campo fenotípicamente deseable, desinfectadas y cultivadas en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento, ácido naftalen acético (ANA) y 6 bencil amino purina (6-BAP). Se evaluó el crecimiento y desarrollo del explante *in vitro* durante 10 semanas, a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 14 horas, una intensidad lumínica de 2675 lux y una humedad relativa de 85%.

Los explantes de *A. barbadensis* crecieron y desarrollaron raíces favorablemente en medio MS (1962) sin reguladores del crecimiento. El número de hojas en los explantes que se cultivaron en medio MS (1962) no se mostró afectado por los reguladores del crecimiento. El mayor crecimiento y número de raíces se presentó en el medio MS (1962) suplementado con 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA y 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP. La proliferación de brotes laterales fue mayor en medio MS (1962) con reguladores, siendo la concentración de 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA y 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP donde tuvieron un buen desarrollo y mostraron buen vigor, color y tamaño. En la etapa de aclimatación en el invernadero las plántulas *in vitro* de *A. barbadensis* que se desarrollaron en el tratamiento sin regulador, presentaron una mayor supervivencia (40.9%), que en los tratamientos con reguladores.

I. INTRODUCCIÓN

Aloe barbadensis Mill. es una planta conocida también como *Aloe vera* L. y comúnmente se le llama sábila o aloe (Anónimo 2002). Inicialmente estaba ubicada dentro de la familia Liliaceae pero, actualmente, pertenece a la familia Asphodelaceae (Judd *et al.* 1999). Presenta un grupo variable de hojas simples, lanceoladas, suculentas, carnosas, alternadas en rosetas en la base del tallo con margen entero a serrato-espinoso y venación paralela (Woodland 1997; Judd *et al.* 1999). Las hojas juveniles de color verde presentan manchas blancas y las que han completado su crecimiento son de color verde grisáceo a blanco-sucio (Anónimo 2003). Su crecimiento puede variar de 30 cm hasta 3 m dependiendo de la variedad y sus hojas alcanzan una longitud de 30 a 60 cm (Orrego 2002).

Esta especie es nativa de zonas tropicales, específicamente de la región mediterránea al sur de Europa y al norte de África o la parte alta del Nilo (Orrego 2002). Esta ampliamente distribuida e introducida en el Viejo y Nuevo Mundo (Anónimo 2003). En Panamá es una planta introducida, exótica y desde 1998, existe una empresa nacional llamada Aloe Panamá, S.A. que cultiva, procesa y comercializa extracto de sábila, como materia prima para elaborar diversos productos que beneficien y mejoren la salud humana.

De esta planta, principalmente se utiliza la zona interna o central (pulpa) de la hoja que presenta abundante contenido mucilaginoso y del cual se extrae el gel con el que se

elaboran muchos productos comerciales en el mundo (Orrego, 2002). Este gel se encuentra envuelto por una fina capa líquida de color amarillo llamada acíbar, que le concede a la planta defensa contra los depredadores. El acíbar es muy amargo por lo cual amedrenta a cualquier atacante y además, es un rápido cicatrizante cuando una hoja sufre un corte (Anónimo 2002).

El Laboratorio Farmacéutico Pejoseca, en Islas Canarias, España, afirma que las sustancias encontradas en cantidades significativas en las hojas de esta planta son: vitaminas, minerales, aminoácidos, antraquinonas, enzimas, mono y polisacáridos; y es la sinergia de todos los componentes de la especie, la que produce los numerosos efectos positivos que presenta en la medicina; por sus propiedades sedantes, astringentes, hidratantes (Anónimo 2002) emolientes, desinflamantes, antiinflamatorias, laxantes, antibióticas, antimicrobianas, saponinas, antitóxicas, antiviral, agente desintoxicante y purificador; además de ser analgésico, es un vigoroso estimulante del crecimiento celular (Sentis 2001). Con la diversificación de sus usos medicinales, se sumaron nuevas utilidades industriales como: la fabricación de cuerdas, textiles, tintes y colorantes ácidos. Más tarde, entraría en el campo de la farmacología y cosmetología, principalmente para la elaboración de jugos, zumos, jabones, cremas, champúes y desodorantes (González y Morón 2004).

Esta especie también es empleada en jardinería como una planta ornamental exótica y es considerada como un amuleto (González y Morón 2004). Se puede propagar por semillas y su germinación ocurre en uno a cuatro meses (Anónimo 2001), pero muchas

veces ésta no es fértil (Imery y Cequea 2002), por lo que se hace más común y más fácil su propagación vegetativa por medio de brotes que surgen de una planta adulta (Orrego 2002). Sin embargo, Araújo *et al.* (2002) señalan que una planta madre en condiciones ambientales naturales solo puede generar tres o cuatro brotes laterales por año; pero aún así, su crecimiento vegetativo es lento (Sentis 2001). Como consecuencia, es imprescindible disponer de métodos alternativos de propagación que contribuyan con el aumento y crecimiento rápido de sus poblaciones, para poder suministrar y satisfacer las expectativas de la demanda industrial creciente debido al aumento y diverso uso que se le da a esta especie. Estudios anteriores sobre propagación de esta especie, se basan en el cultivo *in vitro* utilizando meristemas de plantas madres como explantes y diferentes reguladores del crecimiento vegetal en concentraciones diversas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es desarrollar una biotécnica apropiada de propagación *in vitro* de *Aloe barbadensis* a partir de yemas apicales, utilizando concentraciones bajas de reguladores del crecimiento vegetal, que permitan multiplicarla masivamente a corto plazo y menor costo, así como lograr su mejoramiento y conservación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Aspectos generales de la propagación

La propagación de las plantas es un proceso por el que se reproduce o multiplica con éxito una especie vegetal (Morales 2005). La mayor parte de éstas especies vegetales que son cultivadas, se perderían o se reverterían a formas menos convenientes, a menos que se propagasen en condiciones controladas capaces de preservar las características que las hacen útiles. Además, con el pasar del tiempo, a medida que se han dispuesto de nuevos tipos de plantas, se han tenido que desarrollar las técnicas para mantenerlas y, conforme se han hecho avances en los métodos de propagación, ha aumentado la cantidad de plantas disponibles para el cultivo (Hartmann y Kester 1985).

Según Hartmann y Kester (1985), la propagación de las plantas implica el control de dos tipos de ciclos biológicos de reproducción: el sexual y el asexual. Para ellos, la conservación de las características peculiares de una planta o de un grupo de plantas, depende de la transmisión de una generación a la siguiente, de una combinación específica de genes presentes en los cromosomas de las células. El conjunto total de estos genes constituye el genotipo de las plantas. El genotipo, en combinación con el medio ambiente, produce una planta que presenta un aspecto exterior dado (el fenotipo). Por lo tanto, la función de cualquier técnica de propagación de plantas es preservar un genotipo específico o una combinación de genotipos que reproduzca el tipo específico de planta que se está propagando.

En el ciclo sexual se utiliza la propagación por semilla mediante la cual se logran nuevas plantas individuales con características que reflejan la contribución genética de ambos progenitores. En esta reproducción por semillas puede esperarse que se presente cierta variación entre las plantas hijas. Por otra parte, en el ciclo asexual, se emplean varios métodos de propagación vegetativa como la propagación por embriones apomícticos, por estolones, hijuelos, acodos, separación de bulbos y cormos, por división de rizomas, brotes laterales, tubérculos y raíces tuberosas, por la propagación de estacas, injerto y recientemente por micropropagación, en donde las características propias de cada planta individual se conservan en las plantas descendientes y además, puede preservarse intacto el genotipo de la planta original (Hartmann y Kester 1985).

Hartmann y Kester (1985), mencionan que las plantas superiores se reproducen de manera natural por semillas y que una de las características de ésta reproducción es la variación que puede existir dentro de un grupo de plántulas. Además señalan, que en la naturaleza la variabilidad es importante, ya que proporciona el material genético que permite la adaptación continuada de una especie determinada al medio ambiente; y que dentro de cada generación, los individuos que están mejor adaptados a ese ambiente tienden a sobrevivir y a producir la generación siguiente. Sin embargo, la propagación de plantas cultivadas requiere que durante la reproducción de la semilla se controle la variabilidad, pues de otra manera puede perderse su valor.

No obstante, Hartmann y Kester (1985), también indican que la propagación asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas

y es posible porque en muchas de éstas los órganos vegetativos tienen capacidad de regeneración. Además citan, que la propagación asexual reproduce clones, que es un grupo de plantas con material genético uniforme originadas de un solo individuo y que se propaga de modo exclusivo por medios vegetativos como estacas, divisiones o injertos. Sin embargo, mencionan que clon no significa que todos los miembros individuales son por necesidad idénticos en todas sus características; pero sugieren, que la propagación asexual es indispensable en la reproducción de cultivos que no producen semillas viables, como algunas bananas, la higuera, los naranjos, las vides y en este caso, algunas especies de aloes. Por lo cual, en algunas especies la propagación es más fácil, más rápida y más económica por medios vegetativos que por semillas.

1. Propagación de *A. barbadensis* Mill.

La propagación de *Aloe barbadensis* Mill. ha sido experimentada principalmente por compañías estadounidenses, que han invertido grandes sumas de dinero en: investigación, desarrollo de la producción, cosecha y procesamiento de esta planta. Por esto, las grandes plantaciones de *Aloe* se han establecido en Texas y otras áreas alrededor del Golfo de México dominando el mercado. Sin embargo, Australia, Israel, países Centro Americanos y Venezuela también son fuentes importantes de la producción de esta especie. Recientemente en Chile, se está desarrollando un atractivo mercado para la hoja fresca y entera, comercializada a través de supermercados y tiendas naturistas, para uso doméstico, medicinal y en la preparación de cosméticos, cremas artesanales hidratantes, shampoo, geles para la curación de quemaduras y heridas entre otros. Las principales

áreas productoras de geles a partir de *A. barbadensis* son: Texas, Louisiana (EE.UU.), México, Antillas, Venezuela, Israel y Australia (Anónimo 2003).

Sentis (2001), menciona que en el Antiguo Mundo se cultivan alrededor de 200 especies de *Aloe* en laderas soleadas y en lugares rocosos o pedregosos, donde la mayor parte de las plantaciones están en África, Madagascar y en algunos puntos de Asia, pero mas abundantes en la región del Cabo Buena Esperanza.

Actualmente en Panamá, existe una compañía agroindustrial llamada Aloe Panamá, S.A. que es miembro del sector medicinas y productos químicos de la Cámara de Comercio, Industrias y Agricultura de Panamá (CCIAP), que cultiva *Aloe barbadensis* en Coclé y Panamá Oeste, que procesa y comercializa principalmente el jugo 100% de extracto de Sábila, para mezclar con otras bebidas como el jugo de naranja.

Desde 1998, esta compañía Aloe Panamá, S.A. ha estado comprometida a usar el material bruto más fino para asegurar un producto de impecable calidad. Por esta razón, sus plantaciones de *Aloe sp.* se producen de manera orgánica, crecen y cosechan la variedad conocida como *Aloe vera barbadensis* Miller, conocida en todo el mundo como la especie con más propiedades benéficas para la salud humana. Los productos de ésta especie que la compañía hace, han sido exhibidos en exposiciones de exportaciones nacionales e internacionales exitosamente, como Expocomer en Panamá y Foodex en Japón, que es la tercera feria más grande de alimentos y bebidas en el mundo.

Los nuevos productores de *A. barbadensis* que deseen formar parte de este mercado que genera significativos intereses económicos, requerirán de inversiones importantes en investigación, propagación y desarrollo de esta especie para producir gel u otros productos a precios competitivos (Anónimo 2003).

1.2. Propagación a cielo abierto

Esta planta se puede propagar de manera sexual y asexual. La propagación sexual es por semillas y su germinación ocurre en uno a cuatro meses (Anónimo 2001), pero muchas veces ésta es de escasa viabilidad (Imery y Cequea 2002), por lo que se hace más común y más fácil su reproducción asexual (Orrego 2002). La propagación asexual de la mayoría de las especies de *Aloe* es por medio de brotes (hijuelos) que surgen de una planta adulta, estolones o acodos (Sentis 2001). La propagación por hijuelos es un tipo característico de brote lateral o rama, que se desarrolla en la base del tallo principalmente de ciertas plantas y cuyo término es aplicado generalmente al tallo engrosado, acortado y con aspecto de roseta (Hartmann y Kester 1985). Sin embargo, Araujo *et al.* (2002) señalan que una planta madre en condiciones ambientales naturales solo puede generar tres o cuatro brotes laterales por año. También, algunos pueden reproducirse por hojas separándolas en forma completa de la planta madre, incluida la parte que rodea al tallo dejándolas secar durante uno o dos días, y luego se planta de forma habitual (Sentis 2001).

No obstante, Orrego (2002), indica que cuando la planta posee brotes laterales se seleccionan los que miden unos 15 cm de altura para proceder a su traslado, se eliminan

las raíces y las hojas más viejas dejando de cuatro a cinco hojas para evitar que se dañen y nunca hacerlo en invierno; estos brotes pueden plantarse directamente en el área de producción o ser previamente colocados en vivero por un tiempo, antes de ser plantados en el campo.

Es necesario separar los brotes laterales de la planta madre porque de no ser así, terminarán por consumir sus líquidos y nutrientes (Orrego 2002), y será más lento el crecimiento de la planta madre. Al trasplantar un retoño, se debe regar muy someramente y luego, después de 15 días (Sentis 2001).

Orrego (2002) menciona que Kindelán encontró algunas medidas profilácticas para lograr la obtención de brotes con buenas condiciones fitosanitarias. En primer lugar, la poda radical, eliminando toda la parte que aparezca necrosada; además, las hojas afectadas dejando de dos a tres anillos de crecimiento en el tallo. De esta manera, pueden plantarse inmediatamente o esperar su cicatrización por un periodo no mayor de siete días; o también, sumergirlos en una solución de Zineb (5 g/l) durante cinco minutos después de realizada la poda y eliminación de la zona dañada.

Estudios realizados por Orrego (2002), mostraron mayores rendimientos de hojas por planta con espacios de 70 cm entre hileras y 50 cm entre plantas, equivalentes a 28,570 plantas/ha; aunque los rendimientos fueron altos con esta densidad de plantación, la recolección se hizo difícil por la longitud que alcanzan sus espinosas hojas (hasta 50 cm

de largo). Este estudio demostró que era necesario ampliar la distancia entre surcos para facilitar esta operación.

1.2.1. Suelo

Según Orrego (2002) esta especie no requiere de condiciones especiales de preparación del suelo, por lo que se puede utilizar cualquier sistema donde se logre crear el lugar adecuado, que asegure el enraizamiento y contribuya a su crecimiento y desarrollo. Esto se logra conservando la estructura del suelo, el mantenimiento de sus condiciones físicas, químicas y biológicas y evitando todo tipo de erosión.

Orrego (2002), señala que el Aloe prefiere suelos bien drenados, de arcillosos a franco arenoso, con suficiente materia orgánica y con pH ligeramente ácido; además, es muy sensible a las heladas, a las condiciones de anegamiento y bajas temperaturas durante el invierno (Anónimo 2003). Según Sentis (2001), son plantas de clima semi-desértico, y deben ser suelos ácidos, a lo contrario el crecimiento será mucho más lento.

1.2.2. Clima

Aunque esta planta es poco exigente en cuanto a los tipos de suelos, si requiere ser plantada a plena exposición solar pues necesita alta luminosidad para su desarrollo (Orrego 2002).

El impedimento que presenta esta especie para ser sembrada en clima desértico o polar son las temperaturas extremas. No resisten las nevadas; en el clima tropical, el

exceso de agua repentina e inundación del terreno; en clima mediterráneo, las temperaturas menores de 15°C en invierno y mayores de 30°C en verano y ni en el clima monzónico, el exceso de agua en meses de lluvias y ausencia de agua en la estación seca (Anónimo 2002). Sin embargo, prefiere clima seco con temperaturas entre 18 y 40°C, una precipitación pluvial de 400 a 2.500 mm anuales y humedad relativa de 65 a 85% (Orrego 2002). Según Grindlay y Reynolds (1986), *A. barbadensis* no crece en bosques lluviosos ni en desiertos áridos. Aunque sobrevive bien a una sequía prolongada, durante esta etapa se encuentra en poca actividad metabólica. No obstante, se cultiva en alturas de 400 a 2.500 msnm, aunque en Cuba se obtienen buenos rendimientos en plantaciones a alturas inferiores de 400 msnm (Orrego 2002).

1.2.3. Riego

Por ser una planta de características suculentas es bastante resistente a sequías, por lo cual, ésta se adapta mas a terrenos arenosos con mala topografía. Es más peligroso regar constantemente que en forma esporádica, por lo que se debe dejar que esté lo bastante seco antes de volver a regar, porque las raíces se pudren al estar expuestas a la tierra húmeda durante períodos largos (Orrego 2002).

1.2.4. Fertilización

Según Orrego (2002), esta especie no es muy exigente en nutrientes. Actualmente se elabora un abono tipo compost, utilizando estiércol de vaca, gallinaza, bagazo o cáscara de hoja de sábila (preveniente de la planta procesadora) y tierra, para hacer aplicaciones a los cultivos de *A. barbadensis* de aproximadamente 100 sacos de 45 Kilos/ha. Aún no se

han obtenido resultados consistentes; sin embargo, el cultivo responde a las aplicaciones de abono y al compost.

1.2.5. Control de malezas

La limpieza de malezas puede efectuarse una vez al año, por las condiciones propias de la planta, que hacen que se adapte a condiciones muy adversas en las que la mayor parte de malezas y otro tipo de plantas no soportarían estas condiciones de sequedad. En el año 2002, en los campos de cultivo del departamento de El Progreso, Guatemala, se implementó el uso del desecho de hoja que sale de la planta procesadora (140-150 sacos de 45 Kilos/día) como mulch, para detener el crecimiento de las malezas, además de incorporar materia orgánica y retener humedad en el suelo (Orrego 2002).

1.2.6. Enfermedades

Ensayos realizados por Orrego (2002), encontró que las principales enfermedades en esta planta son producidas por hongos, tales como *Fusarium alternata*, *Phytophthora* sp. y *Sclerotium solani*, que provocan daños en el cuello de las plantas y en el sistema radical, ocasionando que las mismas se decapiten, sequen y mueran. Generalmente el exceso de humedad en el suelo produce estos fenómenos adversos. El control de la pudrición radicular se lleva a cabo eliminando las plantas enfermas, tratando el suelo con calor (agua caliente y/o solarizados), y resembrando los hijos previamente seleccionados y podados. Otros hongos afectan las hojas como *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Curvularia* sp., que producen manchas en la superficie y en los bordes, así como endurecimiento en las puntas de las mismas.

Entre los síntomas que se presentan debido a un mal manejo de las plantaciones, podemos mencionar los siguientes:

- Hojas horizontales en lugar de crecer ligeramente verticales, esto generalmente se debe a luz insuficiente.
- Hojas delgadas y rizadas cuando el riego es insuficiente, y por lo tanto, consume sus propias reservas de líquido.
- Hojas de color café cuando existe demasiada luz solar directa.
- Crecimiento muy lento, las causas probables pueden ser un suelo o agua muy alcalina, demasiada humedad, luz insuficiente y exceso de fertilizante (Orrego 2002).

1.2.7. Cosecha

La recolección de hojas de *Aloe* se inicia a partir de los 12 meses de plantadas y la cosecha se puede efectuar durante todo el año, cortando siempre las hojas inferiores de forma manual. Con el auxilio de cuchillas se hace una incisión en un extremo de la base de las hojas y se corta en sentido contrario hasta desprenderla del tallo. Si existe pudrición radicular al momento de la cosecha se debe evitar que avance y se recomienda utilizar cuchillas desinfectadas. Las plantas que se encuentran severamente dañadas por enfermedad no se cosechan. Las cosechas se realizan a intervalos de 6 meses. En la recolección se requiere de guantes y camisas de mangas largas para protegerse de los daños que puedan ocasionar los bordes espinosos de estas hojas (Orrego 2002).

1.2.8. Rendimiento

Orrego (2002), cita que una plantación de *Aloe* es de valor comercial entre el segundo y el séptimo año; luego requiere ser replantado. Además, sugiere que los valores promedios de peso por hoja se encuentra entre 170 y 200 gramos. En las parcelas productoras de Guatemala (2001), se han obtenido rendimientos de 40-45 tm/mz en plantas de 14 meses de edad bajo condiciones de riego y fertilización orgánica, mientras que en plantaciones sin riego ni fertilización, se han obtenido rendimientos de 30 - 35 tm/mz.

1.3. Propagación en invernadero

En el invernadero el *A. barbadensis* requiere un sitio semi-sombreado para su crecimiento. Las semillas se siembran en potes o bandejas primeramente con abono, turba/arena, luego se cubren finamente con mas abono o vermiculita y se colocan en un propagador ó lugar caliente a una temperatura de 20-25°C (68-77°F) no excluyéndolas de la luz. La superficie del abono se mantiene húmeda, no mojada y la germinación se da entre uno a cuatro meses. Una vez germinadas las semillas y las plántulas estén aclimatadas se transplantan a bandejas ó potes de 7.5 cm y cuando sea necesario se cambian a potes más grandes. Se mantienen dentro del invernadero en condiciones de buena iluminación, ventiladas y frescas; y en los meses de verano pueden colocarse fuera del invernadero (Anónimo 2001).

2. Cultivo de tejidos vegetales

Para Olmos *et al.* (2004), el cultivo de tejidos vegetales es una descripción genérica que involucra diferentes técnicas de cultivo de protoplastos vegetales, células vegetales, tejidos vegetales, órganos vegetales y plantas; y mediante el cual es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. Este método de propagación también se conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio

El cultivo *in vitro* tiene numerosas aplicaciones (Navarro y Perea 1996, Anónimo 2004):

- Propagación masiva de plantas, especialmente beneficioso para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos élite durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas mejoradas.
- Mayor porcentaje de semillas germinadas.
- Conservación de germoplasma.
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejoramiento genético de plantas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

Esta técnica de cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos *et al.* 2004).

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos, es posible gracias a que cada una de las células posee la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad está dada por la información genética contenida en el ADN nuclear de cada célula somática y se denomina “totipotencia celular”. Básicamente, la reproducción asexual se puede realizar debido a que las células poseen un mecanismo de división mitótico, mediante el cual, los vegetales cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre (Anónimo 2004). Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban (Olmos *et al.* 2004).

Las células vegetales *in vitro* pueden dividirse dando dos tipos de respuesta: una desdiferenciación celular o una respuesta morfogenética. La desdiferenciación celular esta acompañada de crecimiento desorganizado, que da lugar a una masa de células denominada callo, la cual si se crean las condiciones adecuadas es capaz de diferenciarse nuevamente y generar órganos o embriones somáticos y la respuesta morfogenética por la

cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos) (Anónimo 2004).

Estas fases están directamente afectadas por el balance hormonal del medio de cultivo, por lo cual la optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo. Así, en general, puede decirse que el proceso de dediferenciación generalmente es promovido por una auxina y la respuesta por un balance hormonal específico del órgano o embrión a formarse, o por una disminución de la concentración hormonal en el medio de cultivo (Olmos *et al.* 2004).

2.1. Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal por cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de una nueva agricultura. La misma es aplicada en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, farmacéutica, frutícolas, ornamentales y forestales (Anónimo 2004).

Según Olmos *et al.* (2004) la micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos.

Una de las ventajas de la micropropagación es la posibilidad de realizar en poco tiempo y en espacios reducidos, la multiplicación a gran escala de una planta

seleccionada por sus cualidades de producción, interés comercial, biológico, medicinal, farmacéutico, industrial o por su estado sanitario (Navarro & Perea 1996).

La tasa de multiplicación obtenida por esta vía es considerablemente más elevada que por las vías convencionales y presenta mayores ventajas tales como (Anónimo 2004):

- La producción de clones (individuos uniformes) en forma rápida de especies ya sea en vías de extinción o de interés comercial.
- Propagar plantas que en condiciones normales demorarían más tiempo y serían difíciles de propagar.
- Introducción masiva de nuevas variedades con fines de comercialización.
- Controlar las condiciones ambientales, debido a su dependencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada).
- Facilitar el estudiar de diversos procesos fisiológicos.
- Disminuir el riesgo de proliferación de agentes patógenos.

2.2. Tipos de micropropagación

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica de la biotecnología muy utilizada en cultivos de importancia económica. Como fue mencionado anteriormente permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados en medios específicos que contienen reguladores del crecimiento, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, entre otros y en condiciones ambientales como temperatura, humedad y

luz controladas. Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés es posible automatizar el proceso para llevarlo a escala industrial (Anónimo 2004).

Básicamente algunos tipos de micropropagación o cultivo *in vitro* consisten en tomar una porción de una planta, denominada “explante” como: ápice, hoja, segmento de tallo, meristema, yemas axilares, embrión, nudo, semilla y antera principalmente. Se coloca en un medio nutritivo estéril usualmente gelificado o semisólido; la formulación del medio cambia según la especie vegetal a propagar el objetivo del mismo, obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales (Anónimo 2004).

Para lograr éxito en la micropropagación de una planta, deberá tenerse en cuenta la composición del medio nutritivo, ya que de ello dependerá, en gran medida, que se logre la expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática y originar una nueva planta. Para que ello ocurra, debe conseguirse la desdiferenciación y luego la rediferenciación. Un proceso de éste carácter sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas, la formación de yemas adventicias o cuando se busca la propagación mediante porciones de hojas (Anónimo 2004).

2.3. Etapas de la micropropagación

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro*, de acuerdo con Olmos *et al.* (2004) se pueden distinguir las siguientes etapas:

- Elección de la planta y/o tejido donante de los explantes.
- Establecimiento del cultivo que consiste en la desinfección de los explantes y su posterior siembra en un medio artificial de modo de inducir callos, brotes, raíces o embriones somáticos según se desee.
- Multiplicación y desarrollo de vástagos para generar un plural número de plántulas según los fines propuestos.
- Enraizamiento, durante esta etapa se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- Aclimatación, que es la adaptación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones ambientales *ex vitro*.

Generalmente, según Olmos *et al.* (2004), las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0), que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento.

Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: 1) El tipo de órgano, fuente del explante, 2) la edad fisiológica del mismo, 3) la estación en la cual se colecta el material vegetal, 4) el tamaño y 5) el estado sanitario general de la planta madre. Esta debe elegirse sobre la base de una selección en masa positiva para las características biológicas fenotípicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*, según los objetivos propuestos (Olmos *et al.* 2004).

En el cultivo *in vitro* en general, Olmos *et al.* (2004), señalan que los órganos jóvenes son los que tienen mejor respuesta que los obtenidos a partir de materiales adultos y recomiendan coleccionar explantes cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de estas en etapa poco activa ocasiona serios problemas.

A fin de lograr explantes de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernadero. De esta forma es posible favorecer el estado sanitario y la calidad de los explantes mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25°C) y baja humedad relativa (75%), a fin de reducir la proliferación de patógenos (Olmos *et al.* 2004).

2.4. Reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro*, o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación está codificado en el genoma de la especie, pero dicha expresión está regulada por el balance hormonal propio del estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. En algunas plantas, este balance puede ser modificado agregando exógenamente compuestos sintéticos con acción similar al de las hormonas vegetales (Anónimo 2004).

En algunos casos en el cultivo *in vitro* se obtiene la respuesta deseada sin el uso de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, muchas especies para

lograr el crecimiento, la producción de callo, se requiere agregar al medio de cultivo sustancias reguladoras del crecimiento del tipo de las auxinas y citocininas (Alvarenga 2003).

Según Alvarenga (2003), las auxinas más utilizadas en el cultivo *in vitro* son el Ácido Naftalen Acético (ANA), el Ácido Indol Butírico (AIB) y el 2, 4 - D y las citocininas más empleadas son la Kinetina (KIN), la Bencil Adenina (BA), la zeatina (ZEA) y la 6 Bencilaminopurina (6 BAP).

González (2004), menciona que en la propagación *in vitro* se emplean ampliamente las auxinas, las cuales favorecen la inducción de la organogénesis; pero, la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citocininas. La importancia y uso de las giberelinas en el cultivo *in vitro* está mucho más restringida. El ABA (ácido abscísico) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia y en casos más específicos.

El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa – sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. Por esta razón, una práctica usual es evaluar el efecto auxínico mediante la evaluación del incremento del peso fresco de los tejidos. Las auxinas también tienen un efecto marcado sobre la división celular (citocinesis) e inducción de la rizogénesis, pero a su vez indirectamente “inhiben” el crecimiento de las raíces, además, intervienen en la dominancia apical así como en el desarrollo del fruto

transformando las paredes del ovario para formar las paredes del fruto entre otros (González 2004).

Generalmente las citokininas se emplean en dosis muy bajas en los medios para enraizamiento ya que a dosis altas presentan un efecto inhibitor sobre la rizogénesis. Estas estimulan la división celular (cariocinesis) y tienen un efecto sinérgico en este sentido con las auxinas. Una forma de evaluar el efecto de las citocinina es determinando el incremento en peso seco de la biomasa (González 2004).

González (2004), cita que se han reportado otros efectos de las citokininas, por ejemplo: estimulan el alargamiento celular de discos de hojas etioladas; inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos *in vitro* (morfogénesis); controlan la formación de proplastidios en cloroplastos; mantienen la maquinaria de síntesis de proteínas mediante la regulación de la síntesis del RNA y retrasan la senescencia entre otros.

2.5. Cultivo *in vitro* de *Aloe* sp.

Los estudios o investigaciones sobre la propagación *in vitro* de *Aloe* son escasos, no así, los relacionados con su uso médico, composición y propiedades benéficas que posee esta planta. Sin embargo, su uso generalizado y gran competencia por dominar el mercado mundial de sus productos, la hace una especie importante para propagar *in vitro*.

El medio de cultivo para la micropropagación de *Aloe* y el más empleado en angiospermas es el MS, formulado por Murashige & Skoog (1962) adicionando reguladores del crecimiento como una auxina o citokinina en concentraciones escogidas (Olmos *et al.* 2004, González 2004)

Según la literatura revisada, existen tres investigaciones referentes a la propagación *in vitro* de *Aloe barbadensis*. Una de ellas realizada por Meyer & Staden (1991), otra por Natali *et al.* (1990), y la tercera es concerniente a la propagación *in vitro* de la especie *Aloe vera* que fue llevado a cabo por Araújo *et al.* (2002). Sin embargo, el Departamento de Botánica de la Universidad de Wisconsin-Madison (Anónimo 1999) y la Universidad de Arizona Pima County Cooperative Extension (Moore 2004) en Estados Unidos, afirman que ambas plantas son la misma especie.

En la investigación de cultivo *in vitro* de *A. barbadensis* realizada en Sudáfrica por Meyer y Staden (1991) y citada por Orrego (2002), se indujo el desarrollo de yemas axilares y la formación de yemas adventicias decapitando los brotes laterales de los explantes de *A. barbadensis*. El mejor resultado en el crecimiento de las yemas y en el enraizamiento de los brotes se obtuvo con un medio modificado de Murashige y Skoog suplementado con 5 μ M IBA. La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de las yemas fue de 25°C y por éste método, se indujeron más de dos mil plantas en seis meses, partiendo de cinco brotes decapitados.

Un nuevo estudio efectuado en Brasil por Araújo y colaboradores (2002), en la propagación de *Aloe vera*, fueron utilizados como explantes brotes laterales de plantas madres de 16 genotipos de procedencia distinta. Los explantes fueron inoculados en 30 ml del medio MS suplementado con 7 g de agar, 4,03 μ M de Ácido Naftaleno Acético (ANA) y 6,67 μ M de 6-Bencilaminopurina (6-BAP). En un periodo de ocho meses, aproximadamente dos mil plántulas se produjeron a partir de 20 explantes obtenidos de germoplasmas de procedencia diversa.

En la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* y en el mantenimiento del cultivo *ex vitro*, se cuenta con poca información para sustentar ambos procesos debido a los escasos estudios o insuficiente información publicada acerca de éstas últimas etapas. Sin embargo, la investigación realizada por Araújo y colaboradores (2002), nos ofrece una información valiosa acerca de estos procesos. Las plántulas obtenidas *in vitro*, con 3 cm de altura fueron transferidas *ex vitro* a bandejas con agujeros, que contenían un sustrato comercial, Plantmax®. Estas se mantuvieron por siete días en un ambiente similar al de la cámara en donde estaban los explantes en crecimiento. Pasado ese periodo, las plántulas fueron trasladadas a envases plásticos conteniendo el mismo sustrato comercial, aplicando riego cada tres días y a temperatura ambiente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en el invernadero de la Escuela de Biología, de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí en Panamá. Se estudió el desarrollo *in vitro* de yemas apicales de brotes laterales de *Aloe barbadensis* Mill. en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con ANA y 6-BAP en tres concentraciones diferentes. Las concentraciones de los tratamientos fueron: T0 - 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP, T1 - 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP, T2 - 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP, T3 - 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Inicialmente se seleccionaron plantas en diferentes estados fisiológicos, determinado por el número de hojas desarrolladas (tres, seis, nueve), tamaño y vigor de las yemas apicales. Sin embargo, se observó mucha variabilidad en el tamaño de las hojas, número de hojas desarrolladas, vigor de los brotes laterales y tamaño de las yemas apicales, por lo que se descartó.

Con el objetivo de uniformar la muestra (explantos), se seleccionaron 5 plantas madres de *A. barbadensis* con una altura promedio de 26 cm y de 8 a 11 hojas con brotes laterales de un tamaño promedio de 9 a 20 cm y de 4 a 8 hojas, de las que se extrajeron yemas apicales. Se utilizaron 15 yemas de 0.1 cm con un primordio foliar entre 1 a 3 cm y se sembraron en medio MS (1962) suplementado con 1.0 mg/l de ANA, 1.5 mg/l de

6-BAP y 7 g/l de agar sugerido por Araújo *et al.* (2002). Los resultados fueron no deseados: callos, tejido aéreo deforme y necrosado.

En el segundo ensayo se seleccionaron explantes de plantas madres vigorosas con una altura entre 20 a 25 cm, con 10 hojas en buen estado fisiológico, con 10 o más brotes laterales vigorosos y establecidos en bolsas plásticas de 7x8 pulgadas. Las yemas apicales se extrajeron de brotes laterales con una altura entre 14 a 18 cm, un diámetro entre 6 a 8 cm y 7 a 8 hojas. Se seleccionaron 36 yemas apicales de 0.5 a 1.0 mm; 1.0 a 2.0 mm y 2.0 a 3.0 mm con un primordio foliar entre 2 a 4 cm y se sembraron en medio MS (1962) suplementado con cuatro diferentes concentraciones de ANA (0.0, 0.32, 0.37 y 0.42 ml) y 6-BAP (0.0, 0.7, 0.75 y 0.8 ml) en 500 ml a partir de una solución stock de 50mg/50ml. Los resultados fueron similares al experimento anterior. Con base a esas experiencias, se ajustaron los métodos para la selección del explante y tratamientos realizando las siguientes etapas:

1. Desinfección del material, área de siembra y crecimiento:

La cristalería se lavó con Liquinox, el material a utilizar se esterilizó a 121°C y 1 Kg/cm² por 20 minutos. La cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 70% previo a la siembra de los explantes. El área de siembra y crecimiento se desinfectaron con hipoclorito de sodio (5.25% p.c.) al 40% y el filtro del aire acondicionado se lavó mensualmente con jabón detergente. Las áreas de siembra y crecimiento fueron rociadas con aerosol antibacterial cada dos días.

2. Selección del explante:

Se escogieron explantes de plantas madres de *A. barbadensis* ubicadas en la Urbanización La Aurora en el distrito de David, Chiriquí. Estas fueron seleccionadas con base en características fenotípicas, tales como: plantas de color verde, con una altura de 20 a 25 cm, 10 hojas en buen estado fisiológico y 10 ó más brotes laterales vigorosos, previamente establecidas en bolsas plásticas de 17x20 cm; de éstas plantas, se seleccionaron brotes laterales con una altura de 14 a 18 cm, un diámetro de 6 a 8 cm y 7 a 8 hojas, y se extrajeron las yemas apicales a utilizar como explantes (Fig. 1). Estas tenían una longitud promedio de 0.1 a 0.2 cm y un primordio foliar de 1 cm, seleccionando 10 explantes por tratamiento.

3. Desinfección del explante:

Las plantas madres de *A. barbadensis* se lavaron con una solución de jabón detergente y luego se enjuagaron con agua del grifo, se separaron los brotes laterales y de éstos, con ayuda de un bisturí No. 11, se extrajeron las yemas apicales que se colocaron en un plato petri y se seleccionaron aquellas con un primordio foliar. En la cámara de flujo laminar, los explantes se desinfectaron con inmersiones secuenciales en solución de hipoclorito de sodio (5.25% p.c.) al 40% durante 10 minutos con agitación, etanol al 70% durante 2 minutos con agitación, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril; luego, fueron colocados en un vaso químico de 250 ml con agua estéril para su posterior siembra (Fig. 1).

4. Preparación del medio de cultivo:

Se preparó el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con ANA y 6-BAP sugerido por Araujo *et al.* (2002). Los explantes fueron cultivados en cuatro diferentes concentraciones de ANA y 6-BAP en una relación de; T0, 0.0/0.0 mg/ml; T1, $6.4 \times 10^{-4}/1.4 \times 10^{-3}$ mg/ml; T2, $7.4 \times 10^{-4}/1.5 \times 10^{-3}$ mg/ml; T3, $8.4 \times 10^{-4}/1.6 \times 10^{-3}$ mg/ml y autoclavados a 121°C y 15 lb. de presión por 20 minutos.

5. Siembra del explante:

En la cámara de flujo laminar se sembraron 10 explantes por tratamiento en envases comerciales de 7x5 cm conteniendo 25 ml del medio. Estos fueron colocados en la cámara de crecimiento a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 14 horas, una intensidad lumínica de 2675 lux y una humedad relativa de 85% (Fig. 1).

6. Evaluación del explante *in vitro*:

Los parámetros evaluados en los explantes *in vitro* fueron: crecimiento del explante (cm), número de hojas, número de brotes, número y tamaño de raíces (cm); así como vigor y color de los mismos. Las evaluaciones se hicieron cada 7 días.

7. Siembra y aclimatación de los explantes *ex vitro*:

Después de diez semanas, cuando los brotes laterales de los explantes alcanzaron una longitud de 1.5 cm, fueron separados, y llevados al invernadero de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Chiriquí, donde se sembraron en vasos de foam de 10oz, que contenían como sustrato una mezcla de 60% de tierra negra, 30% de arena de

construcción y 10% de perlita comercial. Se sembraron 10 plántulas por tratamiento y fueron colocados bajo condiciones de invernadero, en la época seca (diciembre a abril) (Fig. 1).

8. Evaluación del explante *ex vitro*:

Se evaluó durante 12 semanas el porcentaje de supervivencia de los explantes de *A. barbadensis* en condiciones de invernadero, procedentes del cultivo *in vitro* de tratamientos con y sin reguladores del crecimiento.

Los datos antes mencionados fueron complementados por medio de fotografías para ilustrar el comportamiento de los explantes en los diferentes tratamientos.

9. Análisis de los resultados y datos obtenidos:

Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) empleándose para ello el programa estadístico Statistica 6.0

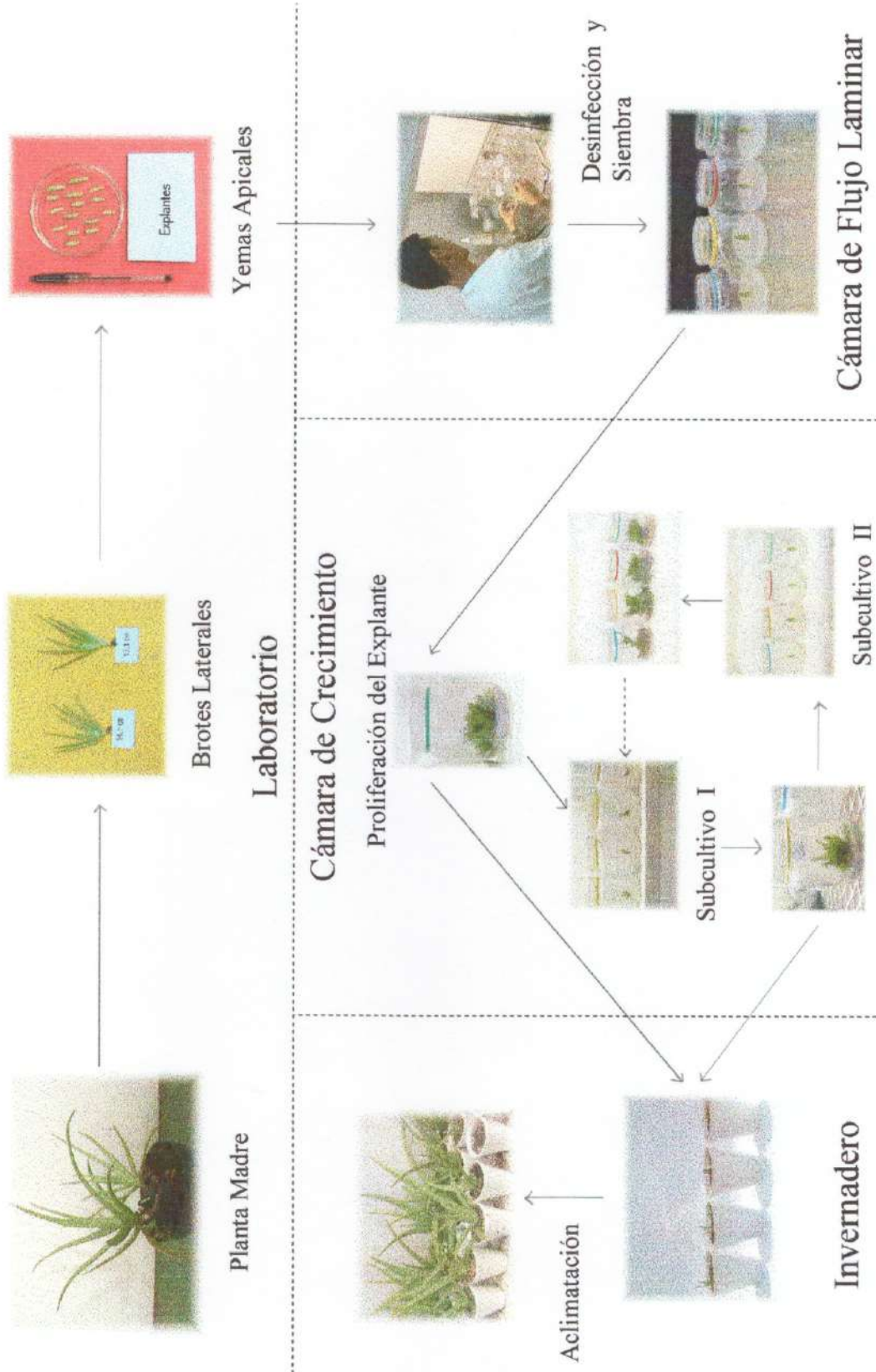


Fig. 1. Esquema de los pasos realizados en la propagación *in vitro* de *A. barbadensis* a partir de yemas apicales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de los explantes fue uno de los problemas iniciales en esta investigación, ya que después de dos ensayos no se lograba uniformidad en los mismos y las respuestas fueron no deseadas. Según Radice (2004) los principales factores que condicionan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos en condiciones *in vitro* son: el genotipo, las condiciones químicas y físicas seleccionadas para realizar el cultivo y el explante; donde el genotipo, es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro*, así como también para la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Además, el tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ésta se encuentre y el sector del cual se tome el explante, determinarán a su vez la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro*. Por esta causa, no es posible generalizar métodos o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular.

Con base en las experiencias anteriores se ajustaron los procedimientos para la selección de los explantes, por lo que se estableció un nuevo ensayo, este tuvo una duración de seis meses. Las plantas donantes de explantes fueron seleccionadas de manera que fuesen homogéneas en altura, número de hojas y número de brotes laterales para obtener explantes uniformes en el tercer ensayo. Los resultados son presentados y discutidos a continuación, y corresponden a la propagación *in vitro* de *A. barbadensis* a

partir de yemas apicales de brotes laterales. Los valores de las variables estudiadas se encuentran en los cuadros del anexo. La discusión se basará en las figuras que muestran los promedios de cada una de las variables, sin regulador (T0) y con regulador (T1, T2, T3).

Se evaluó el crecimiento de los explantes en cada uno de los tratamientos durante diez semanas. El tratamiento sin regulador (T0) presentó mayor crecimiento que los tratamientos T1, T2, T3. Con regulador, el mayor crecimiento de los explantes se produjo en T1 y el menor en T2; encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($F(3,360)=40.39$; $p<.0000$) (Fig. 2).

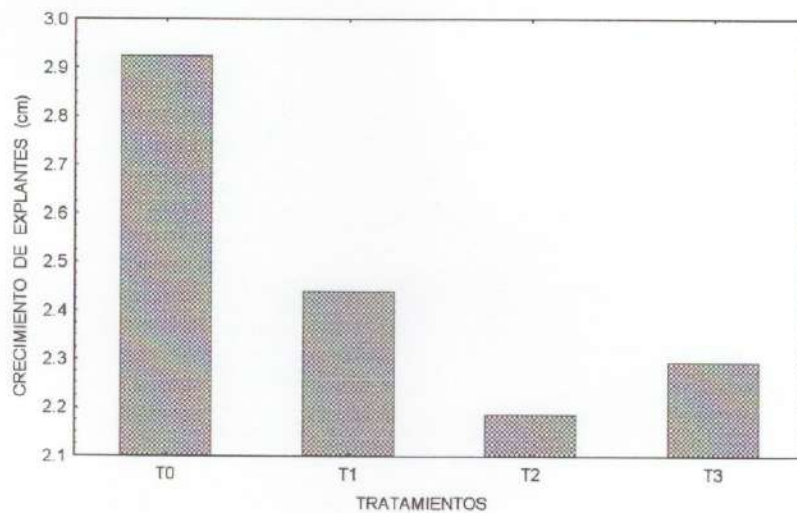


Fig. 2. Crecimiento longitudinal promedio (cm) de los explantes de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), diez semanas después de la siembra.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Los explantes sin regulador (T0) presentaron un mayor crecimiento en las diez semanas de observación que T1, T2 y T3; sin embargo, entre los tratamientos con regulador, el T1 mostró mayor crecimiento y el T2 el menor. El ANOVA indicó diferencias entre las semanas observadas y los tratamientos ($F(27,360)=2.43$; $p<.0001$) (Fig. 3).

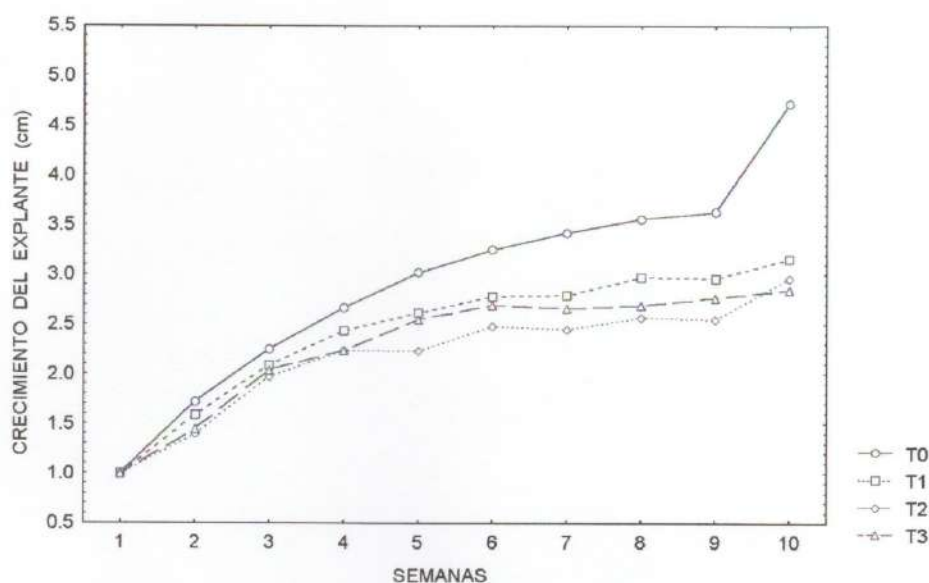


Fig. 3. Curvas de crecimiento promedio (cm) de explantes de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Estos resultados sugieren que esta especie no requiere de reguladores para estimular su crecimiento longitudinal *in vitro*.

Según González (2004), los reguladores del crecimiento como las auxinas (ANA) están estrechamente ligadas al alargamiento celular y las citocininas (6-BAP) a la

división celular, es decir, tienen un efecto sinérgico en el crecimiento en cultivo *in vitro*. Sobre esto, Hurtado y Merino (1991), mencionan que altas concentraciones de auxinas inducen la formación de callo y que en bajas concentraciones se mantiene el crecimiento celular. En ausencia de citocininas, las auxinas provocan alargamiento celular en los tejidos cultivados, pero en su presencia se estimula la división celular. No obstante, Bidwell (1979), señala que un exceso de auxinas puede suprimir la división y aun el crecimiento celular. Por lo tanto, el balance auxina-citocinina es un factor importante en la regulación del crecimiento. En esta investigación, en *A. barbadensis* no se estimuló el crecimiento longitudinal del vástago con las relaciones auxinas/citoquininas utilizadas.

En cuanto al número de hojas, los explantes en todos los tratamientos, presentaron cinco o seis hojas al final de las diez semanas; además, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). Esta respuesta sugiere que los reguladores del crecimiento no influyen en el número de hojas de *A. barbadensis*. Sin embargo, Hurtado y Merino (1991) describen que la relación auxina-citocinina *in vitro* es indispensable para la morfogénesis de los meristemas; pero Araújo *et al.* (2002) mencionan que las respuestas de los explantes en cultivo *in vitro* más bien dependen del genotipo de la especie.

A las tres semanas de cultivo de los explantes se observó la formación de raíces en T0 y en los tratamientos T1, T2 y T3 a las cuatro semanas; sin embargo, a las seis semanas tiende a aumentar el número de raíces en los tratamientos con regulador llegando a ser mayor que en T0 a las diez semanas de cultivo. El mayor crecimiento de

raíces en medios con regulador se presentó en los explantes del tratamiento T1 y el menor crecimiento en el tratamiento T2 (Fig. 4).

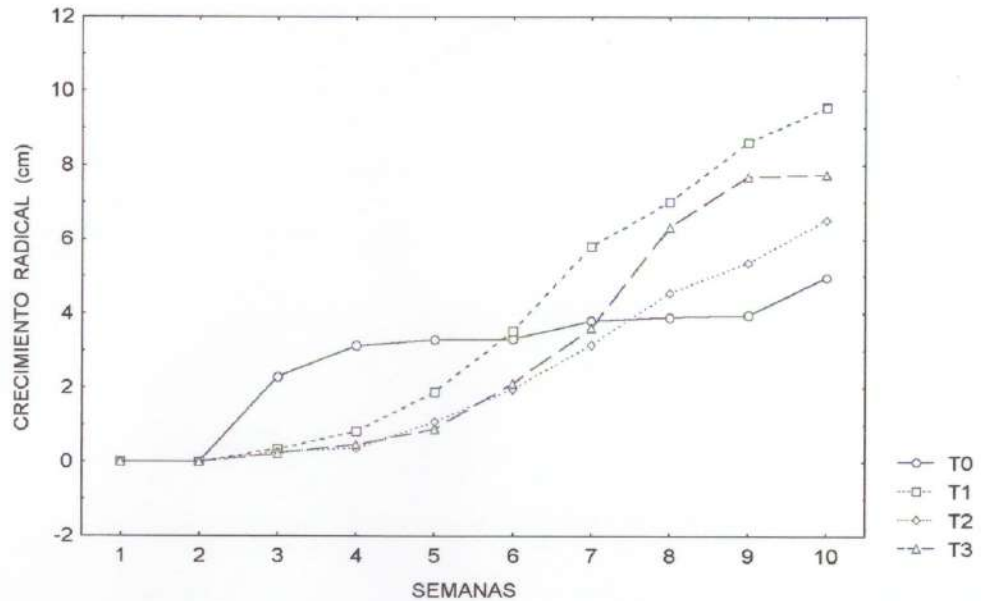


Fig. 4. Curvas de crecimiento promedio (cm) de raíces en explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.
 T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.
 T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.
 T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.
 T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Roca *et al.* (1991) describen que una curva de crecimiento típica, en la cual se relaciona el número de células con el tiempo de incubación en un cultivo cerrado; posee las siguiente fases: de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria. En donde la fase de retraso representa el inicio de un cultivo que crece lentamente durante uno a tres días o en muchos casos no se presenta o es muy corta. Luego sigue la fase exponencial (o fase logarítmica), en donde el aumento de la biomasa versus la concentración, es constante y medible. Cuando la cantidad de células que no se dividen es pequeña y el tiempo de duplicación de la densidad celular es mayor que el tiempo del

ciclo celular, la población celular crece en forma exponencial. No así, cuando la cantidad de células que no se dividen es alta y el tiempo del ciclo celular es mayor que el tiempo de duplicación de la densidad celular, la fase exponencial es más larga y el modelo de crecimiento tiende a ser lineal. El uso de bajas densidades de células al inicio del cultivo, o el empleo de elevadas concentraciones de nutrientes en el medio, pueden prolongar la fase exponencial. En la fase lineal, la tasa de crecimiento declina uniformemente con el tiempo. Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la fase estacionaria, en la cual no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células (Roca *et al.* 1991).

El crecimiento de las raíces, en el tratamiento T3 presenta una curva de crecimiento típica y en los tratamientos T1 y T2 se describe una curva de crecimiento que tiende a ser lineal. En T0, el crecimiento inicial de las raíces fue rápido comparado con los otros tratamientos pero a las cuatro semanas se detiene (Fig. 4). Pareciera que a las diez semanas de cultivo *in vitro*, T1 y T2 con las concentraciones de regulador utilizadas, la fase exponencial del crecimiento de las raíces continúa, no así en T3 que pareciera haber alcanzado la fase estacionaria.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en cuanto al crecimiento de las raíces entre los tratamientos y las semanas observadas ($F(27,360)=4.89$; $p<.0000$) (Fig. 4). Estos datos son importantes para el manejo de las plántulas *ex vitro*, porque dan indicio del tiempo más apropiado para su cambio a condiciones ambientales (ocho a diez semanas) o al periodo de aclimatación (seis a ocho semanas).

El mayor número promedio de raíces por explantes se presentó en T1 y T3, y el menor en T0; encontrándose diferencias significativas para el número promedio de raíces entre los tratamientos y las semanas observadas ($F(27,360)=2.29$; $p<.0004$) (Fig. 5 y 6).

En los tratamientos con regulador del crecimiento, T2 y T3 en la quinta semana (35 días) desarrollaron un promedio de cuatro a cinco raíces, en la sexta semana (42 días) los explantes en T1 desarrollaron ocho raíces y se mantuvo este promedio hasta la décima semana (70 días); en esta semana, T2 presentó seis raíces y T3 siete. En el tratamiento sin regulador T0, los explantes desarrollaron uno a dos raíces en la tercera semana (21 días) y se mantuvo este promedio hasta la octava semana (56 días), alcanzando tres raíces en la décima semana (70 días) (Fig. 6). Estos resultados se asemejan con los obtenidos por Araújo *et al.* (2002) en *Aloe vera*. Además, estos investigadores observaron que el proceso de rizogénesis mostró ser dependiente del tiempo de cultivo y que periodos superiores a 35 días posibilitaron mejores tasas de enraizamiento; por lo que sugieren, en base a sus resultados, que el tiempo medio de cultivo sea de 45 días (seis semanas).

Las raíces del tratamiento T3, en algunos de los explantes se mostraron engrosadas, deformes y oscuras, no así en los demás tratamientos. Probablemente las plántulas de éste tratamiento que poseen éstas características radicales, no tendrán éxito en la fase de aclimatación. George (1993), señala que con frecuencia el número de raíces aumenta proporcionalmente con la concentración de la auxina; pero concentraciones altas, puede provocar formación de callo y raíces malformadas.

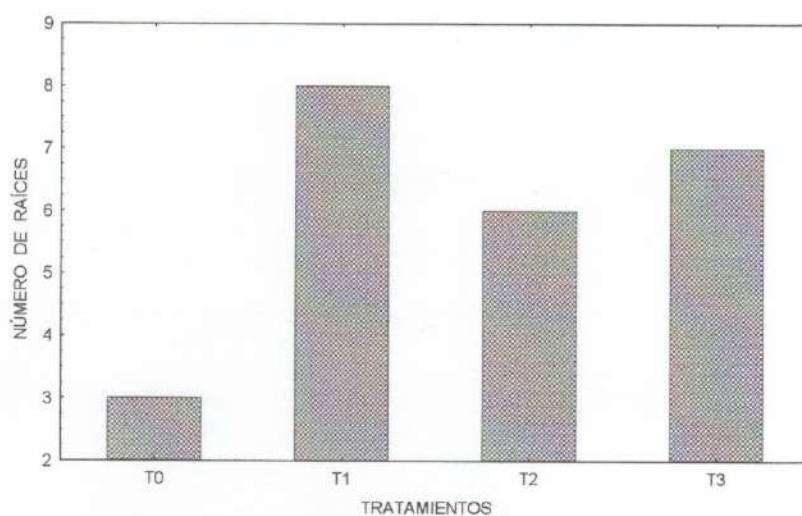


Fig. 5. Número promedio de raíces en explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) al final de diez semanas.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

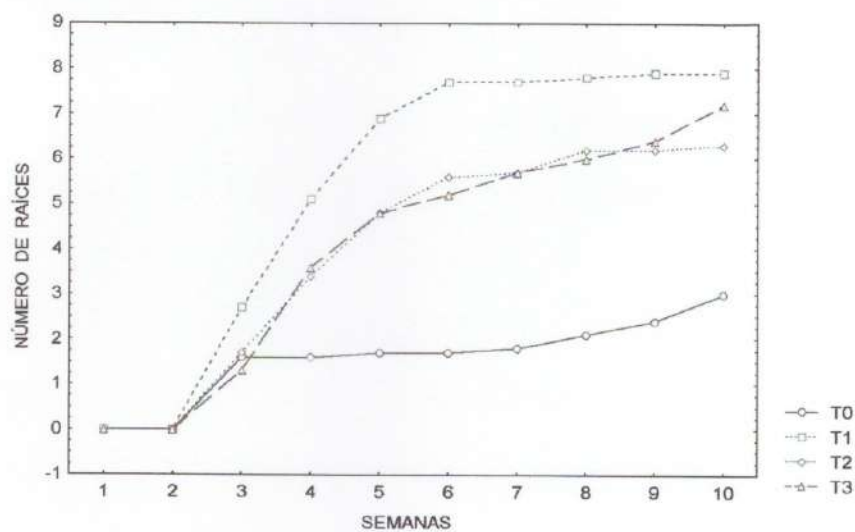


Fig. 6. Número promedio de raíces en explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Para Hurtado y Merino (1991), cuando la proporción auxina-citocinina es relativamente alta, como en esta investigación, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales; un balance adecuado de auxinas y citocininas *in vitro* inducen la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie en estudio, además sugiere, que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz. Sin embargo, en esta investigación en *A. barbadensis* el número de hojas se mantiene igual en todos los tratamientos, por lo que pareciera que este factor no está influyendo en el número de raíces.

Hurtado y Merino (1991), mencionan que si la citocinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante y que una citocinina combinada con auxinas da como resultado una estimulación de la división celular; sin embargo, normalmente no conduce a un incremento en la elongación de la raíz. En este estudio no se observó lo mencionado por estos autores ya que los reguladores sí incrementaron el crecimiento de las raíces, quizás este comportamiento es propio de *A. barbadensis*.

La proliferación de brotes laterales en los explantes se inició en la segunda semana de cultivo en los tratamientos T1, T2, T3, y en la octava semana en el tratamiento T0 como se observa en la figura 7. El análisis estadístico mostró diferencias significativas del crecimiento de los brotes laterales entre los tratamientos sin y con regulador y las semanas ($F(27,360)=6.48; p<.0000$).

El crecimiento de los brotes laterales en los tratamientos con regulador del crecimiento (T1, T2, T3) fue progresivo y directamente proporcional durante las semanas de cultivo y al término de diez semanas presentaron una longitud promedio de 1.4 a 1.6 cm (Fig. 7). El tamaño de éstos brotes puede ser adecuado para utilizarlos como explantes en la proliferación de nuevas yemas. En el tratamiento sin regulador (T0) el crecimiento de los brotes laterales fue lento y tardío.

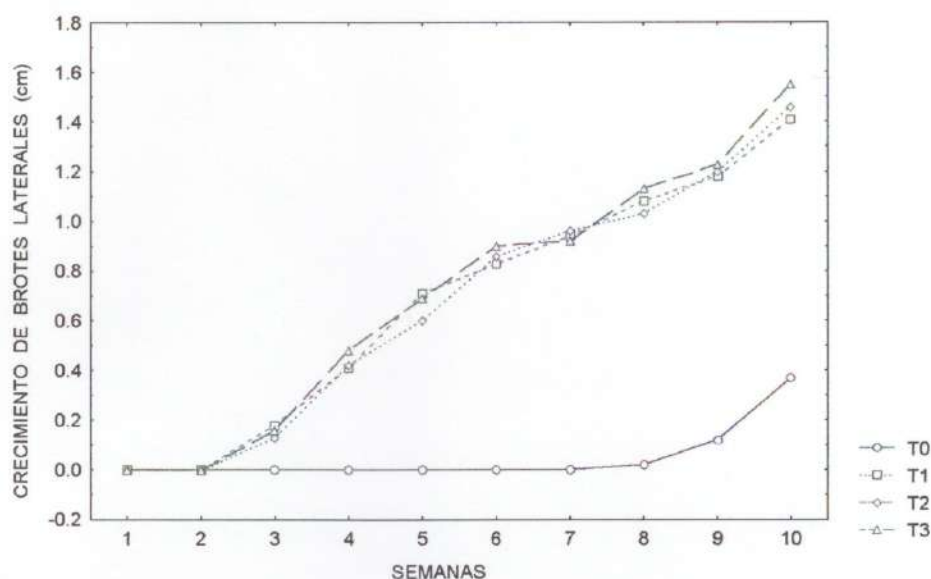


Fig. 7. Curvas del crecimiento promedio (cm) de brotes laterales de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

El mayor número promedio de brotes laterales en los explantes se presentó en el tratamiento con regulador del crecimiento T3 (13), sin embargo los tratamientos T2 y T3 presentaron una similar proliferación de yemas (11); y el menor número promedio de brotes laterales se observó en el tratamiento sin regulador del crecimiento T0 (1) (Fig. 8).

Al analizar estadísticamente los datos, se encontró diferencias significativas en cuanto al número de brotes laterales entre T0 y los demás tratamientos ($F(27,360)=5.43$; $p<.0000$) (Fig. 8); mientras que, la prueba de Tukey realizada posterior al ANOVA, no señaló diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos con regulador del crecimiento (T1, T2, T3) siendo el promedio de brotes por explante muy similar entre ellos.

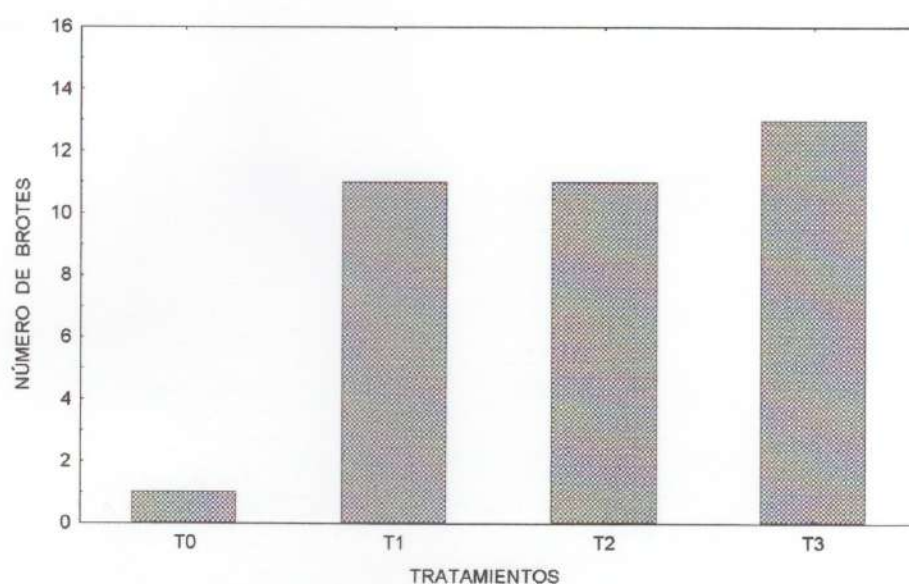


Fig. 8. Promedio de brotes laterales por explantes de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) a las diez semanas.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

En cuanto al desarrollo de los brotes laterales, se observó que el tamaño, número de hojas, número de brotes y vigor, fue similar para todos los explantes en los tratamientos con regulador del crecimiento (T1, T2, T3). Sobre esto, Araújo *et al.* (2002) mencionan que la tasa de multiplicación se muestra dependiente del genotipo de la planta madre.

No obstante, Hurtado y Merino (1991) señalan que cuando las proporciones de auxina-citocinina son variadas en el cultivo *in vitro*, el patrón de formación meristemática se modifica y que una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas estimula la formación de brotes; por lo tanto, si se hacen pequeños cambios en la proporción de citocinina-auxina puede obtenerse el inicio de meristemas, tanto radiculares como apicales, pudiendo controlarse así la morfogénesis *in vitro* en gran variedad de tejidos. Probablemente si se realizan cambios en la relación auxina-citocinina se obtenga una variación más amplia entre los tratamientos con regulador en cuanto al desarrollo de los brotes laterales de *A. barbadensis*.

Los brotes laterales que se obtuvieron en el tratamiento sin regulador del crecimiento T0 se observaron de color verde pálido, suculentos pero carentes de vigor. Entre los tratamientos con regulador, los brotes laterales del T3 se observaron muy similar al término de la décima semana, en comparación con los brotes laterales de los demás tratamientos. El análisis estadístico señala que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos con regulador para el número de brotes laterales, pero sí entre éstos y el tratamiento sin regulador; además, el crecimiento de los brotes laterales se inició en la segunda semana para los tratamientos con regulador y a la octava semana en el tratamiento sin regulador, siendo éstos últimos mucho menor en tamaño que los tratamientos con regulador (Fig. 7). Según Olmos *et al.* (2004), estas anomalías se deben a distintos factores que influyen negativamente sobre el desarrollo morfológico normal *in vitro*. Estos factores son el ambiente de cultivo, los componentes orgánicos e inorgánicos del medio, los reguladores del crecimiento, la luz y la temperatura.

Al final de la décima semana de cultivo *in vitro*, se separaron los brotes laterales de los explantes y se sembraron en nuevos medios MS (1962) sin y con reguladores. Los explantes madres de los brotes laterales (diez por cada tratamiento) se sembraron en pots plásticos individuales con sustrato para su aclimatación en el invernadero; la mayor supervivencia de éstos en el invernadero se mostró en aquellos provenientes del tratamiento sin regulador del crecimiento T0 con un 40.9% (9) y la menor supervivencia en el tratamiento con regulador del crecimiento T1 con 13.6% (3). Entre los tratamientos con regulador del crecimiento, el T3 presentó mayor supervivencia de los explantes con un 27.3% (6); el ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($F(3,36)=3.23$; $p<.0336$) (Fig. 9) para la supervivencia de los explantes.

Araújo *et al.* (2002) trabajando micropropagación de *Aloe vera*, mencionan que obtuvieron explantes con un sistema aéreo y radical sin la necesidad de formular un medio de cultivo para enraizamiento; adicionalmente, observaron que la formación de raíces *in vitro* ejerció una marcada influencia sobre la supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatación y que a lo largo de esa fase, presentaron una alta tasa de supervivencia siendo éstas entre 80% a 95%; pero la tasa de supervivencia inferior al 30% el crecimiento fue lento para las plántulas desprovistas de sistema radical. También observaron que las plántulas que desarrollaron raíces *in vitro* durante la aclimatación, presentaron degeneración del sistema radical, seguido de una emisión inmediata de nuevas raíces primarias y secundarias. En esta investigación, en todos los tratamientos se presentaron raíces pero no todos mostraron tasas de supervivencia elevadas. La mayor tasa de supervivencia se dio en aquellos procedentes del tratamiento sin regulador del

crecimiento T0 (40.9%) aunque, éstas plántulas presentaban menor número y crecimiento radical que las plántulas procedentes de los tratamientos con regulador, lograron una mejor adaptación.

La presencia de raíces es importante en la aclimatación de *A. barbadensis* y en esta investigación, se muestra el efecto positivo de los reguladores en las concentraciones de T1, T2 y T3.

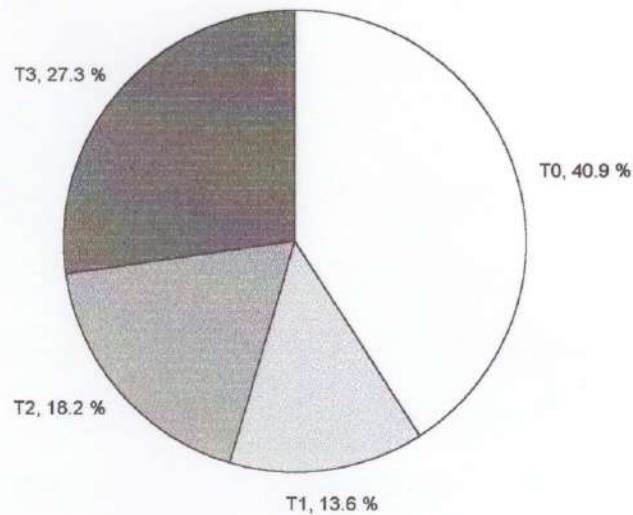


Fig. 9. Porcentajes de supervivencia de explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) aclimatados en el invernadero.

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Aunque las plántulas de los tratamientos con regulador del crecimiento presentaron mayor número y crecimiento de raíces, éstas no presentaron mayores tasas de supervivencias. Una posible respuesta a estos resultados se encuentre en el trabajo de Araújo y colaboradores (2002) en donde señalan que las plántulas enraizadas *in vitro* pierden sus raíces en la etapa de aclimatación o tal vez en el manejo que se dió a las plántulas. Probablemente las plántulas de los tratamientos con regulador del crecimiento perdieron sus raíces y la emisión de nuevas raíces fue lenta como señala Araújo *et al.* (2002), por lo que las necesidades nutricionales de la planta probablemente no fueron suplidas a tiempo y por consiguiente, no alcanzaron tasas de supervivencia mayores al 30% (Fig. 9).

George (1993), menciona que las especies que producen raíces *in vitro* con facilidad pueden pasar directamente a una etapa de aclimatación en el invernadero. Sin embargo, en *A. barbadensis* se obtuvo un mayor éxito adaptativo en el invernadero en el tratamiento sin regulador T0, que presentó menor número (3) y crecimiento de raíces (4.5 cm) en comparación con los tratamientos con regulador (T1, T2, T3). No obstante, entre los tratamientos con regulador, el T1 mostró mayor número (8) y crecimiento de raíces (9.8 cm), pero el éxito adaptativo no fue el mejor, siendo superado por el tratamiento T3 que obtuvo el porcentaje mas alto.

Cabe destacar que éstos datos presentados de supervivencia en el invernadero, son parciales y preliminares, sería conveniente seguir realizando más estudios y observaciones exclusivas en la etapa de aclimatación.

De acuerdo a los resultados obtenidos a las diez semanas de cultivo *in vitro* de *A. barbadensis* y según los objetivos planteados en esta investigación, el tratamiento sin regulador T0 presentó un mayor crecimiento de la parte aérea que los tratamientos con regulador. La formación de raíces se dio en la segunda semana en todos los tratamientos pero el crecimiento fue menor y la proliferación de brotes laterales fue muy escasa, tal vez por la inversión energética en crecimiento longitudinal. La supervivencia en la etapa de aclimatación fue de un 40.9% mayor que los tratamientos con regulador (T1, T2, T3); lo que sugiere, que aunque no hay proliferación de nuevas plantas, este tratamiento (T0) podría servir como medio para el cultivo de nuevos explantes y posteriormente se induciría la brotación de yemas con reguladores del crecimiento. Esto permitiría obtener plantas sanas libres de virus apropiadas para uso comercial, médico, farmacéutico y cosmético.

En el tratamiento T1 el crecimiento y número de raíces fue mayor que los tratamientos T0, T2, T3; el número y crecimiento de brotes laterales fue mayor al tratamiento T0, igual al tratamiento T2 y menor al tratamiento T3. En la aclimatación de las plántulas la supervivencia fue de un 13.6 %, menor que los tratamientos T0, T2 y T3. No obstante, este tratamiento (T1) presentó resultados similares a los obtenidos por Araújo y colaboradores (2002), indicando un tratamiento apropiado para la propagación clonal *in vitro* de *A. barbadensis* a gran escala, generando plántulas sanas, vigorosas, de alto valor genético y económico.

En el tratamiento T2 el crecimiento de la parte aérea del explante se mostró por debajo del crecimiento citado por Araújo *et al.* (2002) como al apropiado para su paso a la etapa de aclimatación. El número y crecimiento radical fue mayor que el tratamiento sin regulador (T0) pero menor que los tratamientos con regulador T1 y T3. El crecimiento y proliferación de los brotes laterales fue muy similar entre los tratamientos con regulador (T1, T3) pero mayor que el tratamiento sin regulador del crecimiento (T0). El porcentaje de supervivencia de las plántulas en la etapa de aclimatación fue de un 18.2 %, lo que sugiere que T2 no es un tratamiento con regulador del crecimiento conveniente para el crecimiento y desarrollo del sistema radical del explante; pero posiblemente ajustando las concentraciones de reguladores sea eficaz para la proliferación de brotes laterales.

El tratamiento T3 presentó un crecimiento menor del explante que el tratamiento sin regulador (T0) y con regulador del crecimiento (T1, T2). El crecimiento y número de raíces fue mayor que los tratamientos T0 y T2, pero menor que el tratamiento T1 y éstas eran engrosadas y similares a callos. El crecimiento y proliferación de brotes laterales fue mayor y similar en los tratamientos con regulador y superior al tratamiento sin regulador. Sin embargo, la supervivencia fue de un 27.3 % en la etapa de aclimatación, por debajo de la obtenida por Araújo *et al.* (2002) en la misma etapa; indicando que este tratamiento (T3) no es apropiado para el crecimiento del explante, formación y desarrollo de raíces.

V. CONCLUSIONES

- El crecimiento *in vitro* del vástago de *A. barbadensis* no se estimula con la aplicación de reguladores del crecimiento, ANA y 6-BAP; sin embargo, se estimula el crecimiento del sistema radical.
- La proliferación de brotes laterales es mayor en medio MS (1962) con reguladores del crecimiento.
- En el tratamiento sin regulador (T0) se obtienen plantas sanas, de buen tamaño para la aclimatación y supervivencia, pero no para propagación.
- Las combinaciones de reguladores del crecimiento del tratamiento T0 (0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP) son las mas convenientes para el crecimiento de los explantes y las del tratamiento T1 (6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP) para la multiplicación de las plántulas.
- Los explantes y brotes laterales se desarrollan satisfactoriamente en el tratamiento T1 (6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP) donde muestran buen vigor, color y tamaño.

- El crecimiento y número de raíces normales se mostró mayor en el tratamiento T1 (6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP).
- Las plántulas *in vitro* de *A. barbadensis* que se desarrollaron en medio MS (1962) sin regulador del crecimiento alcanzan una mejor aclimatación y supervivencia en el invernadero.

VI. RECOMENDACIONES

- El tratamiento T0 (0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP) es apropiado si se desea obtener plantas sanas *in vitro* para tomar como nuevos explantes e inducir su brotación.
- Si en los explantes de *A. barbadensis*, los brotes laterales no alcanzan un tamaño adecuado (1.5 cm) para su separación y trasplante, es apropiado cambiarlos al tratamiento T0 (0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP) hasta que los brotes alcancen el tamaño deseado.
- En caso de no requerir mas brotes a partir de los brotes obtenidos en el primer cultivo, es conveniente sembrarlos en el tratamiento T0 (0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP) sin regulador del crecimiento para que alcancen un mayor crecimiento y supervivencia en el invernadero, sin perder numerosas plántulas en la etapa de aclimatación.
- Optimizar los rangos de concentración de los reguladores del crecimiento, con el fin de establecer la concentración más conveniente para el crecimiento, enraizamiento o multiplicación de *A. barbadensis*.

- En futuros estudios sobre micropropagación de *A. barbadensis*, es bueno conocer el genotipo en uso de la especie para determinar concentración de reguladores del crecimiento donde se estimula la brotación.
- Se requiere conocer previamente las características morfológicas y anatómicas de la especie para luego diseñar un método en la selección de muestra, en este caso, de explantes.
- Aplicar exógenamente las concentraciones evaluadas en plantas de *A. barbadensis* en el campo, para comparar resultados y determinar su mejor método de propagación.
- Realizar mas estudios sobre la supervivencia de las plántulas de *A. barbadensis* en la etapa de aclimatación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarenga, S. 2003. Laboratorio de cultivo de tejidos I. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Anónimo. 1999. *Aloe barbadensis (Aloe vera)*-Medicinal Aloe (Liliaceae). Room # 7. Department of Botany. Gardens and Greenhouses. University of Wisconsin-Madison. U.S.A. Consultado 16 Febrero 2005.
Disponible en: <http://botit.botany.wisc.edu/courses/tour/Roomseven-A1.html>

Anónimo. 2001. Aloe vera. Boletín Thompson & Morgan Semillas Online y Catálogos de Plantas. Reino Unido. Consultado 24 Agosto 2004.
Disponible en: <http://seeds.thompson-morgan.com/uk/es/product/2753/1>.

Anónimo. 2002. Aloe Vera. Laboratorios Pejoseca, s. L. Productos Naturales. Islas Canarias (U. E.) España. Consultado 3 Junio 2002 y 29 Julio 2004
Disponible en: <http://www.aloveria.com/espanol/alovera.htm>
<http://www.aloveria.com/es/aloveria/index.html>

Anónimo. 2003. Aloe vera. Departamento Agroindustrial Fundación Chile, Enero 2003. Consultado 8 Julio 2004.
Disponible en: <http://www.agrogestion.com/aloe/main.htm#7>

Anónimo. 2004. Por qué Biotecnología. Introducción teórica. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argenbio. Argentina. Consultado 4 Enero 2005. Disponible en: http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_35_teo.asp

Araújo, S. P., Duarte da Silva, J. M. O., Neckel, C. A., Ianssen, C., Oltramari, A. C., Dos Passos, R., Tiepo, E., Bach, D. B. & Maraschin, M. 2002. Biotecnología Ciência & Desenvolvimento. 25 (2): 54 – 57. Consultado 18 Julio 2003. Disponible en: <http://www.biotecnologia.com.br/bio25/micro.pdf>.

Bidwell, R. S. S. 1979. Fisiología vegetal. AGT. Editor, México, 1ª. ed. In Hurtado, D. V., & Merino M., M. A. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, S. A. de C. V. México, D. F. p. 53.

- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegenetics, Edington. 1361 p.
 In Cerdas, L. V. & Guzmán L. A. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). Rev. Biol. Trop. 52(1): 41 – 46.
- González, S. 2004. Medios de Cultivo. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. 14 p.
 Consultado 6 Enero 2005.
 Disponible en: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema%205.doc>.
- González, L. J. & Morón, F. 2004. *Aloe vera*: la planta de la inmortalidad. Infomed. La Habana, Cuba. Consultado 5 Julio 2004.
 Disponible en: <http://saludparalavida.sld.cu/modules.php?name=News&file=article&sid=120>
- Grindlay, D., & Reynolds, T. 1986. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. PubMed - indexed for MEDLINE. 16(2-3):117-51. Consultado el 6 Enero 2005.
 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&cmd=Search&term=%22Grindlay+D%22%5BAuthor%5D>
- Hartmann, H. T., & Kester, D. E. 1985. Propagación de plantas, principios y prácticas. Editorial Continental, S.A. de C. V. México, D. F. 814 p.
- Hurtado, D. V., & Merino M., M. A. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, S. A. de C. V. México, D. F. 232 p.
- Imery Buiza, J., & Cequea Ruiz, H. Anormalidades cromosómicas en la microsporogénesis de *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Aloaceae). *Acta Bot. Venez.*, jun. 2002, vol.25, no.2, p.143-152. Consultado 3 Julio 2005.
 Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S008459062002000200003&script=sci_arttext.
- Judd, S. W., Campell, S. C., Kellogg, A. E. & Stevens, F. P. 1999. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates Inc. MA. U.S.A. p. 188 – 189.
- Meyer, H. J. & Van Staden, J. 1991. Rapad *in vitro* Popagation of *Aloe barbadensis* Mill. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 26(3): 167 – 172. In Biological Abstracts 1991 Part 2.

- Morales, J. 2005. Glosario de jardinería, flores, plantas y medio ambiente. Cádiz, España. Consultado 4 Julio 2005.
Disponible en: <http://infojardin.net/glosario/pradera/propagacion.htm>
- Moore, T. 2004. Aloe barbadensis. Compiled by Master Gardeners of the University of Arizona Pima County Cooperative Extension. Arizona, U.S.A.
Consultado 16 Febrero 2005. Disponible en:
http://ag.arizona.edu/pima/gardening/aridplants/Aloe_barbadensis.html
- Natali, L., Sanchez, I. C. & Cavallini, A. 1990. *In vitro* Culture of *Aloe barbadensis* Mill. Micropropagation from Vegetative Meristems. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 20(1): 71 – 74. In Biological Abstracts 1990 Part 1.
- Navarro, W. & Perea, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de las plantas. Editorial de la Universidad Nacional Campus Omar Dengo. Heredia, Costa Rica. 104 p.
- Roca, W. M., Mroginski, L. A. & Sábados, L. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. p. 173 – 210. In Roca, W. M. & Mroginski, L. A. (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. 970 p.
- Olmos, S., Luciani, G. & Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Micropropagación. p. 161 – 172. In Echenique, V., Rubinstein, C. & Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA. 446 p. Consultado 4 Enero 2005.
Disponible en: <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php>.
- Orrego, G. M. 2002. Aloe, Sábila. Herbotecnia. Guatemala. 4 p. Consultado 10 Junio 2003. Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-aloe.html>.
- Radice, S. 2004. Herramientas básicas. Morfogénesis *in vitro*. p. 25 – 33. In Echenique, V., Rubinstein, C. & Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA. 446 p. Consultado 19 Mayo 2005.
Disponible en: <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php>.

Sentis, J. S. 2001. Aloe Vera. Todo sobre la planta más de moda. Murcia, España.
Consultado 16 Noviembre 2004. Disponible en:
http://www.mifarmacia.es/contenido/articulos/articulo_n_aloe_vera.htm

Woodland, W. D. 1997. Contemporary Plant Systematics. 2nd ed. Andrews University
Press. Michigan, E.E.U.U. p. 377.

VIII. ANEXOS

Cuadro 1. Crecimiento longitudinal promedio (cm) de explantes de *A. barbadensis* en medios MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas.

Semana	Crecimiento promedio (cm) de explantes en los tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.72	1.59	1.40	1.45
3	2.25	2.09	1.97	2.04
4	2.67	2.44	2.24	2.24
5	3.02	2.62	2.23	2.55
6	3.25	2.78	2.48	2.69
7	3.42	2.79	2.45	2.66
8	3.56	2.97	2.57	2.69
9	3.63	2.96	2.55	2.77
10	4.72	3.16	2.96	2.85

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Cuadro 2. Número promedio de hojas en explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas.

Semana	Número promedio de hojas en los explantes de los tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	4	4	3	4
4	4	4	4	4
5	4	4	4	4
6	4	4	4	4
7	5	4	4	4
8	5	4	4	4
9	5	4	4	4
10	6	5	5	5

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Cuadro 3. Crecimiento promedio (cm) de raíces en explantes de *A. barbadensis* en medios MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas.

Semana	Crecimiento promedio (cm) del sistema radical en los tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	2.29	0.35	0.26	0.24
4	3.14	0.83	0.38	0.48
5	3.30	1.89	1.08	0.90
6	3.32	3.52	1.96	2.11
7	3.81	5.81	3.16	3.61
8	3.90	7.01	4.55	6.33
9	3.96	8.62	5.38	7.69
10	4.98	9.56	6.53	7.75

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Cuadro 4. Número promedio (cm) de raíces en explantes de *A. barbadensis* cultivados en MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), durante diez semanas.

Semana	Número promedio de raíces en los tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0
3	1.6	2.7	1.7	1.3
4	1.6	5.1	3.4	3.6
5	1.7	6.9	4.8	4.8
6	1.7	7.7	5.6	5.2
7	1.8	7.7	5.7	5.7
8	2.1	7.8	6.2	6.0
9	2.4	7.9	6.2	6.4
10	3.0	7.9	6.3	7.2

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Cuadro 5. Crecimiento promedio (cm) de brotes laterales en los explantes de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) durante diez semanas.

Semana	Crecimiento promedio (cm) de brotes laterales en los tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.18	0.13	0.16
4	0.00	0.41	0.42	0.48
5	0.00	0.71	0.60	0.69
6	0.00	0.83	0.86	0.90
7	0.00	0.94	0.96	0.92
8	0.02	1.08	1.03	1.13
9	0.12	1.18	1.20	1.23
10	0.37	1.41	1.46	1.55

T0: 0.0 mg/ml de ANA; 0.0 mg/ml de 6-BAP.

T1: 6.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.4×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T2: 7.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.5×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

T3: 8.4×10^{-4} mg/ml de ANA; 1.6×10^{-3} mg/ml de 6-BAP.

Cuadro 6. Promedio de brotes laterales en explantes de *A. barbadensis* en medio MS (1962) con y sin reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP), a las diez semanas.

Tratamientos	Brotos laterales
T0	1
T1	11
T2	11
T3	13

Cuadro 7. Número de plántulas aclimatadas en el invernadero (diez por cada tratamiento), procedentes del cultivo *in vitro* de *A. barbadensis*.

Tratamientos	Plántulas aclimatadas
T0	9
T1	3
T2	4
T3	6