

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología
Carrera: Lic. Biología. 5to año



Título: Propagación *in vitro* de *Aloe vera* L.

TESIS DE DIPLOMA



Autora: Leticia Gómez García

Tutora: MSc. Naivy L. Pérez Alonso

TESIS DE DIPLOMA



Título: Propagación *in vitro* de *Aloe vera* L.

Autora: Leticia Gómez García

Tutora: MSc. Naivy L. Pérez Alonso (naivy@ibp.co.cu)

Instituto de Biotecnología de las Plantas

Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.

Resumen

Aloe vera L. contiene metabolitos secundarios de acción cicatrizante, antiinflamatoria y protectora de la piel; además presenta propiedades bactericidas, laxantes y agentes desintoxicantes. La alta demanda de esta especie en las industrias farmacéutica y de cosméticos ha provocado que el cultivo tradicional sea insuficiente para satisfacer el mercado actual. En Cuba, es utilizada como constituyente de numerosos productos farmacéuticos y cosméticos. Actualmente, una gran parte de la materia prima de *Aloe* es importada debido a la inexistencia de poblaciones suficientemente grandes para suplir toda la demanda. La propagación *in vitro* es una de las alternativas para incrementar la disponibilidad de biomasa de esta especie. La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *A. vera*. En la fase de establecimiento se realizó un experimento que combinó la época de toma del material vegetal (seca y lluvia) con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de los explantes (1,0; 2,0 y 3,0 %). Para la multiplicación de los brotes establecidos se estudió el manejo de los explantes realizándose un corte transversal y un corte transversal-longitudinal a los mismos. Luego se estudiaron dos concentraciones de 6-BAP (2,0 y 8,0 mg.L⁻¹) combinadas con AIB (0,5 mg.L⁻¹) en los medios de cultivos con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación. Asimismo se evaluaron sustratos en la fase de aclimatación de las plantas utilizando en diferentes proporciones el Compost de cachaza y la zeolita (100/0 %, 75-25 %, 50/50 %, 25-75 %, 0/100 % respectivamente). Los resultados mostraron que se logró el establecimiento *in vitro* de ápices con un 93 % de explantes libres de contaminantes microbianos tomando el material vegetal en la época de seca y desinfectándolo con NaClO al 2,0 % durante 15 min. En la fase de multiplicación se obtuvieron los mejores resultados en los medios de cultivo que contenían la combinación de 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, realizando un corte transversal a los brotes. En estas condiciones se obtuvieron coeficientes de multiplicación de 5,1. En la fase de aclimatación se lograron porcentajes de supervivencia del 100 % y los mejores resultados en cuanto al crecimiento de las plantas se obtuvieron con el sustrato que contenía el 100 % de Compost de cachaza. Los resultados permiten disponer de un protocolo de propagación *in vitro* con el cual es posible obtener en un año 12 612 plantas a partir de un hijo de planta adulta. Este protocolo además tiene la ventaja que las plantas obtenidas son uniformes, sanas y presentan rejuvenecimiento fisiológico lo que influirá satisfactoriamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas en el campo. En nuestro país la presente investigación constituye el primer reporte del desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* en esta especie.

Palabras clave: aclimatación, cultivo de tejidos, establecimiento *in vitro*, multiplicación *in vitro*, sábila, yemas axilares.

Abstract:

Aloe vera L. contains secondary metabolites of healing action, anti-inflammatory and protective of the skin, it also provides antibacterial properties, laxative and detoxifying agents.

The high demand of this species in the pharmaceutical and cosmetic industries has caused that the traditional crop is insufficient to satisfy the current market. In Cuba, this plant is used as a constituent of many pharmaceutical and cosmetic products. Currently, a large part of Aloe raw material is imported due to the lack of sufficiently large populations to meet all the demand. *In vitro* propagation is one of the alternatives to increase the availability of biomass of this species. This research was carried out in order to develop a protocol for *in vitro* propagation of A. vera. In the establishment phase, an experiment that combined the time of gathering plant material (dry and rain) with different concentrations of sodium hypochlorite in the disinfection of explants (1.0-2.0 and 3.0 %) was conducted. For the shoots multiplication explants management was studied. A transversal cut and a transversal-longitudinal cut was carried out. Two concentrations of 6-BAP (2.0 and 8.0 mg.L⁻¹) combined with AIB (0.5 mg.L⁻¹) in the culture media were studied to increase the multiplication coefficient. Besides substrates in the acclimatization phase of plants were evaluated using different proportions of the cachaza Compost and zeolite (100 / 0 %, 75 – 25 %, 50 / 50 %, 25-75 %, 0 / 100 % respectively). The results showed that *in vitro* establishment of apices with 93 % of microbial pollutant-free explants was achieved taking plant material in the dry season and disinfecting with sodium hypochlorite to 2.0 % for 15 min. In the multiplication phase were obtained best results in culture medium containing the combination of 2.0 mg L⁻¹ of 6-BAP and 0.5 mg L⁻¹ of AIB, making a transversal cut to shoot. Multiplication coefficients of 5.1 were obtained under these conditions. Survival rates of 100 % were achieved in the acclimatization phase and the best results of plants growth were obtained with the substrate containing 100 % of Compost of cachaza. The results provide an *in vitro* propagation protocol which allows obtaining in a year 12 612 plants from a shoot of adult plant. This Protocol also has the advantage that the plants obtained are uniform, healthy and physiological rejuvenation which will successfully influence the growth and development of plants in the field. In our country this research is the first report of the development of a *in vitro* protocol for propagation in this species.

Key words: acclimatization, axillary buds, in vitro establishment, in vitro multiplication, tissue culture.

Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	4
2.1. <i>Aloe vera</i> L. Generalidades	4
2.1.1. Origen, habiudad y distribución	4
2.1.2. Clasificación taxonómica y características botánicas	5
2.1.2.1 Descripción de la familia <i>Liliaceae</i>	5
2.1.2.2 Descripción botánica de <i>Aloe vera</i>	5
2.1.3 Enfermedades del cultivo	6
2.1.4 Importancia económica del cultivo	6
2.2 Propagación	7
2.2.1 Propagación convencional de <i>A. vera</i>	7
2.2.2 Propagación <i>in vitro</i>	8
2.3 Factores a tener en cuenta para la micropropagación	9
2.3.1 Selección del material vegetal	9
2.3.2 Medios de cultivo	9
2.3.3 Condiciones ambientales de incubación	11
2.4 Métodos de propagación	13
2.4.1 Organogénesis	13
2.4.2 Embriogénesis	14
2.5 Etapas de la micropropagación	14
2.5.1 Fase Preparativa o Fase 0	14
2.5.2 Fase de establecimiento o Fase I	15
2.5.3 Fase de Multiplicación o Fase II	16
2.5.4 Fase de Enraizamiento o Fase III	17
2.5.5 Fase de Aclimatización o Fase IV	18
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. vera</i>	18
3. Materiales y Métodos	21
3.1 Establecimiento <i>in vitro</i>	23
3.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección	23
3.2 Multiplicación <i>in vitro</i>	25
3.2.1 Manejo del explante	25

3.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación <i>in vitro</i>	26
3.3. Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas	28
4. Resultados	31
4.1 Establecimiento <i>in vitro</i>	31
4.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección	31
4.2 Multiplicación <i>in vitro</i>	33
4.2.1 Manejo del explante	33
4.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación <i>in vitro</i>	35
4.3 Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas	38
5. Discusión	44
5.1 Establecimiento <i>in vitro</i>	44
5.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección	44
5.2 Fase de multiplicación <i>in vitro</i>	49
5.2.1 Manejo del explante	49
5.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquininas en la multiplicación <i>in vitro</i>	50
5.3 Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas	54
6. Conclusiones	58
7. Recomendaciones	59
Literatura Citada	

1. Introducción

Las plantas son fuentes de productos metabólicos de importancia comercial, empleados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005).

Aloe vera L. (sábila) pertenece a la familia *Liliaceae*, originaria del norte de África e introducida en las Antillas y América tropical donde crece en forma natural y se cultiva comercialmente (Albany *et al.*, 2006). Es una planta perenne con hojas suculentas de color verde-gris, dispuestas en rosetas. Presenta inflorescencias densas de color frecuentemente amarillo.

Los compuestos extraídos de las hojas de *A. vera* poseen propiedades excepcionales que los hacen indispensables en la elaboración de múltiples productos terapéuticos nutricionales y de belleza (Añez y Vásquez, 2005; Vega *et al.*, 2005). Tiene enorme demanda en las industrias farmacéuticas y cosméticas (Anuree *et al.*, 2010). Es por esto que el mercado de sus productos ha mostrado un marcado y sostenido ascenso (Pina-Zambrano, 2005).

La liberación temprana de polen con respecto a la receptividad del estigma (protandria) en combinación con la autoincompatibilidad reduce las oportunidades para la autopolinización en las flores hermafroditas (Imery, 2008). Este aspecto dificulta la propagación sexual de esta especie, realizándose entonces de forma vegetativa a través de hijuelos. Sin embargo, la tasa de propagación convencional por esta vía es demasiado lenta y baja (Barcroft, *et al.*, 2003). Esto conlleva a una insatisfacción en la demanda necesaria para la producción comercial (Arvind, 2010). Además de los riesgos que puede conllevar este tipo de propagación en la diseminación de enfermedades fungosas y bacterianas (Rincón, 1998).

Por todo lo expuesto se acentúa el déficit de estas plantas en el mercado nacional e internacional y el cultivo de tejido se ha convertido en una de las alternativas tecnológicas ampliamente utilizadas para la propagación en este cultivo (Matos *et al.*, 2000).

Es comprensible entonces el interés de grandes industrias en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto, donde los avances de la biotecnología vegetal, especialmente el cultivo de células y tejidos constituyen una alternativa para la producción de cultivos de gran interés (Vanisree y Tsay, 2007).

La micropropagación de *A. vera* ha sido informada por Natali *et al.* (1990), Meyer y Standen (1991), Aggarwal y Barna, (2004), Albany *et al.* (2006), Matos (2007), Anusree *et al.* (2010), Jayakrishna *et al.* (2011). Sin embargo, la fuente de explante, el tamaño, edad, el genotipo, la composición del medio de cultivo, las condiciones de cultivo, la hiperhidricidad, el contenido fenólico de los brotes y la supervivencia *ex vitro* afecta grandemente la regeneración de plantas en los diferentes genotipos de esta especie. En Cuba hasta el momento no se existen investigaciones previas sobre el cultivo *in vitro* de *A. vera*.

Problema científico

El cultivo *in vitro* de *A. vera* se ve afectado por bajos porcentajes de establecimiento *in vitro* y bajos coeficientes de multiplicación, por lo cual es necesario realizar estudios para lograr mejorar estos aspectos, con el fin de desarrollar un protocolo de micropropagación.

Hipótesis

A partir del empleo de plantas de campo, el establecimiento de las condiciones para el cultivo *in vitro* y la evaluación de la respuesta de las plantas a diferentes sustratos durante la aclimatización se podría desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de *A. vera*.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de *A. vera*.

Objetivos específicos:

- 1-. Establecer *in vitro* plantas de *A. vera*,
- 2-. Determinar el efecto del manejo del explante y reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas *in vitro*,
- 3-. Evaluar la respuesta de las plantas micropropagadas a diferentes sustratos durante la aclimatización.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Aloe vera L. Generalidades

2.1.1 Origen, habitad y distribución

Aloe vera L. conocida como sábila, es una planta de la costa Noroccidental de África y actualmente se cultiva principalmente en África del Sur, América Latina y el Caribe (Imery y Cequea 2001, Vega *et al.* 2005). *A. vera* se cultiva en alturas de 400 a 2,500 msnm, aunque en Cuba se obtienen buenos rendimientos en plantaciones a alturas inferiores a 400 msnm.

La planta crece mejor en un clima seco, con temperaturas entre 18 y 40°C, precipitación pluvial de 400 a 2,500 mm anuales y humedad relativa de 65 a 85%. Según García (2002) no crece en bosques lluviosos ni en desiertos áridos. Sobrevive bien a una sequía prolongada. Esto le permite crecer en lugares soleados, rocosos y pedregosos en cualquier tipo de tierra. Sin embargo, es fundamental que exista un buen drenaje. La planta prefiere suelos arenosos, franco arenosos y franco arenoso-arcillosos, con suficiente materia orgánica. Además se desarrolla en un pH ligeramente ácido, no crece en áreas pantanosas.

La sábila requiere de luz solar directa, por lo que se recomienda cultivar sin la asociación con otros cultivos. Es muy sensible a la sombra, así como a la competencia de la maleza por obtener nutrientes (Sánchez, 2006).

2.1.2 Clasificación taxonómica y características botánicas

Según el sistema de clasificación sugerido por Sauget (1946) la taxonomía de la especie es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Liliales*

Familia: *Liliaceae*

Género: *Aloe*

Especie: *Aloe vera*

N. común: sábila

2.1.2.1 Descripción de la familia *Liliaceae*

La familia *Liliaceae* comprende unos 125 géneros y 1400 especies de amplia distribución (Sauget, 1946) que pueden ser hierbas, arbustos o árboles, comúnmente con rizomas o bulbos. Las plantas presentan hojas alternas, rara vez con peciolo claramente definido. Flores masculinas y femeninas, regulares. El ovario es súpero; periantio petaloideo de seis partes semejantes en dos series. Presenta seis estambres, hipóginos o insertos en el periantio. Los carpelos aparecen unidos y generalmente son tres. Ovario comúnmente treslobulado o globoso. El fruto es en cápsula o baya.

2.1.2.2 Descripción botánica de *Aloe vera*

Es una planta carnosa, acaulescente o casi acaule, estolonífera. Presenta hojas gruesas, amontonadas, los márgenes con dientes espinosos-dentados; con 2,0 cm o menos de separación. Las hojas son estrechamente lanceolados, de 3,0 a 6,0 dm de largo, largamente acuminadas, de color verde glauco pálido. En el interior son acuosas. Las flores en racimos nodosos. Escapo robusto; de 6,0 a 12 cm de alto, portando escamas agudas distantes. Los racimos densos, de 1,0 a 3,0 cm de largo; brácteas de lanceoladas a aovadas agudas distantes, más largas que los cortos pedicelos. Las flores son de color amarillo, anaranjado, púrpura y rojo dependiendo la variedad, como de 2,5 cm de largo. El periantio es subcilíndrico, los segmentos conniventes o coherentes y sus puntas algo extendidas, los estambres son seis, poco más o menos del largo del periantio con filamentos delgados y anteras oblongas. El ovario sésil, tres-angular y tres-locular, estilo alezado, más largo que el periantio, terminado por el pequeño estigma. Los óvulos son numerosos en cada cavidad del

ovario. Cápsula coriácea, con dehiscencia loculicida. Presenta numerosas semillas de color negro (Roig y Mesa, 1974).

2.1.3 Enfermedades del cultivo

Las principales enfermedades en esta planta son producidas por hongos tales como *Fusarium alternata*, *Phytophthora sp.*, *Sclerotium solani*, provocando daños en el cuello de las plantas y en el sistema radical. Estos ocasionan que las plantas se decapiten, sequen y mueran. Generalmente el exceso de humedad en el suelo provoca estos fenómenos adversos. Otros hongos detectados en las hojas han sido *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp* y *Curvularia sp.*, que producen manchas en la superficie y en los bordes, así como endurecimiento de las puntas de las hojas (García, 2002).

2.1.4 Importancia económica del cultivo

Su uso data hacia el año 2.200 AC en escritos cuneiformes en la tabla de Arsubanipal, en la ciudad de Nippur. También se cita en diversos papiros y documentos egipcios hacia el año 1550 AC. Aún cuando ya se usaba con mucha anterioridad, con fines medicinales y en técnicas de embalsamamiento, aparece descrita en los primeros tratados de farmacología griega y en textos bíblicos. Uno de sus compuestos más importantes es citado como el acíbar (sustancia resinosa medicinal) de la flor roja del aloe de Socotora, empleado con mirra por Nicodemo, para preservar el cuerpo de Cristo (Sánchez, 2006).

Existen alrededor de 300 especies de *Aloe*, de las cuales se han demostrado científicamente que son cuatro las que presentan las mayores propiedades medicinales: *Aloe barbadencis* Miller, *Aloe perry* Baker, *Aloe arborencens*. No obstante *A. barbadencis* Mille (=Aloe vera L.) (Gui, 1990), es considerada como la más utilizada en la medicina curativa y la más popular en el mundo entero (Vega *et al.* 2005).

A. vera es una planta económicamente importante por sus propiedades terapéuticas excepcionales (Rehm y Espig, 1991). Tiene enorme demanda en las industrias farmacéutica

y cosmética (Das *et al.*, 2010). La planta ha sido usada como analgésico, en la cicatrización de heridas y agente antimicrobiano (Ndhlala *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2008), como calmante del dolor, regenerador de los tejidos, antimicótico (Jasso *et al.*, 2005), laxante (Rivero *et al.*, 2002) y en la industria alimentaria (Vega *et al.*, 2005).

En su uso interno en el organismo ayuda al hígado, los riñones y el sistema linfático en su función depurativa. Es estimulante del sistema inmunitario del organismo; ayuda en los problemas óseos y articulares; estimula y reequilibra las funciones digestivas, es por tanto útil en los casos de gastritis y úlceras, colitis (Hammam, 2008). Es un antioxidante y un antitumoral (Lee *et al.*, 1997). No injustamente es considerada la reina de las plantas curativas. En la industria de cosméticos se encuentra bajo muchas formas: gel, pomada, loción, crema y jabones.

La sábila es utilizada en Cuba frente al virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1 (Rivero *et al.*, 2002), en el tratamiento del asma bronquial (Rodríguez *et al.*, 2004). También es usada en el tratamiento tópico de las úlceras postrombóticas (Ascaño y Quiñones, 2003) y para curar el moquillo en las aves.

2.2 Propagación

2.2.1 Propagación convencional de *A. vera*

Es una planta que se propaga en forma sexual y asexual. La propagación asexual es por medio de vástagos, bulbos o tallos de una planta adulta. La que más se recomienda es por medio de vástagos (a través de retoños de raíces), ya que la planta puede generar hasta 20 vástagos.

Cuando la planta va sacando retoños, se seleccionan los que midan unos 15cm, eliminándoles las raíces y hojas más viejas dejando de cuatro a cinco hojas para evitar que se dañen. Los hijos pueden plantarse directamente en el área de producción o ser previamente colocados en vivero por algún tiempo, antes de ser plantados.

Las condiciones fitosanitarias de los hijuelos es una condicional primordial para la propagación. García (2002), encontró algunas medidas profilácticas. En primer lugar, la poda radical, eliminando toda la parte que aparezca necrosada, dejando de dos a tres anillos de crecimiento. De esta manera, pueden plantarse inmediatamente o esperar su cicatrización por un período no mayor de siete días. También se pueden sumergir en una solución de Zineb (5,0 g/L) durante 5,0 min., después de realizada la poda.

No obstante, este sistema de propagación es una fuente de diseminación de enfermedades fungosas y bacterianas (Rincón, 1998). Además de que no es suficiente la cantidad de plantas para la demanda en la producción comercial (Arvind, 2010).

2.2.2 Propagación *in vitro*

Teóricamente las células de las plantas pueden ser clonadas y obtenerse un número considerable de individuos con la misma constitución genética que la célula original (George, 2008).

El término de micropropagación según Krikorian (1991), se utilizó por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester, y se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de plantas, órganos, tejidos o células que produzcan un mayor número de plántulas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original.

Los métodos disponibles de propagación *in vitro* de plantas son una extensión de aquellos desarrollados por la propagación convencional pero presentan numerosas ventajas dentro de las cuales tenemos:

_ Los cultivos se comienzan con pequeños segmentos de tejidos que desarrollan hacia pequeños brotes o tejidos. _ Es requerido un reducido espacio para el mantenimiento y el incremento del número de plantas. _ La propagación se realiza en condiciones asépticas evitando la contaminación y diseminación de microorganismos, por lo que las plantas finalmente desarrolladas deben estar libres de estos. _ Es posible ajustar los factores que

influyen sobre la regeneración vegetativa. _ Las tasas de multiplicación son mayores y gran cantidad de plantas pueden ser producidas en un tiempo determinado. Por consiguiente se pueden propagar caloradamente nuevos genotipos o plantas que por métodos convencionales resultan difíciles de propagar. _ las plantas pueden adquirir nuevas características temporales que las hacen muy deseadas (uniformidad, incremento en el rendimiento). _ La producción puede ser continuada todo el año (Geroge, 2008).

2.3 Factores a tener en cuenta para la micropropagación

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro*, se siguen una serie de principios básicos que no se pueden violar (Jiménez, 1998), los cuales serán abordados.

2.3.1 Selección del material vegetal

Prácticamente se puede utilizar cualquier porción o parte de la planta. Para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro* en primera instancia dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal que se trate. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemos. Las plantas jóvenes son las que aportan los mejores explantes, ya que la potencialidad disminuye con la edad. El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con su disminución (Mroginski, 1991).

2.3.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicas (Smith, 1992). Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio y del agente solidificante (George y de Klerk, 2008; Thorpe *et al.*, 2008).

El medio de cultivo más comúnmente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *in vitro* es el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (Bouman y Tiekstra, 2005). También se

han empleado pero con menor frecuencia el Wh (White, 1943), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), BDS (Dunstan y Short, 1977) citados por Mroginski (1991).

Los reguladores del crecimiento en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal (Barceló *et al.*, 2007). Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie (George y Davies, 2008; George y Debergh, 2008; Machakova *et al.*, 2008).

Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Segura, 2008).

Usualmente en los meristemas y ápices, la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces (Segura, 2008). Por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada. Se utilizan en el medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0,03-30 mg/L y se ha demostrado su efecto en el crecimiento y morfogénesis *in vitro* (Mroginski, 1991; van Staden *et al.*, 2008).

Al contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemas que se emplean como material inicial para el cultivo *in vitro*, son los lugares de síntesis. Se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0,001-10 mg/L (Jiménez, 1998; Machakova *et al.*, 2008).

También se han empleado en los medios de cultivo las giberelinas (GA3), ácido abscísico (Mroginski, 1991; Smith, 1992) y con mayor frecuencia los brasinoesteroides y oligosacarinas, que ejercen una acción similar o superior a los reguladores del crecimiento tradicionales. Además, tienen la ventaja que se adicionan en los medios de cultivo en bajas concentraciones (Fujioka y Sakurai, 1997; Cabrera *et al.*, 1998; Moshkov *et al.*, 2008).

2.3.3 Condiciones ambientales de incubación

Este requisito se debe cumplir rigurosamente para el éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para ello es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de luz ($19-95 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y temperatura ($20-28^{\circ}\text{C}$), así como de humedad relativa (70-80 %) acordes con los objetivos de trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, entre otros (Pierik, 1990; Roca, 1991). No obstante, se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades.

Las características morfo-anatómicas y fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro* obedecen en gran medida al microambiente de los frascos de cultivos. Esto resulta de la interacción de diferentes factores tales como la intensidad de la luz, la concentración de dióxido de carbono (CO_2) y la composición del medio de cultivo (Kozai *et al.*, 1995; George y Davies, 2008).

La presencia de sacarosa y sales minerales en los medios de cultivo, sumado a los bajos niveles de luminosidad y CO_2 en los frascos, provocan una disminución de la capacidad fotosintética de las plantas cultivadas *in vitro*. Aunque en ocasiones estas plantas pueden parecer normales, en realidad tienen una actividad fotosintética baja (Hazarika, 2003; Aragón *et al.*, 2010).

En los frascos de cultivos casi herméticos el poco intercambio gaseoso genera un microambiente semi-enrarecido con una reducida disponibilidad de CO_2 atmosférico. Por tanto la sacarosa suministrada de manera exógena en el medio de cultivo, se convierte en la fuente primaria de suministro de carbono. Esto provoca que estas plantas no necesiten el desarrollo de un aparato fotosintético normal (Nguyen y Kozai, 2001; Zobayed, 2005; George y Davies, 2008).

Como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas presentan una anatomía y fisiología diferente a las que son cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Kozai y Smith, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1997; Majada *et al.*, 2001; Chakrabarty y Subodh, 2008). Los desórdenes afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*.

Según Hazarika (2003) dentro de estos desórdenes se encuentran el pobre desarrollo del aparato fotosintético, de las cutículas de las hojas y la emisión de raíces no funcionales sin conexión con los haces conductores.

Kevers *et al.* (2004) señalan que en comparación con plántulas de semilla cultivadas en invernadero, las plantas cultivadas *in vitro* generalmente tienen menor contenido de clorofilas y carotenoides, o de enzimas responsables de la fotosíntesis. Por ejemplo la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo), que es una enzima clave en la fijación del CO₂ atmosférico.

Las plantas que crecen durante el cultivo *in vitro*, debido a la baja luminosidad, pueden tener afectadas la concentración de clorofilas y la eficiencia y calidad de los fotosistemas (Hazarika, 2003). Además de irregularidades en la diferenciación y la distribución de las granas y los tilacoides en los cloroplastos. Por lo tanto las plantas cuando son transferidas a mayores intensidades luminosas tienden a tener reducidos valores de fotosíntesis (Miranda y Williams, 2007).

Las plantas cultivadas *in vitro* en medios de cultivo semisólidos realizan escasa fotosíntesis (Pospíšilová *et al.*, 2007). Este hecho no está sólo restringido al escaso desarrollo del aparato fotosintético, sino por la alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo. En los frascos de cultivos cerrados el CO₂ está en altas concentraciones durante la noche producto de la respiración y las variaciones en la fase lumínica dependen del tipo de planta y de las intensidades de luz a las que se cultiven (Moroni y Melai, 2005).

2.4 Métodos de propagación

2.4.1 Organogénesis

Los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis, están basados fundamentalmente en la multiplicación de brotes axilares a partir de una plántula, mediante el cultivo aséptico de un ápice o meristemo (Vasil, 1994). Es el método más ampliamente usado para la propagación de plantas con estabilidad genética (George y Debergh, 2008)

Existen varios factores que influyen en la propagación *in vitro*. El tamaño del explante, los medios de cultivo, el manejo del material vegetal, el tiempo y número de subcultivos deben ser determinados para cada especie vegetal (Castillo, 2008).

Este sistema de propagación presenta varias ventajas, se obtienen altos coeficiente de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en corto períodos de tiempo. Permite introducir rápidamente nuevas variedades o clones. Como proceso de cultivo de tejidos se puede realizar una producción independiente de las condiciones ambientales. Asimismo se obtiene incremento en los rendimientos de las plantas regeneradas *in vitro* debido al rejuvenecimiento y el saneamiento que presentan. Asimismo, las plantas obtenidas pueden presentar alta estabilidad genética y una gran uniformidad lo que conlleva a una mayor facilidad en la comercialización (Jiménez, 1998).

2.4.2 Embriogénesis

A través de la embriogénesis somática, un gran número de especies vegetales han mostrado su capacidad regenerativa, entre las que se encuentran los cítricos, café, yuca, gramíneas, solanáceas, plátano y banano (Lozoya, 1990; Luckse *et al.*, 1997; Medero *et al.*, 1997; Van Arnold, 2008; García, 2011; López *et al.*, 2012). Es la técnica más rápida para el clonaje *in vitro* de plantas aunque para su empleo se precisan estudios básicos para conocer los parámetros que regulan este proceso y estudios detallados de la variabilidad genética de las plantas obtenidas (García, 2011). Este método potencialmente presenta aplicaciones

prácticas para la propagación masiva particularmente porque posibilita la propagación usando biorreactores (Van Arnold, 2008).

2.5 Etapas de la micropropagación

El proceso de propagación *in vitro* conlleva cinco fases (Clemente, 1999):

Fase 0) selección y preparación de las plantas madre donadoras de los explantes, las cuales deben encontrarse en condiciones fisiológicas y sanitarias óptimas.

Fase 1) establecimiento del cultivo, se introducen los explantes iniciales bajo condiciones de asepsia en el medio de cultivo; estos son previamente sometidos a una desinfección. Fase 2) multiplicación, a partir de las yemas axilares de los tallos en desarrollo o mediante la inducción de yemas adventicias.

Fase 3) elongación de los tallos y enraizamiento.

Fase 4) aclimatización a condiciones *ex vitro*, mediante la exposición progresiva de las plantas a condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. (Jiménez, 1998; Orellana, 1998).

2.5.1 Fase Preparativa o Fase 0

Según George y Debergh (2008) es una etapa importante, o casi indispensable, en el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible. Es la fase en que se selecciona la planta donadora de los explantes y se determinan todas las condiciones para el posterior establecimiento de los mismos.

El objetivo es garantizar un banco de plantas donantes de alta calidad genética y fitosanitaria, para disminuir los niveles de contaminantes microbianos visibles durante la fase de establecimiento *in vitro* y lograr repetibilidad real del proceso (Mroginski et al., 2004; George y Debergh, 2008).

2.5.2 Fase de establecimiento o Fase I

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento del explante fisiológicamente vigoroso y libre de contaminación microbiana para iniciar la multiplicación a gran escala (Olmos *et al.*, 2004).

La selección del tejido vegetal, su estado fisiológico, el protocolo de desinfección a utilizar, así como el medio de cultivo tienen gran influencia en la efectividad del establecimiento *in vitro* (Ramanayake *et al.*, 2006).

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mayor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Pérez *et al.* 1998)

.El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas. Mientras menor sea el explante menor será el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración. Con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas.

La contaminación de los cultivos *in vitro* es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micropropagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas; están los que se desarrollan en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de fallas en los procedimientos de laboratorio (Pérez *et al.*, 1998).

Desinfección:

La contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos.

Existen formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que lo introducen (Alvarado *et al.*, 1998 a y b).

Diversos compuestos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes. Se emplean con mayor frecuencia el etanol 70% y el hipoclorito de sodio entre 1,0-3,0 % (Das y Pal, 2005). Con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio (6,0-12 %) y el bicloruro de mercurio (0,1-1,25 %), aunque con este compuesto por lo general se obtienen mejores resultados, es altamente tóxico y no se elimina con facilidad del explante (Marulanda *et al.*, 2005).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 para reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante (Margara, 1988; Jiménez, 1998).

No obstante, las concentraciones del agente esterilizante y la duración se deben escoger en función de minimizar los daños para los explantes. Hay que tener en cuenta la especie vegetal y tipo de explante, ya que no existe un procedimiento único (Roca, 1991; Mroginski, 1991).

Después de aplicar los desinfectantes, los explantes se deben enjuagar varias veces con agua destilada estéril (González y Santana, 1988; Capote, 1993; Quintana, 1995).

2.5.3 Fase de Multiplicación o Fase II

El objetivo de esta etapa es incrementar el número de brotes de explantes ya establecidos *in vitro*, sin comprometer la calidad genética de las plantas generadas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. De esta forma, aumenta el número de plantas en cada subcultivo.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo, lo que permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2008).

Medio de cultivo

Es necesario establecer el medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos de la especie vegetal, al tipo de explante, al sistema de cultivo, a la relación auxina/citoquinina presente en el medio de cultivo y los factores ambientales.

La proliferación de nuevos brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas laterales. Aunque los brotes en crecimiento son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de citoquininas. Es conocido que esta es insuficiente para soportar el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Por tal razón más del 85 % de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen como suplemento alguna citoquinina (Quiala, 2004).

2.5.4 Fase de Enraizamiento o Fase III

El objetivo de esta fase es formar plantas completas con un sistema radical que les permita ser transplantadas a tierra en condiciones de vivero o invernadero (Ziv y Chen, 2008). Esta fase es la más voluminosa de todo el proceso. En ella cada brote debe ser cultivado y manipulado *in vitro* para que desarrollen varias raíces, que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al ser sembrada sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta lista para llevarse a campo (Mroginski *et al.*, 2004).

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento o con presencia de auxinas. Estas juegan un rol muy importante en la inducción y crecimiento de las raíces por lo que se emplean en la mayoría de los medios de cultivos de enraizamiento *in vitro* (Mroginski *et al.*, 2004).

Se recomienda también elevar las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Las plantas procedentes de un medio de cultivo con estas condiciones tiene mayor supervivencia al ser trasladadas al suelo (Mroginski *et al.*, 2004).

Varios autores eliminan esta fase para reducir el costo y posteriormente inducir las raíces bajo condiciones *ex vitro* (George *et al.*, 2008).

2.5.5 Fase de Aclimatización o Fase IV

El mayor obstáculo para el establecimiento de las plántulas que se obtienen por métodos *in vitro* es usualmente la transición del cultivo aséptico a casa verde y condiciones de campo (Novak, 1980).

Por lo que esta etapa reviste una gran importancia. En ella se realiza el trasplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al ambiente. Para lograr un alto índice de sobrevivencia se necesita que las plantas tengan un sistema radical bien desarrollado y se mantengan varios días en condiciones de alta humedad relativa e intensidad luminosa reducida (George y Debergh, 2008). Esto les permite una gran protección, lo que evita su desecación en los días posteriores al trasplante.

2.6 Cultivo *in vitro* de *A. vera*

El cultivo *in vitro* de *A. vera* ha sido estudiado por varios autores a partir de diferentes tipos de explantes, (Sanchez *et al.*, 1988; Natali *et al.*, 1990; Meyer y Standen 1991; Roy y Sarkar 1991; Chaudhuri y Mukandan 2001; Albany *et al.*, 2006; Matos, 2007; Anusree *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011).

Sanchez *et al.* (1988) trabajaron la micropropagación a partir de meristemas de los brotes. El cultivo *in vitro* se hizo muy difícil por inducción de callos y regeneración de plantas. El estudio del ADN microdensitométrico fue realizado en diferentes órganos de *A. vera* y durante el cultivo *in vitro* de diferentes explantes.

Natali *et al.* (1990) reportaron una rápida y efectiva micropropagación de plantas a partir de meristemo vegetativo. Los ápices de los brotes fueron colocados en un medio de cultivo que contenía 2,4-D y Kn por un período de 15 a 30 días. La gran habilidad morfogenéticas fue

mantenida por la transferencia de los explantes a un medio de cultivo compuesto por 2,4-D y 6-bencilaminopurina (6-BAP).

En *A. vera* el desarrollo de brotes axilares y la formación de brotes adventicios fue obtenida decapitando los explantes. El máximo crecimiento de los brotes en el medio de cultivo modificado de Murashige y Skoog con ácido indol-butírico (AIB). La óptima temperatura para el crecimiento y desarrollo de los brotes fue 25°C (Meyer y Standen, 1991).

Roy y Sarkar (1991) reportaron una propagación rápida en la formación de brotes a partir de callos de *A. vera*. Sin embargo, este no resulta un buen material de partida por la variabilidad que puede inducir. Para reducir la secreción de compuestos fenólicos por los brotes se utilizó polivinilpirrolidona (PVP).

Por su parte Chaudhuri y Mukandan (2001), reportaron para la formación de múltiples brotes utilizar concentraciones de auxinas, citoquininas. La sola presencia de auxinas o citoquininas resultaron en la formación de callos o brotes. La mejor multiplicación de los brotes fue obtenida con un medio de cultivo que contenía BA, sulfato de adenina y AIA.

Más tarde, Albany *et al.* (2006) lograron una metodología para propagar *in vitro* *A. vera*, logrando una desinfección con 3,0 % de hipoclorito de sodio durante 10 min. en agitación constante. El mejor medio de cultivo para la multiplicación fue el líquido y se logró llegar hasta la fase de aclimatización obteniendo vitroplantas adaptadas a condiciones *ex vitro*.

Por su parte Matos (2007), logró la optimización de su protocolo para micropropagar *A. vera* a partir de yemas apicales utilizando medio MS con sacarosa 3,0 %, agar 1,0 % y diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas. Se logró el enraizamiento sin necesidad de reguladores del crecimiento, mientras que la supervivencia de plantas bajo condiciones de invernadero fue del 71 %.

Anuree *et al.* (2010), utilizaron para la inducción de los brotes 35,5µM de AIB y 9,8 µM de AIB en combinación con 81,4 µM de sulfato de adenina. Obteniendo buenos resultados en cuanto a la producción de brotes.

Jayakrishna *et al.* (2011) obtuvieron la formación de brotes de *A. vera* con un medio MS que contenía 2,0 mg.L⁻¹ de BAP y para la formación de raíces utilizaron medio con AIB. Lograron en la fase de aclimatización un 75% de supervivencia en un sustrato compuesto por 1:1 de suelo y arena.

A pesar de estos resultados descritos en la literatura científica, se requieren nuevos estudios que permitan reducir los costos. A la vez que se obtengan resultados favorables en el desarrollo de las plantas durante el proceso de micropropagación. Además, hay que tener en cuenta que en nuestro país no se han realizado con anterioridad investigaciones en el cultivo de *A. vera*, de gran importancia en la industria farmacéutica y de cosméticos.

3. Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. La misma se llevó a cabo en el período comprendido entre Noviembre 2011 a marzo del 2013.

Procedimientos generales

Material vegetal

Como material vegetal inicial se emplearon hijuelos sanos de plantas adulta de *Aloe vera* con un tamaño comprendido entre 20 y 30 cm medidos desde la base del tallo hasta el extremo distal de la hoja más larga. El material vegetal fue colectado directamente del cultivo en condiciones de campo en la Granja Suburbana Finca "Sandino" del municipio de Remedios, Villa Clara, Cuba. Los hijuelos fueron separados individualmente y limpiados de resto de suelo. En el laboratorio el material vegetal se lavó con abundante agua corriente y jabón líquido comercial hasta quedar limpios. Luego se eliminó la parte fibrosa de la base del tallo, las raíces y las hojas externas de cada brote con ayuda de un bisturí. Se realizó un corte transversal del follaje, quedando reducida la altura del explante a 3,0 cm aproximadamente. Este se empleó en los experimentos de establecimiento *in vitro* (Figura 1).

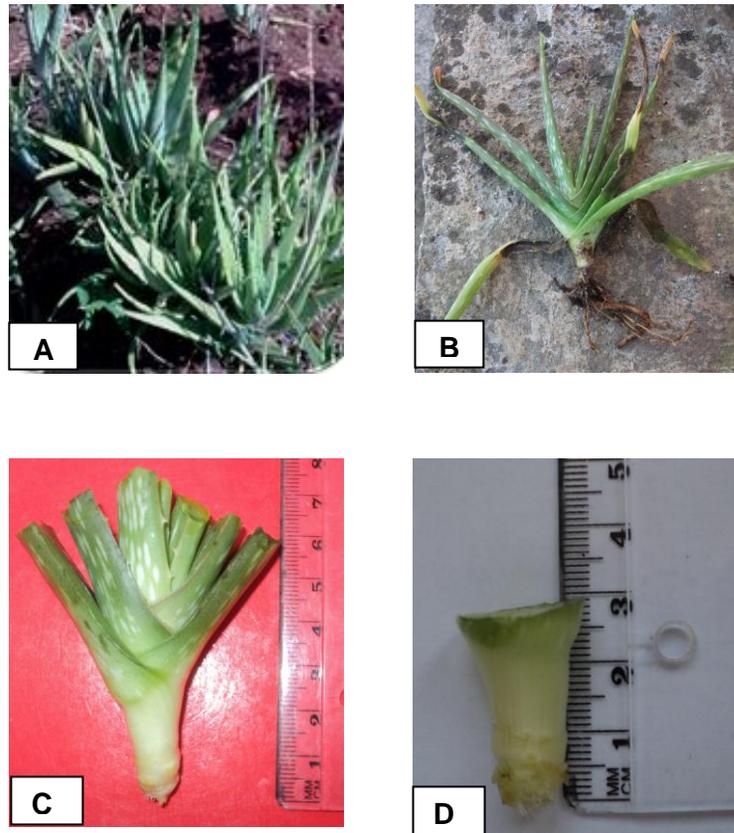


Figura 1. Material vegetal de *Aloe vera* L. para el establecimiento *in vitro*. A: Aspecto de las plantas en condiciones de campo B: Hijuelo tomado de una planta adulta. C: Aspecto del explante previo al lavado y corte final (corte de la parte fibrosa del tallo, las raíces y las hojas externas). D: Explante listo para la desinfección.

Todos los experimentos en laboratorio se realizaron en condiciones asépticas. La cristalería así como el instrumental de trabajo empleado se esterilizó en estufa a 180°C durante dos horas. Las pinzas y los bisturís se desinfectaron en incinerador eléctrico a 250°C durante 10 min. Las operaciones de transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal de marca FLUFRANCE de dos capacidades.

Medios de cultivo

Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave vertical a 120°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión. El tiempo de la esterilización estuvo en dependencia del volumen del medio de cultivo, según Sigma (1991).

En todos los experimentos se utilizó medio de cultivo semisólido y se emplearon frascos de cultivo de vidrio con capacidad de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo y tubos de ensayo (100x125 mm) que contenían 15 mL de medio de cultivo.

El medio basal estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), el cual a partir de este momento se nombrará como MS. Como agente gelificante se utilizó agar BioCen a razón de 7,0 g.L⁻¹. El pH de los medios de cultivo fueron ajustados a 5,7 previo a la esterilización por autoclave con KOH 0,5N y HCL 0,5N.

3.1 Establecimiento *in vitro*

3.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección

El presente experimento se realizó con el objetivo de definir la época del año propicia para la selección del explante de *A. vera* para su introducción *in vitro* y el efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección del material vegetal. Se tomaron los hijuelos provenientes del cultivo en condiciones de campo en la época de seca (diciembre-abril) y en la época de lluvia (mayo-noviembre). Se utilizaron 60 explantes por cada época del año.

Los explantes obtenidos, según se describe en los procedimientos generales se emplearon para evaluar tres concentraciones de NaClO (1,0; 2,0 y 3,0 %). Los mismos fueron colocados

en frascos de cultivo de 250 mL que contenían la solución desinfectante y permanecieron durante 15 min. en agitación en un agitador orbital marca Retomed a 100 RPM (Figura 2A). Una vez terminado el tiempo de desinfección, a los explantes se les realizaron tres enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril en cabina de flujo laminar. Luego se procedió a eliminar la superficie necrosada del explante producto de la desinfección (Figura 2B). Con auxilio de pinza y bisturí se les redujo el tamaño a 1,0 cm de altura y 0,5 cm de diámetro (Figura 2C). Estos fueron colocados en tubos de ensayo que contenía el medio de cultivo compuesto por sales MS, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 7,0 g.L⁻¹ de agar y 3,0 % de sacarosa (Anuree *et al.*, 2010). El experimento fue repetido tres veces.

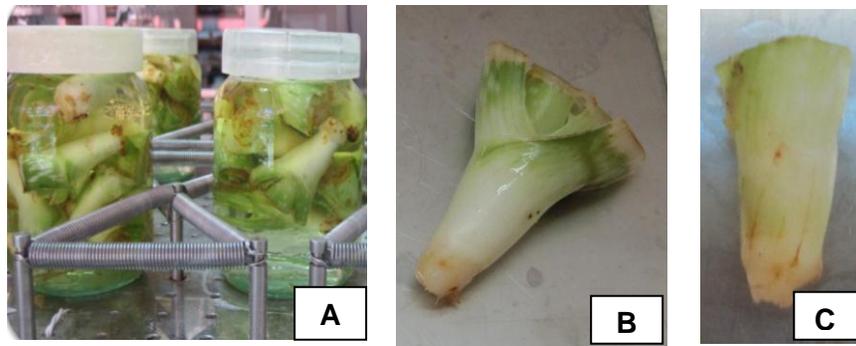


Figura 2: Procedimiento de desinfección realizado a los explantes de *Aloe vera*.L. A: Desinfección con NaClO en agitador orbital. B: Explante después de la desinfección y lavado con agua desionizada (3,0 cm de altura). C: Reducción del tamaño a 1,0 cm de altura y 0,5 cm de diámetro.

Los tubos de ensayos con los explantes fueron colocados en cámara de crecimiento a una temperatura de 27±2 °C con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de 30-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A las cuatro semanas de cultivo se evaluó el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (hongos, levaduras y bacterias) y el número de explantes necrosados. Para analizar los datos de los explantes libres de contaminantes y de los explantes necrosados se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18,0 sobre Windows.

3.2 Multiplicación *in vitro*

3.2.1 Manejo del explante

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del seccionado del explante (corte transversal y transversal-longitudinal parcial), sobre el coeficiente de multiplicación.

El corte transversal se realizó a una altura promedio de 1,0 cm desde la base del brote (Figura 3A) y el corte longitudinal-parcial se realizó desde la zona apical hasta la zona basal abarcando las tres cuartas partes de la altura del explante (Figura 3B).

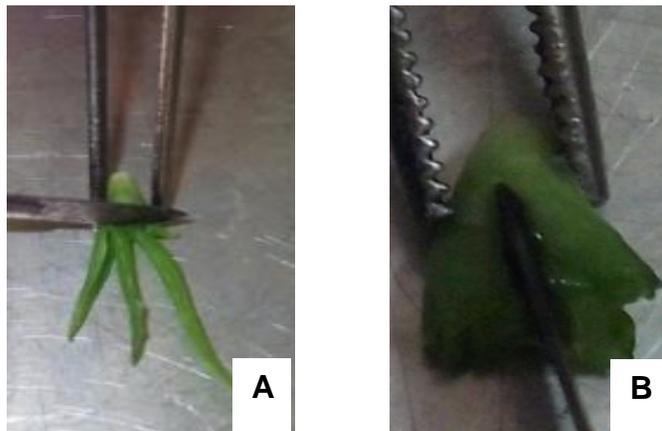


Figura 3. Seccionado del explante de *Aloe vera* L. A: corte transversal de la planta. B: corte transversal longitudinal-parcial.

Se colocaron cuatro explantes por frasco de cultivo de 250 mL de capacidad y se utilizaron 10 réplicas por tratamiento. Se utilizó el medio de cultivo empleado en el establecimiento constituido por sales MS, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen y 3,0 % de sacarosa y pH 7,5.

Los explantes fueron colocados en cámara de crecimiento de luz natural con una temperatura de 27± 2°C y un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad con un rango de intensidad luminosa entre 23,2 y 44,5 µmol.m⁻².s⁻¹ medido con un luxómetro EXTECH Light meter 401 025.

A los 45 días se evaluó la altura de los brotes (cm) determinada desde la base hasta la zona distal de la hoja más larga, número de brotes totales por explantes y se calculó el coeficiente de multiplicación por la fórmula:

$$CM = \text{No. brotes totales} / \text{No. brotes iniciales}$$

La comparación de los valores se realizó mediante una prueba no paramétrica de Mann Whitney previa comparación de los supuestos de normalidad utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18,0 sobre Windows.

3.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación *in vitro*

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la combinación del 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el ácido indol butírico (AIB) sobre la multiplicación *in vitro* de brotes de *A. vera*.

Basado en el análisis de la literatura internacional se estudiaron dos concentraciones de 6-BAP (2,0 y 8,0 mg.L⁻¹) combinadas con 0,5 de mg.L⁻¹ de AIB. Se utilizó un tratamiento

control sin regulador del crecimiento como se muestra en la Tabla I. Se emplearon 40 explantes por tratamiento.

Tabla I. Concentraciones de 6-BAP y AIB utilizadas en la multiplicación *in vitro* de *Aloe. vera* L.

Tratamiento	Concentración de reguladores del crecimiento (mg.L ⁻¹)	
	6-BAP	AIB
I	0	0
II	2,0	0
III	8,0	0
IV	0	0,5
V	2,0	0,5
VI	8,0	0,5

Las condiciones de crecimiento de los explantes fueron las descritas en el acápite anterior.

Se evaluó a los 45 días de cultivo, la altura de los brotes en cm determinada desde la base del explante hasta la zona distal de la hoja más larga, el número de brotes para calcular el coeficiente de multiplicación según el procedimiento empleado en el acápite 3.2.1 y el número de raíces formadas.

Para analizar los datos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18,0 sobre Windows.

Cuando se determinó el medio de cultivo de multiplicación donde se alcanzaron los mejores resultados para las variables descritas anteriormente, se realizaron nueve subcultivos del

material vegetal, cada 45 días, con el objetivo de evaluar el comportamiento del coeficiente de multiplicación.

3.3. Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plantas *in vitro* de *A. vera* en condiciones *ex vitro*.

Se utilizaron plantas que se encontraban en el noveno subcultivo en la fase de multiplicación que presentaron una altura entre 3,5 a 10,5 cm, con tres a doce hojas y raíces que podían ser de una hasta cinco.

Previo a la plantación en sustrato las plantas *in vitro* fueron separadas del medio de cultivo, lavadas con agua corriente e individualizadas. Posteriormente se plantaron según su tratamiento en bandejas de polipropileno negras de 28 alvéolos con una capacidad de 200 cm³ cada uno. Se estudiaron distintas combinaciones de sustratos como se muestra en la tabla II que fueron mezclados manualmente.

Tabla II. Combinaciones de sustratos para la aclimatización de *A. vera* en casa de cultivo.

Tratamiento	Compost de cachaza (%)	zeolita (%)
I	100	0
II	0	100
III	75	25
IV	50	50
V	25	75

Las características físico-químicas de los sustratos utilizados se muestran en las tablas III y IV. La zeolita utilizada fue producida por la Empresa GEOMINERA de Villa Clara. La cachaza fue obtenida del Complejo Agroindustrial Azucarero “Efraín Alfonso” de Villa Clara.

Tabla III. Características físico-química de la zeolita.

Composición química	%
Silicio SiO ₂	70,10
Aluminio (Al ₂ O ₃)	11,20
Hierro (Fe ₂ O ₃)	2,20
Hierro (FeO)	0,30
Magnesio (MgO)	0,60
Calcio (CaO)	4,50
Sodio (Na ₂ O)	1,50
Potasio (K ₂ O)	1,30
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,07
Agua (H ₂ O)	4,70
Composición mineral	%
Clinoptilolita	40,00
Modernita	40,00
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)	20,00
Propiedades físicas	Valor
Tamaño de la partícula	0,01-1,0 mm
Densidad (δ)	0,37 g.cm ⁻³
Densidad de la fase sólida (γ)	1,77 g.cm ⁻³
Porosidad total (PT)	80,59 % vol.

Tabla IV. Composición química de la cachaza.

Composición química	Valor
Calcio (CaO)	231,23 mg.L ⁻¹
Potasio (K ₂ O)	125,2 mg.L ⁻¹
Fósforo (P ₂ O ₅)	1008,80 mg.L ⁻¹
Materia orgánica	41,3 %
C.E	1,14 mol.cm ⁻³
pH	7,6

Una vez plantados, los brotes fueron colocados en condiciones de casa de cultivo para su aclimatación, a una temperatura promedio durante el día de 30± 2°C, humedad relativa del 70 % e intensidad luminosa que osciló entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida con un luxómetro EXTECH Light meter 401 025. Se utilizó un sistema de riego automatizado por micro-aspersión. La frecuencia de riego fue de 3,0 min de duración dos veces al día.

Se utilizaron por tratamiento 26 plantas para un total de 130 en todo el experimento.

La supervivencia, se definió como el número de plantas que sobrevivieron a los 15 días. Luego de pasar 60 días se evaluó la altura de las plantas (cm) desde la base hasta el extremo distal de la hoja más larga, el número de hojas, de hijos, de raíces y el largo de las últimas. Además se evaluó la coloración de los brotes para lo cual se utilizó el código hexadecimal de colores (<http://www.cwp.linnet.edu/cwis/cwp.html>).

Para el análisis de los datos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18,0 sobre Windows.

4. Resultados

4.1 Establecimiento *in vitro*

4.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección

La época del año y la concentración de NaClO influyeron decisivamente en el establecimiento de los explantes de *A. vera*. El tratamiento, que incluía la época de seca y 2,0 % de NaClO fue el que presentó el mayor valor de explantes libre de contaminación (Tabla V) con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos.

Tabla V. Efecto de la época del año y del NaClO en la desinfección de *Aloe vera* L. a las cuatro semanas de cultivo.

Tratamiento (Época del año-% NaClO)	No. de explantes desinfectados	Explantes libres de contaminación		Explantes necrosados	
		Medias	Rango promedio	Medias	Rango promedio
Seca-1,0%	60	40	291,83(b)	0	240,00(a)
Seca-2,0%	60	56	353,17(a)	0	240,00(a)
Seca-3,0%	60	48	322,50(b)	10	201,67(b)
Lluvia-1,0%	60	0	138,50(e)	0	240,00(a)
Lluvia-2,0%	60	21	219,00(c)	0	240,00(a)
Lluvia-3,0%	60	19	165,81(d)	9	227,06(b)

*Letras desiguales en las columnas difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/
Mann Whitney para $p \leq 0,05$.*

No. de explantes desinfectados corresponde a la sumatoria de los explantes utilizados en las tres repeticiones realizadas.

Se obtuvieron porcentajes de contaminación que oscilaron desde 6,66 % hasta 100 % dependiendo de la época del año y de la concentración del desinfectante. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los hijuelos fueron seleccionados en la época de seca independientemente de la concentración de NaClO utilizada. En estas condiciones se encontraron porcentajes de contaminación de 6,66 hasta 33,3 %. Mientras que en la época de lluvia los valores de porcentaje de contaminación oscilaron de 65 hasta 100 %. Los principales agentes contaminantes encontrados fueron: bacterias, hongos y levaduras, pero fueron los hongos los que causaron más afectaciones. Entre las bacterias se identificaron géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, mientras que los microorganismos fungosos identificados fueron *Fusarium*, *Nicrospora* y *Cladosporium*.

Para la variable número de explantes necrosados se observó que el NaClO a una concentración de 3,0 % afectó el material vegetal obteniéndose los mayores valores de explantes afectados en ambas épocas del año.

A las cuatro semanas de cultivo los explantes tenían de una a dos hojas formadas y en algunos se observaron nuevos brotes. Estos presentaron un color verde bosque (#228B22) según el código hexadecimal de colores (<http://www.cwp.linnet.edu/cwis/cwp.html>) (Figura 4).



Figura 4. Aspecto de los brotes de *Aloe vera* L. en el medio de establecimiento *in vitro* a las cuatro semanas de cultivo.

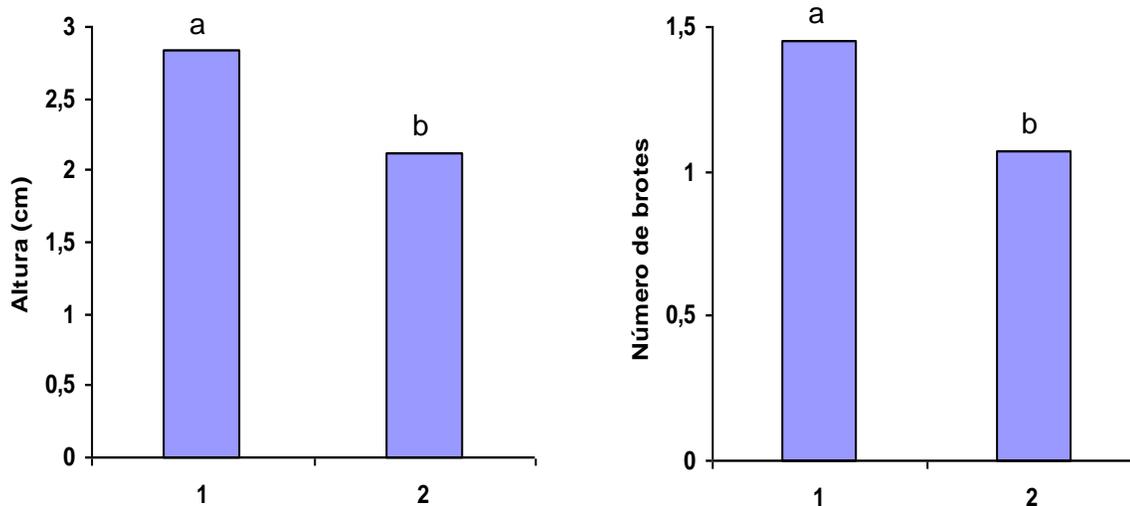
Se definió que la mejor época del año para el establecimiento de explantes en condiciones *in vitro* es la época de seca y que la concentración de NaClO más efectiva fue la de 2,0 %. Con esta combinación de factores se obtuvo el mayor número de explantes libres de contaminación y no se observaron explantes necrosados.

4.2 Multiplicación *in vitro*

4.2.1 Manejo del explante

El manejo del explante utilizado influyó en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Se encontraron diferencias significativas para las variables: número y altura de los brotes, cuando se compararon los dos cortes realizados a los explantes durante la fase de multiplicación.

Los mayores valores para la altura de los brotes se encontraron cuando se realizó el corte transversal en los explantes. Asimismo, el número de brotes fue mayor con este tipo de corte difiriendo significativamente con el corte transversal-longitudinal parcial (Figura 5).



Letras desiguales en cada gráfico difieren según prueba no paramétrica de Mann Whitney para $p \leq 0,05$.

Figura 5. Influencia del manejo del explante en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. a los 45 días de cultivo. 1- Corte transversal. 2- Corte transversal-longitudinal parcial.

En ambos tratamientos los brotes obtenidos presentaron una coloración verde bosque (#228B22) y el tejido era turgente sin síntomas de hiperhidricidad (Figura 6).

Cuando se calculó el coeficiente de multiplicación se encontraron valores promedios de 1,45 en el tratamiento donde se le realizó el corte transversal a los explantes, mientras que con el corte transversal-longitudinal parcial los explantes alcanzaron un coeficiente de 1,1.



Figura 6. Brotes de *Aloe vera* L. obtenidos con diferente manejo de los explantes a los 45 días de cultivo. 1-Corte transversal, 2-Corte transversal-longitudinal parcial.

Por los resultados obtenidos se determinó el corte transversal como el mejor manejo ya que favoreció el incremento del coeficiente de multiplicación.

4.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquinina en la multiplicación *in vitro*

Con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación de los brotes en la fase de multiplicación se emplearon en el medio de cultivo diferentes combinaciones de auxina-citoquinina. Las diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento estudiados influyeron en el desarrollo de los brotes.

La tabla VI muestra la influencia de las diferentes combinaciones estudiadas durante la multiplicación de los brotes de *A. vera*. Con la concentración de 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de AIB la altura de las plantas fue mayor a 5,0 cm como promedio y el número de brotes que se desarrollaron por explante fue superior a cuatro difiriendo significativamente con los demás tratamientos.

Tabla VI. Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. a los 45 días de cultivo.

Tratamiento 6-BAP-AIB (mg.L ⁻¹)	Altura (cm)		Número de brotes		Número de raíces	
	Media	Rango promedio	Media	Rango promedio	Media	Rango promedio
0-0	2,87	97,39 (d)	1,30	62,50 (c)	1,70	79,59 (d)
2,0-0	2,46	74,63 (de)	1,90	108,31 (b)	2,00	93,01 (cd)
8,0-0	2,35	67,04 (e)	2,12	121,50 (b)	1,60	75,60 (d)
0-0,5	3,19	121,88 (c)	1,97	104,06 (b)	3,78	171,79 (b)
2,0-0,5	5,19	207,48 (a)	4,80	207,99 (a)	4,15	190,09 (a)
8,0-0,5	3.90	157.57 (b)	2.20	122.06 (b)	2.53	114.65 (c)

Medias con letras desiguales en las columnas difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p \leq 0,05$.

La figura 7 muestra la morfología de los brotes obtenidos; estos presentaron una coloración verde bosque (#228B22) en sus hojas. Estas eran vigorosas y turgentes, sin síntomas de hiperhidricidad.

En todas las concentraciones de reguladores del crecimiento ensayadas las plantas desarrollaron el sistema radical. Es de destacar que las plantas obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación que contenían 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de AIB presentaron el mayor número de raíces cuando se compararon con los demás tratamientos.

Cuando se calculó el coeficiente de multiplicación de los explantes en los nueve subcultivos estudiados se observó que este se mantuvo estable, obteniéndose como valor máximo 5,1 (Figura 8).



Figura 7. Plantas de *Aloe vera* L. obtenidas a los 45 días de cultivo en los medios de cultivo de multiplicación. 1- sin reguladores del crecimiento; 2- $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,0\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB; 3- $8,0\text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,0\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB; 4- $0,0\text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIB; 5- $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIB; 6- $8,0\text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

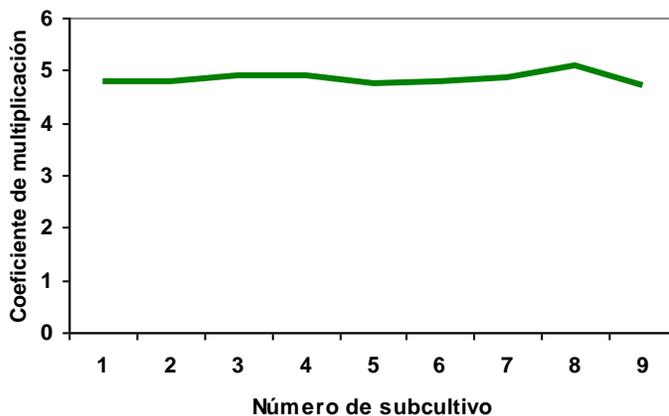


Figura 8. Coeficiente de multiplicación de *Aloe vera* L. obtenido en el medio de cultivo de multiplicación que contenía $2,0\text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB en los diferentes subcultivos estudiados.

Por los resultados alcanzados se determinó que las plantas obtenidas en el medio de cultivo compuesto por las sales MS, 3,0 % sacarosa, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 2,0mg.L⁻¹ de 6-BAP, 0,5 mg.L⁻¹ de AIB y 7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen, presentaron óptimas características para ser trasladadas directamente a la fase de aclimatización sin ser transferidas a la fase de enraizamiento.

4.3 Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas

Los resultados indicaron que el manejo realizado bajo condiciones de casa de cultivo garantizó una alta supervivencia de las plantas *in vitro*. En todos los tratamientos estudiados se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia. En el tratamiento que contenía 100 % de zeolita la supervivencia de las plantas fue del 96,1 %, mientras que en los restantes la supervivencia fue del 100 %.

A los 10 días de estar las plántulas en condiciones *ex vitro* se observó un cambio de coloración de verde bosque (#228B22) a madera fornida (#DEB887); comenzando a evidenciarse en el ápice y luego se extendió a toda la hoja; en la mayoría de los casos en las más viejas. Luego de 30 días las plantas adquirieron su coloración inicial, como se muestra en la figura 9.

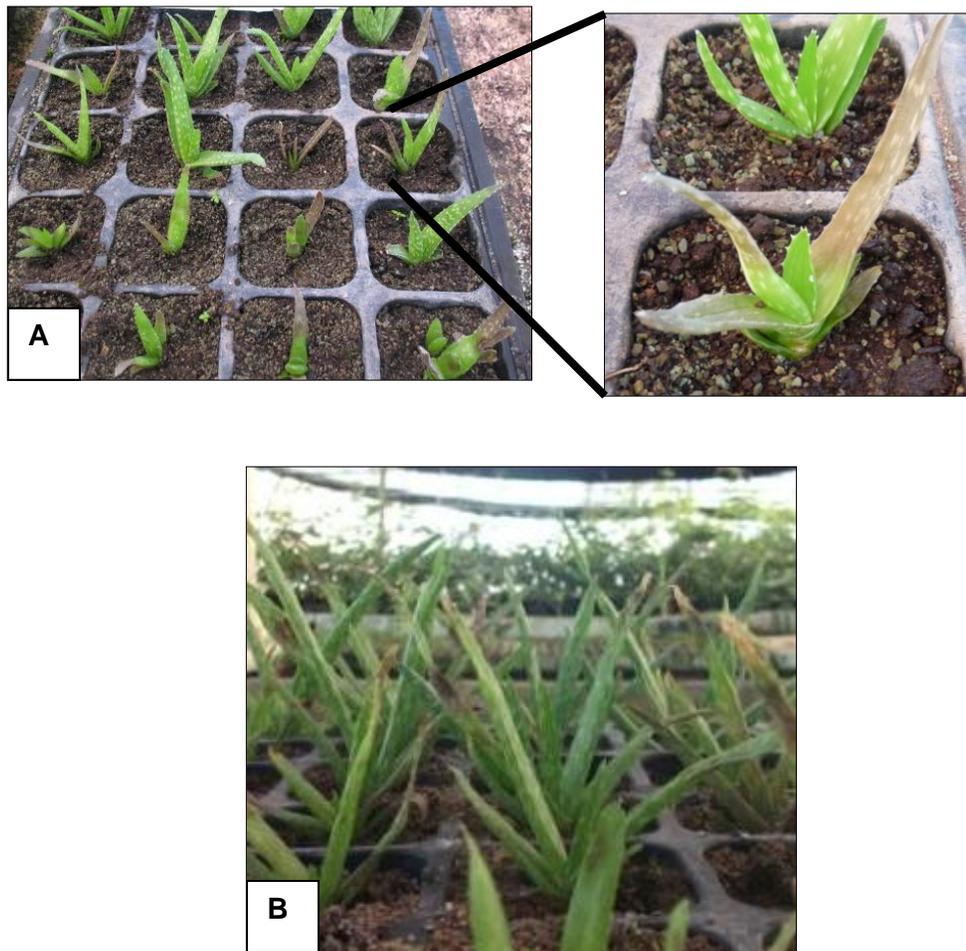


Figura 9. Plantas de *Aloe vera* L. en la casa de cultivo durante la fase de aclimatización A- a los 10 días de plantadas. B- a los 30 días de plantadas.

A los 60 días de aclimatizadas las plantas, en la casa de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron con el sustrato que contenía 100 % de Compost de cachaza.

En la variable número de hojas el mayor valor se obtuvo con el sustrato referido anteriormente encontrándose diferencias significativas respecto a los demás tratamientos estudiados (Tabla VII). Mientras que para la variable altura de la planta se encontró que solo en el control que contenía 100 % de zeolita se obtuvo el menor valor difiriendo significativamente con los tratamientos restantes.

Asimismo, se observó que el tipo de sustrato influyó en el desarrollo de las raíces. El mayor valor en el número de raíces desarrolladas se obtuvo en el sustrato que contenía 100 % de Compost de cachaza, difiriendo significativamente con el resto de los tratamientos. Por el contrario en la variable largo de las raíces no se encontraron diferencias significativas entre los controles (100 % de zeolita y 100 % de Compost de cachaza y el sustrato que contenía 75 % de Compost de cachaza y 25 % de zeolita.

El sustrato no tuvo influencia sobre el número de brotes emitidos por planta. Para esta variable no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos estudiados.

Tabla VII. Influencia del sustrato en el crecimiento de plantas de *Aloe vera* L. a los 60 días de ser aclimatizadas en casa de cultivo.

Tratamiento CC-Z (%)	Número de hojas		Altura		Número de raíces		Largo de las raíces	
	Media	RM	Media	RM	Media	RM	Media	RM
100-0	8,38	84,3(a)	9,02	78,6(a)	7,69	91,6(a)	6,15	80,6(a)
0-100	7,64	67,8(b)	6,50	39,74(b)	4,96	60,9(b)	4,60	70,4(a)
75-25	7,30	58,3(bc)	8,46	70,0(a)	4,76	59,4(bc)	4,21	63,2(ab)
50-50	7,26	56,1(bc)	7,99	61,6(a)	4,95	60,7(b)	3,37	49,6(b)
25-75	6,92	47,2(c)	7,94	63,9(a)	3,88	41,1(c)	3,24	49,2(b)

Medias con letras desiguales en las columnas difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p \leq 0,05$.

CC- Compost de cachaza Z- zeolita RM- Rango Medio

Con los resultados obtenidos se elaboró un protocolo de propagación *in vitro* para el cultivo de *A. vera* con el que se pueden obtener en 12 meses 12 612 plantas a partir de un hijo de plantas adultas en campo. Este protocolo se muestra a continuación:

_ Colectar, directamente desde el campo, hijos de 20 a 30 cm de largo medidos desde la base del tallo hasta el extremo distal de la hoja más larga de plantas adultas. Estos deben ser separados individualmente y limpiados de resto de suelo. La época del año para realizar esta colecta debe ser en época de seca (diciembre-abril).

_ En el laboratorio, lavar el material vegetal con abundante agua corriente y jabón líquido comercial hasta quedar limpios. Luego eliminar la parte fibrosa de la base del tallo, las raíces y las hojas externas de cada brote con ayuda de un bisturí. Realizar un corte transversal del follaje, quedando reducida la altura del explante a 3,0 cm aproximadamente.

_ Realizar una desinfección en el laboratorio con 3,0 % de hipoclorito de sodio durante 15 min. Luego realizar tres enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril en cabina de flujo laminar y proceder a eliminar la superficie necrosada del explante.

_ Establecer *in vitro* cortando los explantes a 1,0 cm de altura y 0,5 cm de diámetro y colocarlos en un medio de cultivo compuesto por sales MS, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen y 3,0 % de sacarosa. Colocarlos en cámara de crecimiento a una temperatura de 27±2°C con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad luminosa de 30-40 μmol m⁻².s⁻¹, por cuatro semanas.

_ Subcultivar los brotes realizando un corte transversal a los mismos y colocarlos en un medio de cultivo de multiplicación, que contenga sales MS, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, 3,0 % de sacarosa y

7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen. Colocarlos en cámara de crecimiento de luz natural con una temperatura de 27± 2°C y un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad con un rango de intensidad luminosa entre 23,2 y 44,5 μmol.m⁻².s⁻¹. Los subcultivos se deben realizar cada 45 días.

_ Aclimatizar en casa de cultivo plantas con presencia de sistema radical y altura mayor de 3,5 cm. Colocarlas en bandejas que contengan un sustrato compuesto por 100 % de Compost de cachaza y un riego por micro-aspersión dos veces al día por 3,0 min. Temperatura promedio durante el día de 30± 2°C, humedad relativa del 70 % e intensidad luminosa entre 224 y 457 μmol m⁻² s⁻¹. Mantenerlas en estas condiciones por 60 días.

En la figura 10 se muestra un esquema general de trabajo elaborado para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L.

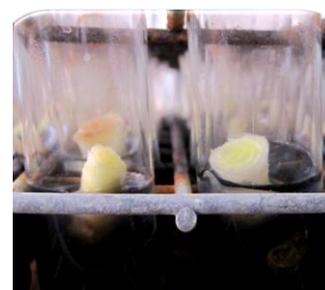
Establecimiento *in vitro*



Hijos de 20-30 cm de plantas de *A. vera* crecidas en condiciones de campo. Tomados en época de seca (diciembre-abril)



Desinfección
3,0 % de NaClO durante 15 min en agitación constante



Medio de cultivo con sales MS, 20 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 7,0 g.L⁻¹ de agar BIOCEN y 3,0 % de sacarosa.



Aclimatización *ex vitro*

Bandejas de plástico negras, con sustrato compuesto por 100% de Compost de cachaza; riego por micro-aspersión dos veces al día por cinco min. Temperatura promedio durante el día de 30± 2°C, humedad relativa del 70% e intensidad luminosa entre 224 y 457 μmol m⁻² s⁻¹ durante 60 días.



Medio de cultivo con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 3,0% sacarosa, 20 mg L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5g.L⁻¹ de carbón activado, 2,0mg L⁻¹ de 6-BAP, 0,5 mg L⁻¹ de AIB y 7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen. En cámara de crecimiento de luz natural con una temperatura de 27± 2°C y un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad con un rango de intensidad luminosa entre 23,2 y 44,5 μmol.m⁻².s⁻¹.



Corte transversal



Multiplicación *in vitro*

Figura 10. Esquema de propagación de *Aloe vera* L. por técnicas biotecnológicas.

5. Discusión

5.1 Establecimiento *in vitro*

5.1.1 Efecto de la época del año para la toma del explante y del hipoclorito de sodio (NaClO) en la desinfección

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un adecuado material de partida. Por lo que la fase preparativa de la propagación *in vitro* es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de propagación eficiente y repetible (Pérez, 1998; George, 2008). Esta etapa tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

La contaminación microbiana constituye uno de los problemas principales en esta fase. Incuestionablemente, la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta donadora (Pérez, 1998). Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debido a fallos en las técnicas o procedimientos.

Para disminuir los riesgos de contaminación en el establecimiento *in vitro* se han utilizado varios procedimientos que incluyen la selección negativa en condiciones de campo o invernadero. La aplicación de desinfectantes o mezclas de fungicidas y bactericidas en el material de plantación (estacas, secciones nodales, yemas, tubérculos, bulbos, rizomas) y su posterior trasplante en sustratos esterilizados. Crecimiento en condiciones higiénicas controladas (banco de plantas donantes) (Cura *et al.*, 2004; Albany *et al.*, 2006; Anusree *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011). Adicionalmente también se han aplicado fungicidas, bactericidas e insecticidas, combinados o por separado, durante todo el ciclo de crecimiento

de las plantas donadoras y se ha suspendido el riego por varios días antes de la toma del explante (García *et al.*, 2010).

Asimismo, algunos investigadores han evaluado la influencia de la época del año para tomar el material vegetal para introducir en condiciones *in vitro* (García *et al.*, 2010; Posada *et al.*, 2010). En *Aloe vera* L. no se han realizado investigaciones al respecto.

Los resultados del presente trabajo demostraron que la selección de la época del año para la toma del material vegetal a introducir en el laboratorio es un factor vital para la disminución de los porcentajes de contaminación en la fase de establecimiento en *A. vera*. Se obtuvieron los mejores resultados cuando los hijos fueron tomados en la época de seca. Con esto se garantizó porcentajes de contaminación menores que los obtenidos cuando el material vegetal fue colectado en época de lluvia. Similares resultados pero en otras especies de plantas fueron obtenidos por García *et al.* (2010) en *Bambusa vulgaris* y Posadas *et al.* (2010) en *Musa*. Por el contrario, Olmos *et al.* (2004) recomendaron coleccionar los explantes primarios durante la estación primaveral (abundantes lluvias) cuando las condiciones ambientales propiciaban la brotación de las yemas *in vitro* de forma activa.

La superficie de los tejidos de las plantas constituyen hábitats para los microorganismos, estos pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo la eliminación de los mismos. El número de bacterias y hongos en los tejidos aéreos pueden ser reducidos por el mantenimiento de los mismos en condiciones de baja humedad (Alvarado, 1998). En época de seca, donde predominan bajos % de humedad relativa, temperaturas bajas y escasas precipitaciones, el crecimiento de los microorganismos asociados a los tejidos (fundamentalmente bacterias y hongos) es inferior cuando se compara con el crecimiento en condiciones de altas temperaturas, elevado porcentaje de humedad relativa y abundantes precipitaciones (época de lluvia). En este

trabajo en el año 2011 los valores promedios brindados por la Estación Provincial de Meteorología de Villa Clara oscilaron en la época de seca (diciembre-abril), entre 27°C y 16,50°C para la temperatura. La humedad relativa se comportó al 76,2 %, mientras que las precipitaciones alcanzaron un valor de 21,38 mm. En la época de lluvia (mayo-noviembre) los valores de temperatura oscilaron entre 30°C y 22,9°C; la humedad relativa se comportó al 80,71 % para y las precipitaciones fueron de 199,87 mm. Estos valores contribuyeron a que los porcentajes de contaminación fueran mayores en la época de lluvia. En el presente trabajo los menores valores de contaminación se obtuvieron cuando los hijuelos fueron colectados en la época de seca independientemente de la concentración de NaClO utilizada. Se encontraron porcentajes de contaminación entre 6,66 hasta 33,3 %. Mientras que en la época de lluvia los porcentajes de contaminación oscilaron entre 65 hasta 100 %.

Arya *et al.* (2001), en el cultivo de *Dendrocalamus asper* J., destacaron la correlación existente entre las precipitaciones, humedad relativa y temperatura en el incremento del número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

González *et al.* (2005) evaluaron la influencia de la época del año en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. Estos autores señalaron, que la época del año en que se tomaron los explantes ejerció un marcado efecto en su respuesta morfogénica y bioquímica en los genotipos evaluados. Se comprobó que los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre resultaron más favorable dado un elevado porcentaje de formación de callos, bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica. Así como un mayor contenido de proteínas totales.

En la desinfección del material vegetal, los desinfectantes más comúnmente utilizados son el NaClO, hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y etanol. Los tres

primeros se emplean en concentraciones de 1,0 a 3,0 % en tiempos de 10 a 20 min. El alcohol se utiliza generalmente al 70 %.

En *Aloe arborescens* las semillas para ser germinadas fueron desinfectadas con una solución de 70 % de etanol por 1,0 min seguido de NaClO al 3,5 % suplementado con pocas gotas de Tween 20 por 10 min (Amoo *et al.*, 2012). Asimismo, Jayakrishna *et al.* (2011) en plantas crecidas en condiciones controladas encontraron mayor número de explantes libres de contaminación en *A. barbadensis* Miller cuando utilizaron 70 % de alcohol. Los autores refieren que los explantes fueron tratados con 0,1 % Tween20 en condiciones de agitación y luego lavados con agua destilada por 3,0-4,0 min. Más tarde, el material vegetal fue lavado con 0,25 % de NaClO, luego con agua destilada y finalmente con 0,1 % de bicloruro de mercurio (HgCl_2) para volver a sumergirlos en agua destilada por 5,0 min. De igual manera Anusree *et al.* (2010) utilizaron en la desinfección de explantes de *A. vera* el HgCl_2 con bajos índices de contaminación. Sin embargo es notable destacar que a pesar de la baja contaminación referida por los autores, el HgCl_2 es un producto muy tóxico, tanto para el explante como para la salud humana y no se elimina con facilidad (Marulanda *et al.*, 2005).

Como se puede apreciar en estas investigaciones el proceso de desinfección en especies de *Aloe* es complejo. Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociados a los tejidos de las plantas. Muchos de estos, son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. Por eso cuando se utiliza yemas para el establecimiento *in vitro* los porcentajes de contaminación son generalmente elevados y es necesario extremar las medidas para la disminución de la contaminación (Alvarado, 1998). Esto reafirma la importancia de las medidas tomadas en el

protocolo descrito en la presente investigación, relacionadas directamente con la selección de la época del año. Además las medidas relacionadas con la limpieza del material previo a la desinfección, aspecto que favoreció la reducción de contaminates.

En el presente trabajo el tratamiento, que incluía la época de seca y 2,0 % de NaClO fue el que presentó el mayor valor de explantes libre de contaminación. Estos resultados difieren con lo expuesto en ICFRE (2002) donde encontraron menor contaminación con 3,0 % de NaClO en *Bambusa*. El porcentaje de contaminación en este tratamiento fue de 6,66 %, valor inferior al referido por Albany *et al.* (2006) quienes reportaron un 14,2 % de contaminación al utilizar 2,0 % de NaClO cuando propagaron *in vitro* plantas de *A. vera*. De la misma forma, Matos *et al.* (2000) informaron un 24 % de contaminación al utilizar 5,0 % de NaClO, seguido de la aplicación de un producto antibacterial y antimicótico (Gerdex) por 20 min en el establecimiento *in vitro* de *A. vera*.

Para la variable número de explantes necrosados se observó que el NaClO a una concentración de 3,0 % afectó el material vegetal obteniéndose los mayores valores de explantes necrosados en ambas épocas del año. Estos resultados corroboran los presentados por Albany *et al.* (2006), en *A. vera*, quienes encontraron que a medida que aumentó la concentración de NaClO el ennegrecimiento de los explantes fue mayor. De la misma forma, Martínez (2007) obtuvo mayor mortalidad de los brotes de *Cedrela fissilis* al utilizar NaClO al 3,0 % por 30 minutos. Los autores concluyeron que tiempos prolongados de exposición de los explantes a las sustancias desinfectantes y en concentraciones elevadas, aunque controlaron de forma efectiva la contaminación microbiana *in vitro*, afectaron el porcentaje de brotación de dichos explantes ocasionando la muerte de los mismos debido al efecto fitotóxico de los tratamientos de desinfección.

Es evidente que el procedimiento de desinfección propuesto en esta investigación donde se utilizan dos estrategias (época del año para la colecta del material vegetal y el NaClO) contribuye a la disminución de los porcentajes de contaminación. Minimizando el tiempo necesario para el establecimiento *in vitro*, pues no es necesario el cultivo de plantas madres en casas de cultivo. Lo cual incrementa el tiempo en el esquema de propagación.

5.2 Fase de multiplicación *in vitro*

5.2.1 Manejo del explante

Unos de los factores que influyen en la multiplicación *in vitro* de los brotes es el manejo que se realiza al explante en el momento de los subcultivos. En varias especies de plantas se realizan seccionados totales o parciales de los explantes, así como el decapitado del mismo con la finalidad de inhibir la dominancia apical de la yema terminal y propiciar el desarrollo de las pequeñas yemas axilares (Orellana, 1998; George y Debergh, 2008).

En el cultivo de *Aloe vera* Albany *et al.* (2006) evaluaron el efecto del seccionamiento del explante en interacción con el estado físico del medio de cultivo (semi-sólido y líquido en agitación) y determinaron que solo el medio de cultivo líquido favoreció la altura de las plantas obtenidas *in vitro* sin aparente incremento en el número de brotes y que la interacción entre estos dos factores no resultó ser significativa. En contraposición, en el presente trabajo el manejo del explante utilizado influyó en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Se encontraron diferencias significativas para las variables: número y altura de los brotes y se obtuvo el mejor resultado con el corte transversal. Estos resultados pudieron deberse a que en el corte transversal - longitudinal parcial se indujo un declive en la actividad del tejido meristemático como consecuencia del daño al explante debido a los

cortes, disminuyendo la regeneración celular, el crecimiento y desarrollo de la planta (Marulanda e Isaza, 2004).

Por otra parte Martínez *et al.* (2009) en *Musa spp.* obtuvieron que en los tratamientos en los que se realizaba un corte longitudinal al centro del micro-cormo hasta el domo apical y sin cortar transversalmente el pseudotallo, incrementaron significativamente el número de brotes por explante en los tres cultivares, sin diferencias significativas entre ellos.

5.2.2 Efecto de la combinación de auxina-citoquininas en la multiplicación *in vitro*.

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la multiplicación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Jiménez *et al.*, 1998).

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas (Mrogisnski *et al.*, 2004).

En el presente trabajo las diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento estudiados influyeron en el desarrollo de los brotes encontrándose los mejores resultados cuando se utilizaron $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB. En este medio de cultivo se obtuvieron los mayores valores de altura de las plantas y número de brotes. Desde el punto de vista fisiológico, esta respuesta puede estar relacionada con la reducción de la dominancia apical que según Van Standen *et al.* (2008) se produce al adicionar determinadas concentraciones de citoquininas al medio de cultivo. Las citoquininas son reguladores del crecimiento eficaces para estimular la iniciación directa o indirecta de brotes.

Estos resultados son similares a los referidos por Jayakrishna *et al.* (2011) en *Aloe barbadensis* Miller, Arenas *et al.* (2003) en *Turbinicarpus pseudopectinatus* y Quiala *et al.* (2003) en *Pilosocereus robinii* quienes emplearon en los medios de cultivo 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP. Esta es en general la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares (Cantillo *et al.*, 2011).

En *A. polyphylla* el incremento de las concentraciones de Zeatina a 3,29 mg.L⁻¹ resultó en una disminución de la tasa de proliferación (Ivanova y Van Staden, 2010). Similares resultados fueron obtenidos en la presente investigación donde se disminuyó considerablemente la proliferación de brotes cuando la concentración de 6-BAP fue incrementada a 8,0 mg.L⁻¹.

A pesar del papel determinante de las citoquininas en esta fase, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes (Van Standen *et al.*, 2008). En este trabajo fue imprescindible la presencia de citoquinina y auxina en los medio de cultivo para producir una mayor proliferación de brotes. Los mejores resultados se obtuvieron cuando fue añadido al medio de cultivo 6-BAP y AIB. Uno de los posibles efectos de las auxinas en esta fase es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos. Similares resultados fueron obtenidos por Anusree *et al.* (2010) en *A. vera*.

En *Aloe* se han utilizado en los medios de cultivo otras citoquininas y auxinas para la multiplicación *in vitro*. La combinación entre el ANA y la Kinetina fue la más efectiva en esta fase en estudios realizados por Matos (2007). Mientras que otros autores han utilizado la combinación ANA-BA para micropropagar plantas de este género (Zeng *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2007) y AIB-BA (Aggarwal y Barna, 2004).

Por el contrario, en otros estudios se han obtenido mejores resultados utilizando 2,4-D-Kinetina (Natali *et al.*, 1990; Roy y Sarkar, 1991), AIB-BA (Cura *et al.*; 2004); ANA o AIB-TDZ (Velcheva *et al.*, 2010).

En la propagación de *A. chilensis* se demostró el efecto positivo de la sacarosa, del BA y del ANA en la formación de nuevas yemas (Zhihua *et al.*, 2004). Mientras que en *A. polyphylla* se utilizó para la multiplicación *in vitro* una mezcla de Zeatina-AIB (Ivanova y Van Staden, 2010). No obstante de todas las citoquininas utilizadas en los procesos de micropropagación que hemos referido el 6-BAP constituye la más empleada. Esto se debe a que la Zeatina es muy cara en el mercado y el TDZ induce variabilidad genética.

Es conocido que la presencia de determinadas concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo pueden inducir la obtención de plantas con síntomas de hiperhidricidad (Quiala, 2012). En el presente trabajo con ninguna de las concentraciones de 6-BAP utilizadas se encontraron plantas hiperhídricas.

Ivanova y Van Staden (2008, 2010) en *A. polyphylla* encontraron diferencias en el porcentaje de plantas con estas características en dependencia del agente gelificante utilizado. Cuando se empleó el agar en el medio de cultivo los porcentajes de plantas hiperhídricas fueron de 17,2 %, mientras que cuando utilizaron Gelrite los porcentajes se incrementaron a 64,7 %. En esta investigación se utilizó agar como gelificante en los medios de cultivo lo que pudiera ser el motivo de la no aparición de plantas con hiperhidricidad, fenómeno negativo en los procesos de propagación.

En todas las concentraciones de reguladores del crecimiento ensayadas las plantas desarrollaron el sistema radical. Esto pudo deberse a que el medio de cultivo contenía carbón activado y este compuesto tiene como efecto absorber diferentes sustancias

excretadas por la planta, las cuales inhiben la formación de raíces según su grado de toxicidad (Pan y Van Staden, 1998). En esta respuesta también pudo estar influyendo la concentración endógena de reguladores del crecimiento, fundamentalmente AIA. Ya que cuando el potencial osmótico del medio de cultivo se hace más negativo, se limita a la absorción de los componentes del medio de cultivo. Por lo que disminuye la disponibilidad de glucosa en los brotes y la presencia de auxina conjugada. Incrementándose la auxina activa en relación favorable con el alargamiento de la raíz (Jiménez, 2008).

Resultados similares obtuvieron Natali *et al.* (1990) y Matos (2007) en *A. vera*, Chukwujekwu *et al.* (2002) en *A. polyphylla*. Ya que el enraizamiento también ocurrió *in vitro* independientemente del medio de cultivo. Por el contrario en investigaciones realizadas por Roy y Sarkar (1991) y Albany *et al.* (2006) en *A. vera* se necesitó subcultivar brotes en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento para lograr la inducción de las raíces a los 21 días de cultivo. En otras investigaciones realizadas en esta especie obtuvieron la inducción de las raíces probando varios medios de cultivo como SH (Schenk and Hildebrandt 1972), B5 (Gamborg, 1968), MS (Murashige y Skoog 1962), con varias concentraciones de ANA, AIA, AIB y 2,4-D, encontrándose los mejores resultados con ANA. (Lee *et al.*, 2011) y AIA (Jayakrishna *et al.*, 2011).

Anusree *et al.* (2010) lograron el enraizamiento de plantas de *A. vera* cuando utilizaron en el medio de cultivo de enraizamiento AIB y ANA obteniendo solamente 80 % y 77 % de brotes enraizados respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en la presente investigación donde se alcanzó 100 %. Además es importante señalar que no fue necesaria una fase de enraizamiento, lo que trae como ventaja una reducción del ciclo de cultivo al lograr el enraizamiento a la vez que se multiplican los brotes.

Cuando se incrementó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo de 2,0 mg.L⁻¹ a 8,0 mg.L⁻¹ el número de raíces disminuyó, lo cual pudiera estar relacionado con el desbalance entre auxina /citoquininas que se produjo. Similares resultados fueron obtenidos por Cura *et al.* (2004), que encontraron que la citoquinina (BA) ejerció un efecto represor en la diferenciación de raíces en *A. vera*.

Las raíces formadas *in vitro* pueden favorecer el crecimiento inicial *ex vitro*, aunque la tasa de crecimiento óptima no ocurrirá hasta que las nuevas hojas y raíces se desarrollen en el ambiente *ex vitro* (Seelye *et al.*, 2003) La funcionalidad de las raíces quedó demostrada en este trabajo con la supervivencia de las plantas durante la aclimatización.

Número de subcultivos

En la literatura científica se refiere que la tasa de multiplicación de *Aloe vera* superior a dos yemas nuevas comienza a observarse a partir del cuarto subcultivo y solo desciende a partir del séptimo cuando el potencial genético disminuye por envejecimiento del tejido (Matos, 2007). No fue así en el presente trabajo, en donde la evaluación del coeficiente de multiplicación realizada a los brotes durante nueve subcultivos se mantuvo estable. Esto indica que es posible mantener durante nueve subcultivos brotes de *A. vera* en multiplicación sin afectar el coeficiente de multiplicación. Esta variable es una de las más importantes en los procesos de propagación.

5.3 Efecto del sustrato durante la aclimatización de las plántulas.

Dado que entre los factores que mayor influencia tienen en la aclimatización de las plantas *in vitro* se encuentran el tipo y composición del sustrato, se hace necesario prestar especial atención a su selección y uso (Morales *et al.*, 2009).

El mejor sustrato obtenido para la adaptación de las plantas de *A. vera* en condiciones *ex vitro* fue el que contenía 100 % de Compost de cachaza. Mostrando los mayores valores en cuatro de las cinco variables evaluadas. Este comportamiento de las plantas pudiera deberse a que la composición de este sustrato determina una adecuada retención de humedad y componentes químicos para proveer a la planta de agua y nutrientes. Al mismo tiempo ejerce una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical influenciando el estado nutricional y la translocación de agua en la planta (Morales *et al.*, 2009).

Quiala *et al.* (2003) alcanzaron similares resultados en la aclimatización, pero en la especie *Pilosocereus robinii*. Estos investigadores refirieron el empleo de un sustrato compuesto por 100 % de estiércol vacuno con más de ocho meses de descomposición con el que lograron un 91,4 % de supervivencia de las plantas. Contrario a esto Montalvo (2004) destacó el uso de una mezcla de 85 % de materia orgánica y 15 % de zeolita para la aclimatización de *Pilosocereus* sp.

En el presente trabajo se alcanzaron altos porcentajes de supervivencia en todos los tratamientos ensayados. Esta capacidad de las plántulas de *Aloe* para adaptarse a condiciones *ex vitro*, sin mayor inconveniente, pudo deberse a que las hojas de esta planta contienen más de 98,5 % de agua (Lee *et al.*, 2011) y esta especie posee un mecanismo fotosintético ácido crasuláceo y al pasar de la condición heterótrofa (*in vitro*) a autótrofa (*ex vitro*) posee mayor resistencia a la pérdida de agua por excesiva transpiración; lo cual se ha reportado como una de las principales causas de muerte de plantas en esta fase (Agramonte *et al.*, 1998).

Por otra parte es de destacar que las plantas *in vitro* se encontraban en cámaras de luz natural con un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad e intensidad luminosa entre 23,2 y 44,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Matos (2007) demostró que la capacidad de las plantas de *A. vera* para

resistir la aclimatización dependía del fotoperíodo. Las plantas que se multiplicaron con 12 h de luz, iluminadas con fluorescentes Gro-lux presentaron un 71 % de supervivencia, mientras que aquellas que se multiplicaron con 16 h luz mostraron solo un 50 % de supervivencia. Los porcentajes de supervivencias logrados en esta investigación (96,1 y 100 %) superaron los referidos por dicho autor.

Por el contrario otros resultados en investigaciones realizadas en *A. vera* han mostrado como mejor composición de sustrato: suelo de jardín, compost y arena a una proporción de 1:1:1 (Jayakrishna *et al.*, 2011); pero con este sustrato solamente alcanzaron 75 % de supervivencia.

Salazar *et al.* (2005) y Jiménez-Terry *et al.* (2010) señalaron que no solo el tipo de sustrato beneficia la aclimatización de las plantas *in vitro*, sino también la procedencia y calidad morfológica de las plantas favorecen la aclimatización en condiciones de casa de cultivo. En el presente trabajo con el protocolo de propagación *in vitro* desarrollado se obtuvieron plantas con excelentes condiciones fisiológicas y morfológicas para ser trasladadas a condiciones *ex vitro*. Esto contribuyó a los resultados obtenidos en esta fase.

Varios autores han referido la importancia de un adecuado tamaño y buena calidad de las plantas *in vitro* para su desarrollo durante la fase de aclimatización, porque de ellas depende la supervivencia, velocidad de crecimiento y producción final en la fase de campo (Díaz *et al.*, 2004; Gnanam, 2004).

Cambio de coloración

A los 10 días de plantadas las plantas en condiciones *ex vitro* se comenzó a observar un cambio de coloración de verde bosque (#228B22) a madera fornida (#DEB887) con mayor incidencia desde el ápice hasta la base de las hojas más viejas y luego de 30 días se

retornaba a la coloración a verde bosque (#228B22). Estos resultados pudieran estar relacionados con las características que presentan las hojas de las plantas obtenidas *in vitro*. Frecuentemente, las plantas se desarrollan en condiciones de alta humedad relativa y moderada intensidad luminosa, por lo que presentan menor cantidad de cera epicutelar o una alterada composición química de la misma y la cutícula no está totalmente desarrollada (Hazarika, 2003; Preece, 2008; Ziv y Chen, 2008). Igualmente, en algunas plantas los estomas formados son incapaces de completar el cierre estomático bajo las condiciones *ex vitro*, lo que conlleva a una pérdida excesiva de agua cuando son trasladadas a estas condiciones (George y Debergh, 2008). Sumado a esto esta especie es del tipo CAM o sea acumula mucha cantidad de ácidos en sus vacuolas. Al enfrentarse entonces a un estrés debido al cambio de condiciones de *in vitro* a *ex vitro*, los ácidos son trasladados a los cloroplastos transformando la clorofila a feofitina. Pasado los días, las plantas se adaptaron a su nuevo ambiente eliminándose el estrés y regresaron por tanto a su coloración inicial (com. pers.). Al mismo tiempo, pudo influir en este comportamiento las diferencias en la intensidad de la luz que incidía en la cámara de crecimiento *in vitro* y la casa de cultivo *ex vitro*. Las mediciones promedio de la intensidad de la luz en ambos lugares fueron de $33,85 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $345 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente; encontrándose una gran diferencia.

(com. pers.) Sinesio Torres García. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

6. Conclusiones

1. Se desarrolló un protocolo de propagación *in vitro* de *Aloe vera*. Con el cual se puede obtener, en 12 meses, 12 612 plantas a partir de un hijo de planta adulta en campo.
2. Se definió que la mejor época del año para el establecimiento de explantes en condiciones *in vitro* es la época de seca y que la concentración de NaClO más efectiva fue la de 2,0 %.
3. Realizar el corte transversal a los explantes como manejo durante la fase de multiplicación *in vitro*.
4. El mejor medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *A. vera* resultó ser el compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 3,0 % sacarosa, 20 mg. L⁻¹ de sulfato de adenina, 2,5 g.L⁻¹ de carbón activado, 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 0,5 mg.L⁻¹ de AIB y 7,0 g.L⁻¹ de agar BioCen.
5. Se definió como sustrato para la aclimatización *ex vitro* de *A. vera* el compuesto por 100% de Compost de cachaza lográndose plantas con mayor calidad.

7. Recomendaciones

1. Emplear el protocolo propuesto para la propagación *in vitro* de *Aloe vera*.
2. Continuar evaluando varios ciclos de multiplicación *in vitro* de las plantas para observar el comportamiento del coeficiente de multiplicación.
3. Evaluar el medio líquido como estrategias par la reducción de costos del protocolo propuesto.
4. Evaluar en condiciones de campo las potencialidades de las plantas obtenidas de *A. vera*.

Literatura Citada

Aggarwal, D. y K. S. Barna (2004): Tissue culture propagation of Elite plant of *Aloe vera* L.

Plant Biochemistry and Biotechnology (13):19-23.

Ahmed, S., A. H. Kabir, M. B. Ahmed, M. A. Razvy y S. Ganesan (2007): Development of rapid micropropagation method of *Aloe vera* L. **Sjemenarstvo** 24 (2): 121-128.

Agramonte D, Jiménez F y Dita M (1998): Aclimatización. En: Perez J (Ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología**. Instituto de Biotecnología de las Plantas. I edición. UCLV. Santa Clara, Cuba. pp. 193-206.

Albany, N., J. Vilchez, S. León de Sierralta, M. Molina, y P. Chacín (2006): Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. **Rev. Fac. Agron.** 23:213-222.

Alvarado, Y., Z. Sarría, N. Portal, Y. Martínez, M. Freire, E. Quiala, I. Herrera, M. Rodríguez y T. Pichardo (1998a): Control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de plantas por la aplicación del método de detección temprana. *En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos.* 39pp.

Alvarado, Y., M. Suárez, R. Triana; Z. Pérez; D. Agramonte, L. García, Z. Sarría, M. Acosta y H. Grillo (1998b): Control de la contaminación microbiana en la propagación masiva de plantas. *En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos.* pp. 39.

Amoo, S. O., A. O. Aremu y J. Van Staden (2012): *In vitro* regeneration, secondary metabolite production and antioxidante activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. **PCTOC** 111: 345-358.

Anusree Das, A., P. Mukherjee y T. Baran Jha (2010): High frequency micropropagation of *Aloe vera* L. Burm. F. as a low cost option towards commercialization. **PTCB** 20(1): 29-35.

Añez, B. y J. Vásquez (2005): Efecto de la densidad de población sobre el crecimiento y rendimiento d la zábila (*Aloe barbadensis* M.). **Rev. Fac. Agron.** 22:1-12.

Aragón, CE., M. Escalona, R. Rodríguez, MJ. Cañal, I. Capote, D. Pina y J. González-Olmedo (2010): Effect of sucrose, light, y carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In vitro Cell Dev. Biol. – Plant.** 46: 89–94.

Arenas, T., A. Tonatiuh, E. Monroy, R. Mata, B. Martín, A. Jiménez y G. Chávez (2003): Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* .XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/temcos1.htm>

Arvind K.B., J.S. Negi, V.K. Bisht y M.K. Bharti (2010): *In vitro* propagation of *Aloe vera*-A plant with medicinal properties. **Nature and Science.** 8(8): 174-176.

Arya, I, Satsangi R, Arya S (2001) Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. **J. Sus. For.** 14: 103–114.

Ascaño, A. y M. Quiñones (2003): El aloe en el tratamiento tópico de las úlceras postrombóticas. **Cir. Vas.** 1: 10-12.

Barcroft, A., A. Myskia y T. Reynolds (2003): Natures Silent Healer. **BAAM Publishing Ltd.** pp 334. London.

Bhalla R., K. Narasimhan, S. Swarup (2005): Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. **Plant Cell Rep** 24:562-571.

Bouman, H. y A. Tiekstra (2005): Adaptation of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. En: Hvoslef-Eide, A. K. y W. Preil (Eds). **Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation**. Springer. Dordrecht. pp. 493-505.

Cabrera, J.C., R. Iglesias, A. Gutiérrez, S. González, E. Diosdado, R. Gómez, D. Agramonte, H. Izquierdo y J. Gonzáles (1998): PECTIMORF: Un biorregulador cubano para la biotecnología vegetal. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Bioproductos. pp. 491-492.

Cantillo, R., J. Igarza y A. Ochoa (2011): Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. **Biot Vegt.** 11(1):3-13.

Capote, A. (1993): Estudio del comportamiento *in vitro* de cultivares cubanos de cebolla (*Allium cepa* L.) pp.35. [Tesis Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas]. La Habana: Universidad de La Habana.

Castillo, A. (2008): Propagación de plantas por cultivo *in vitro* : una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, p. 8.

Chakrabarty D, A. Subodh (2008): Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. **Acta Physiol. Plant.** 30: 325-331.

Chaudhuri, S. y U. Mukundan (2001): *Aloe vera* L. Micropropagation and Characterization of its gel. **Phytomorphology.** 51(2):155-157.

Chukwujerkwu J., C. Fennell y J. Van Staden (2002): South African Journal of Botany 68: 424-429.

Clemente, M. (1999): *In vitro* Culture (IVC) and Plant Conservation. En: Bowes B G (Ed) **A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation**, pp. 77-86. Manson Publishing, London.

Cura, A., H. Rey y L. Mroginski (2004): **Cultivo *in vitro* de tejidos para La regeneración de plantas de *Aloe vera* L. (*Liliaceae*)** Facultad de Cs. Agropecuarias-IBONE-UNNE.

Das, M. y A. Pal (2005): In Vitro regeneration of *Bambusa balcoa* Roxb. Factores affecting changes of morphogenetic competente in axillary buds. **Planta Cell Tissue and Organ Culture**. 81(1): 109-112.

Díaz, L. P., L. F. Medina, J. Latife, P .A. Digonzelli y S. B. Sosa (2004): Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. **RIA**. 33(2): 115-128.

Fujioka, S. y A. Sakurai (1997): Brassinosteroids. **Natural Product Reports** 19 (1): 1-10.

García, M. (2002) (activado 7 de marzo). <http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-aloe.html>.

García, Y., M. Freire, B. Pérez, O. Hurtado (2010): Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año. **Bioteología Vegetal** 10(3): 151 – 156.

García L. (2011): Embriogénesis somática del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquidos. Caracterización del proceso embriogénico.[Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Santa Clara. IBP.

García, M. (2002): *Aloe vera* L. Familia *Liliaceae* encontrado en <http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-aloe.html>

George, E. F. (2008): Plant Tissue Culture Procedure-Background. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** -3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp. 1-28.

George, E. F. y W. Davies (2008): Effects of the Physical Environment. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** -3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp. 423-464.

George E. F. y P. C. Debergh (2008): Micropropagation: Uses and Methods. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** -3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp. 29-64.

George E. F. y G-J. de Klerk (2008): The components of Plant Tissue Culture Media Macro- and Micro- Nutrients. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** -3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp. 65-114.

George, E., M. Somerset, U. Kingdom, M. Hall y G. Klerk (2008): **Plant Propagation by Tissue Culture** 3rd Edition. Springer. Dordrecht. 30 pp.

Gnanam, R. (2004): Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments.

Proceedings of Indian Academy.

Gómez, R. (1998): Embriogénesis somática. En: Pérez, J. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología**. 390 pp. Santa Clara: IBP.

González, M. C. y N. Santana (1988): Desinfección de semillas de arroz (*Oriza sativa* L.) para su siembra *in vitro*. **Cultivos Tropicales** 10 (2): 80-84.

González, M. E., M. M. Hernández, J. M. Mazorra, Y. Rodríguez y M. Cabrera (2005): Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfológica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. **Biotecnología Vegetal** 5 (2): 121 – 127.

Gui, YL, T. Y. Xu, S.R. Gu, S.Q. Lin, Z. Zhong, G.D. Sun y Q. Zhang (1990): Studies on stem tissue culture and organogenesis of *Aloe vera*. **Acta Bot. Sin.** 32: 606-610.

Hamman J. H. (2008): Composition and application of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**.13: 1599-1616.

Hazarika, B. (2003): Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**. 85: 1704-1712.

ICFRE (2002): Mass Propagation Protocol For Bamboos. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding Indian Council of Forestry Research and Education 12 pp.

Imery-Buiza, J. y H. Cequea-Ruiz (2001): Evaluación citogenética de la generación M1v2 de tetraploides experimentales en Sábila (*Aloe vera* L.). **Rev. Cient. UDO Agrícola**. 1: 29-33.

Imery-Buiza, J. y H. Cequea-Ruiz (2008): Autoincompatibilidad y Protandria en poblaciones naturalizadas de *Aloe vera* de la península de Araya. **Polibotánica**. (26): 113-125.

Ivanova, M. y J. Van Staden (2010): Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **PCTOC** 4: 10-20.

Ivanova, M. y J. Van Staden (2008): Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **PCTOC** 92: 227-231.

Jayakrishna, C., C. Karthik, S. Barathi, D. Kamalanathan y P. ArulSelvi (2011): *In vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Miller, a miracle herb. **Research in Plant Biology**. 1(5): 22-26.

Jasso D., D. Hernández, R. Rodríguez, J. Angulo (2005): Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Ind. Crop Prod.** 21: 81-87.

Jia Y, G. Zhao y J. Jia (2008): Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **J. Ethnopharmacol.** 20: 181-189.

Jiménez, E. (1998): Cultivo de ápices y meristemas. **Biología Vegetal**. 5: 45-46.

Jiménez, M. (2008): Propagación *in vitro* de *Tectona grandis* L. a partir de ápices de brotes axilares de plantas de origen epicórmico. [Tesis de Maestría en Ciencias]. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas.

Jiménez-Terry, F., D. Agramonte, M. Pérez, M. León, M. Rodríguez y Y. Alvarado (2010): Producción de minitubérculos de papa var. *Desirée* en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. **Biología vegetal** 10 (4): 219-228.

Karuppusamy, S. (2009): A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**. 3(13): 1222-1239.

Kevers, C., T. Franck, R. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar (2004): Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stressinduced change of physiological state. **PCTOC** 77:181–191.

Kozai T., R. Jeong, C. Kubota, Y. Murai (1995): Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet *in vitro*. **J. Japan Soc. Hort. Sci.** 64: 63 – 71.

Krikorian, A. D. (1991): Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca, M. N. y L. A. Mroginski (Eds.). **Cultivos de Tejidos en la Agricultura Tropical. Fundamentos y Aplicaciones**. pp. 41-77. Cali: CIAT.

Lee C.K., S. S. Han, Y. K. Mo, R. S. Kim, M. H. Chung, Y. I. Park, S. K. Lee y Y. S. Kim (1997): Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of accessory cell function of Langerhans cells by *Aloe vera* gel components. **Inmunopharmacology** 37(2-3): 153-162.

Lee, Y. S., T. J. Yang, S. U. Park, J. H. Baek, S. Q. Wu y K. B. Lim (2011): Induction and proliferation of adventitious roots *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. **POJ** 4(4): 190-194.

Liao Z., M. Chen, F. Tan, X. Sun y K. Tang. (2004): Micropropagation of endangered Aloe Chinese. **PCTOC** 76(1): 83-86.

López, J.T., R. K. Gómez, N. P. Montano, D. A. Reinaldo, A. C. Reyes, M. J. Cabrera, A. P. Santos, V. V. Mederos, M. P. Sasail y N. Roux (2012): New explant for somatic embryogenesis induction and plant regeneration from diploide banana (' Calcutta 4' *Musa* AA). **Biotecnología Vegetal** 12 (1): 25-31.

Lozoya, H. (1990): Embriogénesis somática. En: Cadmo, H. R. y V. M. Villalobos (Eds.). **Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales**. pp. 33-36. Roma:FAO.

Luckse, E., T. Dinkova y M. Ramos (1997): Aspectos bioquímicos-moleculares de la embriogénesis somática en plantas. **Ciencias Biológicas**. 27 (1-2-3): 13-17.

Machakova, I., E. Zazimalova y E. F. George (2008): Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (Eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture** Springer. Dordrecht. pp. 175-204.

Majada J. P., M. I. Sierra y R. Sánchez (2001): Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. **Sci. Hortic.** 87: 121–130.

Margara, J. (1988): **Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis.** Ed. Mundi-Prensa, pp. 232. Madrid.

Martínez, M. (2007): Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Cedrela fissilis* vellezo. Misiones, Argentina.

Martínez, S., M. Fontes, O. Pérez, M. Aday y L. García (2009): Efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátanos y bananos. **Bioteología Vegetal.** 9(3): 183-190.

Marulanda, M y L. Isaza (2004): Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. **Scientia et Technica.** 26: 193-197.

Marulanda, M., L. Gutiérrez, M. Márquez (2005): Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. **Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal.** 27(82): 5-15.

Matos, A., J. Molina y D. Acosta (2000): Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. **Ciencia** 8(3):280-284.

Matos A. (2007): Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (zábila). **Ciencia** 15(3): 319-330.

Medero, V., E. Padrón, S. Rodríguez, R. Gómez, M. García, J. López, J. Ventura, M. Martínez y M. Álvarez (1997): Regeneración por embriogénesis somática en clones cubanos de yuca. **Agrotecnia de Cuba** 27(1): 92-96.

Meyer y Standen (1991) Rapid in vitro propagation of *Aloe barbadensis* Mill., **Plant Cell, Tissue.**

Miranda J. y R. Williams (2007): Developmental influence of *in vitro* light quality and carbon dioxide on photochemical efficiency of PS II of strawberry leaves (*Fragaria xananassa*). **Journal of Applied Horticulture.** 9: 13-16.

Montalvo, G (2004) Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. [Tesis de maestría], pp. 53. Santa Clara, Cuba.

Morales, C., J. Corbera, V.M. Paneque, J. M. Calaña (2009): Efecto del sustrato en la alcimatización del cultivo de anturio (*Anthurium andreanum*). **Cultivos Tropicales.** 29(3): 75-79.

Morini S., M. Melai (2005): Net CO₂ exchange rate of *in vitro* plum cultures during growth evolution at different photosynthetic photon flux density. **Hort. Sci.** 105: 197-211.

Moshkov F. E., G.U. Novikova, M. A. Hall y E. F. George (2008): Plant Growth Regulator III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. En: George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (Eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture** Springer. Dordrecht. pp. 227-282.

Mroginski, L. A. (1991): Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. / W. M. Roca. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (Eds). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. pp. 10-12. Cali: CIAT.

Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flasxhland (2004): Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V., C. Rubinsten, y L. Mroginski (Eds) **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**, pp. 35-42, editorial INTA Buenos Aires.

Natali, L., I. Sánchez, A. Cavallini (1990:) *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. Micropropagation from vegetative meristems. **PCTOC** 20: 71-74.

Ndhlala A., S. Amoo, G. Stafford, J. Finnie, J. Staden (2009): Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe bar-berae*). **J. Ethnopharm.** 124: 404-408.

Nguyen, Q. y T. Kozai (2001): Growth of *in vitro* banana (*Musa spp.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In Vitro Cell. Dev. Biol Plant.** 37: 824-829.

Novak, F. J. (1980): Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. **Z. Pflanzenzuchtg.** 84: 250 - 260.

Orellana, P. (1998): Introducción a la propagación masiva. pp. 151-178. En: Pérez, J. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología**. Santa Clara: IBP.

Pan, M. J.; J. Van Staden (1998): Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. **Plant Growth Regul.** 29:135–141.

Pérez, J., Alvarado, Y., Gómez, R., Jimenéz, E., Orellana, P. (1998) Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Volumen 1, pp. 80-101.

Pierik, R. L. (1990): Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid. pp. 91-213.

Pina-Zambrano, H. (2005): El conglomerado zábila (*Aloe vera*) en el estado Falcón, Venezuela **Cuadernos de desarrollo rural** 53:37-57.

Posada, L., R. Gómez, B. Chong, M. Reyes y I. Bermudez (2010): Influencia de la época del año sobre la capacidad embriogénica de inflorescencias masculinas inmadura en banano cv. "Grande naine" (*Musa AAA*). **Biotecnología Vegetal** 10(4): 237-243.

Pospíšilová J., D. Synkova, D. Haisel y S. Semoradova (2007): Acclimatization of plantlets to *ex vitro* conditions: Effect of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. **Acta Hort.** 748: 29-38.

Pospíšilová J., J. Catsky y Z. Sesták (1997): Photosynthesis in plant cultivated in vitro. En: Passaraki, M. Hadbook of photosynthesis. **Kluwer Academic publishers. Netherland.**(ed.). pp. 525-540.

Preece, J. (2008): Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** .3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp. 1-28.

Quiala, E., G. Montalvo y J. Matos (2004): Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. **Biotecnología vegetal.** 4(4): 195-199.

Quiala, E., G. Montalvo, M. De Feria, J. Matos, R. Mederos, M. Chávez, A. Capote y N. Pérez (2003): Propagación *in vitro* de dos especies endémicas de Cuba en categoría de amenaza.

V Taller Internacional sobre recursos fitogenéticos. FITOGEN'2003. CD ROM. ISBN 959-246-089-2.

Quiala E. (2012): Efecto de la 6-Bencilaminopurina en la Morfoanatomía y la Fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. de cultivados en sistemas de inmersión temporal. [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas.

Quintana, M. (1995): Cultivo *in vitro* en *Vigna luteola*'SC-123. pp. 62. [Tesis Master en Biotecnología Vegetal]; Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Ramanayake, S., V. Meemaduma y T. Weerawardene (2006): *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* S.). **Sci. Hort.** 110, 109-113.

Rehm, S. y G. Espig (1991): The Cultivated Plants of the Tropics and Subtropics: Cultivation, economic value, utilization. Printed by; Priese GmbH, pp.552. Berlin. Germany.

Rincón, V. R. (1998): Micropropagación en Zábila (*Aloe barbadensis* Mill), a través de cultivo *in vitro* utilizando meristemas vegetativos. **Monografía**. pp. 35.

Rivero R., E. Rodríguez, R. Menéndez, J. Fernández, G. Del Barrio y M. González (2002): Obtención y caracterización preliminar de un extracto de *Aloe vera* L. con actividad antiviral. **Plant. Med.** 7(1): 32-38.

Roca, W. M. (1991): Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. **L. A. Mroginski**. En: Roca,W. M. y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. pp. 2-17. Cali: CIAT.

Rodríguez, M., M. Hernández, A. Gallardo, R. L. López y Y. Martínez (2004): Acción antiasmática del Aloe vera en pacientes. **Angiol. Cir. Vasc.** 4: 20-27.

Roig, J. y T. Mesa (1974): **Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba.** Instituto del Libro. La Habana. Cuba.pp. 699.

Roy, S. C. y A Sarkar (1991): *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. **Sci Hort** 47 (1-2):107-113.

Salazar, R, T. E. Vargas, E. García, M. Oropeza (2005): Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar «Monte Casino». **Interciencia.** 30(5): 295-299.

Sanchez, I., L. Natali y A. Cavallini (1988): *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. Morphogenetic ability and nuclear DNA content. **Plant Science.** 55: 53-59.

Sánchez, J. (2006): La sábila una planta milenaria de la salud. Revista científica versión on-line. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/106/ca106.pdf>.

Sauget J. (1946): **Flora de Cuba. Gimnospermas. Monocotiledoneas.** Cultural S. A. La Habana. Cuba. 1:306-307.

Seelye, J., G. Burge y E. Morgan (2003): Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society.** 53: 85-90.

Segura, J. (2008): Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Fundamentos de Fisiología vegetal. Segunda Edición. pp. 351-376. Ed Mac Graw.Hil.

Smith, S. M. y H. E. Street (1992): The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) a serially subcultured. **Ann. Bot.** 38:223-241.

Thorpe, T., C. Stasolla, E. C. Yeung, G. F.J. De Klerk, A. Roberts y E. F. George. (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects and Support Systems. En: George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (Eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture** Springer. Dordrecht. pp. 115-174.

Van Arnold, S. (2008) Embryogenesis somatic. En: George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (Eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture** Springer. Dordrecht. pp. 335-354.

Van Staden, J., E. Zazimalova y E. F. George (2008): Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (Eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture** Springer. Dordrecht. pp. 205-226.

Vasil, I. (1994): Automation in plant propagation. **Plant Cell Tiss and Organ Cult** 39(2): 105-108.

Vanisree M., H. S. Tsay (2007): Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 267-285.

Vega A., N. Ampuero, L. Díaz y R. Lemus (2005): El aloe (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. **Rev. Chil. Nutr.** 32:208-214.

Velchea, M., Z. Faltin, A. Vardi, U. Hanania, Y. Eshdat, O. Dgani, N. Sahar y A. Peri (2010): *Aloe vera* transformation : the role of Amberlite XAD-4 resin and antioxidants Turing selection and regeneration. **In Vitro Cell.Dev.Biol.** 46: 477-484.

Zeng S. y X. Peng (2000): **Zhong Yao Cal** 23(2): 63-65.

Zhihua, L., M. Chen, F. Tan, X. Sun y K. Tang (2004): Micropropagation of endangered *Aloe chinense*. **PCTOC** 76: 83-86.

Ziv, M. y J. Chen (2008): The Anatomy and Morphology of tissue Cultured Plants. En: George E.F., M.A. Hall, G-J. de Klerk (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture** .3rd. Edition. Vol.1 The Background. Springer. Dordrecht. pp: 465-478.

Zobayed S. M. A (2005): Ventilation in micropropagation. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Springer Eds.) pp.143-182.