



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA
DOCTORADOS EN CONJUNTO
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA AGRARIA



TESIS DOCTORAL

PROPAGACIÓN *in vitro* DE ZÁBILA (*Aloe barbadensis* Mill.) UTILIZANDO
RETARDANTES DEL CRECIMIENTO EN SISTEMAS DE INMERSIÓN
TEMPORAL

Doctorando:

Ing. Agr. Nilca Rosa Albany de Vilchez MSc.

DIRECTORES:

Dra. Alba Nava Fereira
Universidad del Zulia
VENEZUELA

Dr. Fernando Pliego Alfaro
Universidad de Málaga
ESPAÑA

TUTOR:

Dr. Luis Miguel Martín
Universidad de Córdoba
ESPAÑA

Maracaibo, Venezuela - Noviembre de 2015

TITULO: *Propagación in vitro de Zábila (Aloe Barbadensis Mill.) utilizando retardantes de crecimiento en sistemas de inmersión temporal*

AUTOR: *Nilca Rosa Albany de Vílchez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es


TÍTULO: Propagación *in vitro* de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.)
utilizando retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión
temporal

AUTOR: Nilca Rosa Albany de Vilchez

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

PROPAGACIÓN *in vitro* DE ZÁBILA (*Aloe barbadensis* Mill.) UTILIZANDO
RETARDANTES DEL CRECIMIENTO EN SISTEMAS DE INMERSIÓN
TEMPORAL



Nilca Rosa Albany de Vilchez

C.I.: V-9.627.989

Urbanización La Trinidad, calle 55, avenida 15 (Delicias),

Edificio Vértice, apartamento 1-I. Municipio Maracaibo, Estado Zulia.

Teléfonos: 58.261.742.80.97, 58.412.518.25.58

Correo electrónico: nalbany@fa.luz.edu.ve, nilca.albany@gmail.com



TÍTULO DE LA TESIS: Propagación *in vitro* de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) utilizando retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal

DOCTORANDO/A: Nilca Rosa Albany de Vilchez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS
(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis representa un avance considerable en el conocimiento de las bases fisiológicas del proceso de micropropagación de *Aloe barbadensis* Mill. (zábila), una especie cuyos productos son muy demandados por las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. Se han optimizado las condiciones de cultivo en medio líquido utilizando los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) con el retardante de crecimiento ancimidol. El ancimidol (ANC) promueve tanto la formación de conglomerados de brotes como la reducción del crecimiento longitudinal; por otra parte, el uso de cortos periodos de tiempo y baja frecuencia de inmersión en los RITA®, mejoraron el crecimiento de los brotes. Los análisis moleculares de las vitroplantas mediante RAPD (Amplificaciones Aleatorias de ADN Polimórfico) e ISSR (Secuencias Simples Internas Repetidas) determinaron que mientras una cuarta parte eran idénticas al material de partida, un porcentaje elevado mostraba un alto valor de similitud genética y bajo nivel de polimorfismo. La tesis está bien presentada y los resultados se han discutido adecuadamente. La calidad de la presente investigación viene avalada por las dos publicaciones, derivadas de ella, en revistas de ámbito internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral

Córdoba, 14 de Octubre de 2015

Firma del director

Fdo.: Fernando Pliego Alfaro





TÍTULO DE LA TESIS: Propagación *in vitro* de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) utilizando retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal

DOCTORANDO/A: Nilca Rosa Albany de Vilchez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral fueron alcanzados con el desarrollo de experimentos en área de cultivo de tejidos y en el área molecular, logrando un protocolo de multiplicación *in vitro* de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) utilizando Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) y el retardante de crecimiento ancimidol. Los resultados obtenidos se consideran un avance en los estudios para la micropropagación comercial de zábila que puedan ser de utilidad para satisfacer la creciente demanda de plantas necesaria para incrementar la superficie de siembra de este cultivo en Venezuela. El protocolo de multiplicación involucró el uso de baja concentración de ancimidol, aplicación de cortos periodos de tiempo y baja frecuencia de inmersión; así como, inóculo de 10 brotes en los RITA®. Además, los cambios morfológicos inducidos por el ancimidol en los brotes de zábila durante la fase de multiplicación fueron transitorios, retomando su crecimiento habitual en la fase de enraizamiento. Los estudios moleculares indicaron que hay estabilidad genética de las vitroplantas de zábila obtenidas en la micropropagación. La calidad de la investigación desarrollada en esta tesis doctoral esta soportada con la discusión de resultados que han generado dos publicaciones en revistas arbitradas, quedando aún información valiosa que puede ser presentada en futuras publicaciones, a desarrollarse con el apoyo de los directores de tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 14 de Octubre de 2015

Firma del director

Fdo.: Alba Ruth Nava Fereira



TÍTULO DE LA TESIS: Propagación *in vitro* de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) utilizando retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal

DOCTORANDO/A: Nilca Rosa Albany de Vilchez

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Esta tesis ha sido dirigida por dos reputados especialistas en el tema. Se plantean objetivos de interés para la mejora genética de *Aloe barbadensis* Mill., especie de interés farmacéutico, alimentario y para la industria cosmética, que han sido alcanzados. Para ello se ha combinado de forma adecuada diversas tecnologías: el uso de Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado, retardantes de crecimiento, y análisis moleculares.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de noviembre de 2015

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Luís Miguel Martín Martín

AGRADECIMIENTOS

Es indiscutible que la elaboración de una tesis doctoral, conlleva la suma del esfuerzo de muchas personas y hoy puedo dar constancia de ello. Han sido años de dedicación al trabajo experimental y meses agotadores en la redacción de artículos y del presente documento. En este largo tiempo me han acompañado seres maravillosos, que me ayudaron a llegar a la meta propuesta; por lo que siento un inmenso agradecimiento:

A DIOS... por cada día de esta vida, muy especialmente en este tiempo, en el que me ha bendecido con las personas escogidas para transitar juntos este camino.

A MI FAMILIA... por el amor, la paciencia y la comprensión demostrada en cada momento, y por la nobleza en perdonar muchas de mis ausencias.

A MIS DIRECTORES Y TUTORES... los Doctores: Fernando Pliego, Luís Martín y Enrique Sancho, porque a pesar de la distancia, supieron estar presente. A la Doctora Alba Nava, porque ha sido guía en la investigación y ejemplo de consagración al trabajo de forma ordenada, meticulosa y apasionada. A todos ustedes, gracias por el tiempo dedicado, los conocimientos transmitidos y los consejos brindados; que sólo los grandes maestros como ustedes pueden ofrecer.

A LA UNIVERSIDAD DE CÓRBOBA... por la oportunidad concedida para continuar con la formación académica, de prestigio y excelente calidad.

A LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA... por el financiamiento otorgado, en la justa medida de sus posibilidades, pero con la mejor de las intenciones.

A LOS COLEGAS, PROFESORES Y COLABORADORES... Especialmente a: Razzela, Zenaida, Silvia, Alfredo, Ana María, Irán, Leonardo, Miguel, Efrain, Gilberto y Drisnelda; gracias por su apoyo y valiosa colaboración durante la investigación.

A LOS AMIGOS... por las palabras de ánimo, los abrazos y las palmadas, que siempre agradeceré.

A JORGE... porque más que un colega, amigo o colaborador, ha sido mi compañero de vida, de estudio y de trabajo; y aunque divergentes en la investigación, él en la ruta embriogénica y yo en la organogénica, siempre llegamos juntos a la misma meta... Gracias por estar allí.

A TODOS, MIL GRACIAS... porque sumamos esfuerzos, restamos dificultades, multiplicamos las ganas y dividimos el éxito...

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	20
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Generalidades del cultivo de la zábila (<i>Aloe barbadensis</i> Mill.)	21
3.1.1. Taxonomía y morfología de la planta de zábila	22
3.1.2. Importancia y componentes de la zábila	24
3.1.3. Superficie cultivada y productos primarios de la zábila	26
3.1.4. Sistemas de propagación de la zábila	30
3.2. Micropropagación de la zábila.....	31
3.2.1. Limitaciones y estrategias de la micropropagación masiva	33
3.2.2. Sistemas de medios de cultivo líquidos	35
3.2.2.1. Sistemas de inmersión temporal: Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA [®]).....	38
3.2.3. Reguladores de crecimiento en los medios de cultivos para la multiplicación <i>in vitro</i>	45
3.2.3.1. Retardantes del crecimiento: Ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ).....	47
3.3. Estabilidad genética de las plantas micropropagadas	53
3.3.1. Técnicas moleculares para el estudio de la estabilidad genética.....	55
3.3.1.1. Amplificaciones Aleatorias de ADN Polimórfico (RAPD) y Secuencias Simples Internas Repetidas (ISSR).....	56

4. MATERIALES Y MÉTODOS	62
4.1. Propagación <i>in vitro</i> de zábila.....	62
4.1.1. Técnicas y procedimientos generales.....	64
4.1.2. Comparación del ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) como retardantes de crecimiento en la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila	66
4.1.3. Determinación de la concentración de ancimidol (ANC) en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila	68
4.1.4. Evaluación del tiempo y frecuencia de inmersión en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila con ANC.....	69
4.1.5. Efecto de la cantidad de brotes en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila con ANC	70
4.1.6. Estudio comparativo de variables morfológicas y de producción antes y después de la fase de enraizamiento utilizando brotes de zábila multiplicados con y sin ANC en los RITA [®]	71
4.1.7. Análisis estadístico en la propagación <i>in vitro</i> de zábila	73
4.2. Técnicas moleculares para el análisis de la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila	75
4.2.1. Extracción del ADN	75
4.2.1.1. Concentración, pureza e integridad del ADN extraído.....	80
4.2.2. Amplificación del ADN de zábila utilizando PCR-RAPD y PCR-ISSR.....	81
4.2.2.1. Visualización de los productos amplificados del ADN de zábila en la PCR-RAPD y PCR-ISSR	83
4.2.2.2. Registro y análisis de los productos amplificados del ADN de zábila.....	83
5. RESULTADOS Y DICUSIÓN	86
5.1. Propagación <i>in vitro</i> de zábila.....	86

5.1.1. Comparación del ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) como retardantes de crecimiento en la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila	86
5.1.2. Determinación de la concentración de ancimidol (ANC) en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila	93
5.1.3. Evaluación del tiempo y frecuencia de inmersión en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila con ANC.....	101
5.1.4. Efecto de la cantidad de brotes en los RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila con ANC	103
5.1.5. Estudio comparativo de variables morfológicas y de producción antes y después de la fase de enraizamiento utilizando brotes de zábila multiplicados con y sin ANC en los RITA [®]	108
5.2. Análisis molecular para determinar la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila.....	114
5.2.1. Extracción del ADN: Concentración, pureza e integridad del ADN de zábila	114
5.2.2. Caracterización de los patrones de bandeo de los productos de la PCR-RAPD y PCR-ISSR	115
5.2.3. Determinación de la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila con RADP e ISSR	122
6. CONCLUSIONES	133
7. RECOMENDACIONES	135
8. ÍNDICE DE REFERENCIAS	136
9. ÍNDICE DE CUADROS.....	158
10. ÍNDICE DE FIGURAS.....	161
11. LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	164

RESUMEN

Los productos extraídos de *Aloe barbadensis* Mill. (zábila) son altamente demandados por las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. En Venezuela, la propagación de zábila se realiza a través de hijuelos, una planta produce de tres a cuatro hijuelos por año, lo cual es insuficiente para desarrollar plantaciones comerciales. Aunque la propagación *in vitro* puede ser una alternativa interesante, su uso a nivel comercial está limitado por los costos de producción. El uso de Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) con retardantes de crecimiento (RC) en el medio de cultivo, está siendo considerada una opción de interés para aumentar la eficiencia del proceso de micropropagación. Con el propósito de obtener un protocolo optimizado para la multiplicación *in vitro* de zábila, se evaluaron los principales parámetros técnicos y biológicos en RITA[®] utilizando RC. Así, se diseñaron una serie de experimentos para evaluar el efecto de los RC, el tiempo y la frecuencia de inmersión, cantidad de brotes inoculados por recipiente y finalmente, el efecto residual del RC en la fase de enraizamiento. El ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) promovieron tanto la formación de conglomerados de brotes como la reducción del crecimiento longitudinal, aunque se seleccionó el ANC porque mostró el mayor número de conglomerados (0,73) y de brotes (4,13). El uso de cortos periodos de tiempo y baja frecuencia de inmersión en los RITA[®], mejoraron el crecimiento de los brotes, siendo el tiempo de inmersión el factor determinante para aumentar el número de éstos. Asimismo, un inóculo de 10 brotes favoreció tanto el crecimiento como el número de brotes obtenidos (8,92). Por otra parte, se demostró que los cambios morfológicos inducidos por el ANC, en los brotes de zábila en la fase de multiplicación eran transitorios, retomando su crecimiento habitual durante la fase de enraizamiento.

La estabilidad genética de las vitroplantas obtenidas durante el proceso de micropropagación se determinó utilizando RAPD (Amplificaciones Aleatorias de ADN Polimórfico) e ISSR (Secuencias Simples Internas Repetidas). Estos análisis moleculares determinaron que el 29 % de las vitroplantas fueron idénticas al material parental y el 71 % mostraron alto valor de similitud genética (95 %) y bajo nivel de polimorfismo (2,05 %); estas diferencias pudieran no estar relacionadas con cambios importantes en el fenotipo de las plantas micropropagadas. Los resultados de esta investigación suponen un avance en los estudios para la micropropagación comercial de zábila utilizando los RITA[®] y el ANC, y pueden ser de utilidad para satisfacer la creciente demanda de plantas necesaria para incrementar la superficie cultivada en Venezuela.

ABSTRACT

The products extracted from *Aloe barbadensis* Mill. (aloe) are highly demanded by pharmaceutical, cosmetic and food industries. In Venezuela, aloe propagation is carried out by offshoots; a single plant produces three to four offshoots every year, which is not sufficient to establish commercial plantations. Although *in vitro* propagation can be an interesting alternative, its commercial use is limited due to production costs. The use of recipient for automated temporary immersion (RITA[®]) with growth retardants (GR) in culture media has been considered an interesting option to increase the efficiency of micropropagation. With the purpose to obtain an optimized protocol for *in vitro* multiplication of aloe, the main technical and biological parameters in RITA[®] using GR were evaluated. Thus, several experiments were designed to evaluate the effect of GR, the immersion time and frequency, the amount of inoculated shoot by recipient, and finally the residual effect of GR in the rooting phase. The ancymidol (ANC) and paclobutrazol (PBZ) induced shoot cluster formation and reduced longitudinal growth; although ANC was selected because showed higher number of both, clusters (0.73) and number of shoot (4.13). The use of short periods of time and low immersion frequency in RITA[®] improved the growth of shoot, being the immersion time the critical factor to increase shoot number. In addition, an inoculum of 10 shoots promoted not only the growth but also the shoot number (8.92). On the other hand, it was demonstrated that the morphological changes induced by ANC in aloe shoots during the multiplication phase were temporary, habitual growth was recovered during the rooting phase.

The genetic stability of vitroplant obtained by the micropropagation process was estimated using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). These molecular analyses showed that 29 % of vitroplants were identical to progenitor

plant, and 71 % presented high value (95 %) of genetic similarity and low level of polymorphism (2.05 %); those differences might not be related to important changes in the phenotype of micropropagated plants. These research results might be an advanced approach for aloe commercial micropropagation studies using RITA[®] and ANC, which could be useful to satisfy the growing demand of plants required to increase the aloe production area in Venezuela.

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Aloe barbadensis* Mill. comúnmente conocida con el nombre de sábila, es la más destacada de las 575 especies del género *Aloe*, debido a la gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios que producen sus hojas y que constituyen la materia prima de muchos productos de alta demanda en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia a nivel mundial. Para satisfacer los requerimientos de materia prima en estas industrias es necesario incrementar la productividad del cultivo, aumentando la superficie sembrada o la producción de sábila.

Esta especie es cultivada mundialmente en el trópico americano y africano, algunos países de la costa mediterránea europea y en la India. Sin embargo, las plantaciones más importantes se encuentran en América y el sur de Europa (Moghaddasi y Kumar, 2011; Díaz y Ávila, 2002). En Venezuela un 40 % de la superficie posee características de clima y suelo favorables para el desarrollo de la sábila, la cual es poco apta para el crecimiento de otros cultivos (Franco *et al.*, 2012).

Los productores venezolanos comienzan a mostrar mayor interés en el cultivo de la sábila a partir del año 2004, y es para el año 2007 cuando el Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras de Venezuela (2007) incluye a la sábila entre los cultivos de importancia para el desarrollo agrícola del país, generando programas de financiamiento para incentivar la siembra de este cultivo en varios estados de Venezuela. No obstante, el sistema de reproducción de la planta de sábila por vía sexual está limitado para la propagación masiva, por la alta esterilidad masculina que presentan sus flores, haciendo que la propagación convencional de esta planta se realice de manera asexual mediante la separación de brotes laterales o hijuelos emitidos por la planta madre; sin embargo, este sistema es considerado

poco eficiente para la producción masiva de plantas, ya que posee una tasa de reproducción baja y lenta, generando plantas de poca uniformidad y con una alta probabilidad de diseminación de plagas y enfermedades.

Las limitaciones de la propagación convencional de zábila han sido superadas por varias metodologías de propagación *in vitro* (Albany *et al.*, 2015; Molsaghi *et al.*; 2014; Lee *et al.*, 2013; Rathore *et al.*, 2011; Albany *et al.*, 2006; Baksha *et al.*, 2005) que han permitido obtener mayor cantidad de plantas uniformes, libres de enfermedades, en menor tiempo y espacio.

La micropropagación de zábila está ampliamente restringida por los altos costos de producción, debido principalmente al elevado número de operaciones manuales y al valor del agente gelificante de los medios de cultivo. El empleo de medios de cultivo líquidos en la micropropagación de plantas se ha considerado como una solución (Preil, 2005), ya que se disminuyen los costos de los medios, se facilitan las operaciones manuales y se permite la automatización de los procesos *in vitro*, lo que reduce la mano de obra y los costos finales de producción. Sin embargo, cuando se han utilizado los medios de cultivo líquido con poca aireación y/o agitación, en la propagación *in vitro* de algunas especies, se han observado ciertos desórdenes fisiológicos en el material vegetal.

Nuevas tecnologías *in vitro* basadas en el contacto intermitente del medio de cultivo con los tejidos u órganos por un corto período de tiempo, denominadas **Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)**, surgen para evitar los efectos negativos de los medios de cultivo líquidos (Berthouly y Etienne, 2005; Alvard *et al.*, 1993), además de incrementar la eficiencia biológica y productiva de los cultivos *in vitro*, en comparación con otros sistemas de micropropagación.

Los SIT tipo RITA[®] (**R**ecipiente de **I**nmersión **T**emporal **A**utomatizados) han sido utilizados exitosamente para la propagación *in vitro* de varias especies de interés agrícola, ornamental y medicinal (Berthouly y Etienne, 2005), siendo el más utilizado para la micropropagación de plantas (Georgiev *et al.*, 2014) por su diseño compacto y de simple funcionamiento, que facilita la automatización de los procesos y por brindar mejores condiciones para desarrollo de los cultivos *in vitro*. Aunque los RITA[®] ofrecen una serie de ventajas en la micropropagación de zábila, se ha observado mayor crecimiento longitudinal de los brotes (Albany *et al.*, 2015; Vilchez *et al.*, 2007), lo que dificulta la manipulación de los explantes, reduce el volumen de los RITA[®] y merma la capacidad de brotación por efecto de la dominancia apical. Además, gran parte de ese crecimiento excesivo de los brotes es eliminado para la siembra del siguiente ciclo de cultivo. Por lo tanto, es necesario explorar alternativas para incrementar la cantidad de brotes y controlar el crecimiento longitudinal de los mismos, en la fase de multiplicación *in vitro*.

Para aumentar la cantidad de brotes en la multiplicación *in vitro* es esencial optimizar los parámetros técnicos de los RITA[®], destacándose el tiempo y la frecuencia de inmersión como los más críticos del sistema, además de la cantidad de brotes sembrados y el volumen de medio de cultivo en cada RITA[®] (Berthouly y Etienne, 2005; Etienne y Berthouly, 2002).

Por otra parte, para reducir el crecimiento en longitud de los brotes de una manera controlada, sin cambiar los patrones de desarrollo de los cultivos, se ha recomendado el uso de **R**etardantes de **C**recimiento (RC) en los medios de cultivo líquidos en la fase de multiplicación (Ospina *et al.*, 2005). Varios RC han sido utilizados en la micropropagación de plantas, resultando el ancimidol (ANC) y el paclobutrazol (PBZ) los más

exitosos en algunos géneros (Bello *et al.*, 2010; Te-chato *et al.*, 2009; Thakur *et al.*, 2006; Albany *et al.*, 2005^a; Meneses *et al.*, 2000; Opatrná *et al.*, 1997; Ziv y Ariel, 1991; Smith *et al.*, 1991; Ziv, 1990).

El ANC y PBZ son catalogados como inhibidores de las enzimas mono-oxigenasas en la ruta biosintética de las giberelinas (Rademacher, 2000), por lo que al disminuir sus niveles, se observa una reducción en la altura de la planta y en la longitud de las hojas y en algunos casos, un engrosamiento de los tallos y de las hojas. Estos cambios han sido considerados transitorios (Sarkar *et al.*, 2001), ya que los brotes retoman su crecimiento y forma habitual, una vez que se transfieren a medios exentos de RC (Bello *et al.*, 2010).

En general el cultivo *in vitro* puede ser muy estresante para las células vegetales y puede involucrar cambios genéticos durante los diversos procesos de regeneración, que podrían resultar en plantas diferentes a la original. Por otro lado, en el proceso de masificación, generalmente se incrementa la frecuencia de variación genética entre las plantas, por lo que mantener plantas fieles a su tipo es un requisito indispensable para el establecimiento de cualquier metodología de propagación *in vitro* con fines comerciales. Razón por la cual, el estudio de la estabilidad genética en la población de plantas regeneradas es esencial para garantizar la identidad de las plantas y a su vez validar la eficiencia del sistema de regeneración (Rathore *et al.*, 2011).

Los estudios de estabilidad e inestabilidad genética de plantas *in vitro*, frecuentemente se realizan con marcadores moleculares obtenidos de la amplificación de segmentos aleatorios del ADN polimórfico (RAPD) y de las secuencias internas simples repetidas (ISSR), ya que son técnicas sencillas, rápidas, rentables, altamente discriminativas y fiables; además no es necesario conocer el genoma de

la especie y sólo se requiere una pequeña cantidad de ADN porque utilizan la **R**eacción en **C**adena de la **P**olimerasa (PCR).

2. OBJETIVOS

Para el desarrollo de una metodología eficiente de multiplicación *in vitro* de zábila en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) con retardantes del crecimiento en los medios de cultivo se establecieron los siguientes objetivos:

1. Evaluar los principales parámetros técnicos y biológicos, y el uso de retardantes del crecimiento en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®].

2. Determinar la estabilidad genética de las vitroplantas de *Aloe barbadensis* Mill. obtenidas de la multiplicación *in vitro* con retardante del crecimiento en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®], a través de análisis moleculares con RAPD e ISSR.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades del cultivo de la zábila (*Aloe barbadensis* Mill.)

El género *Aloe* agrupa aproximadamente 575 especies nativas de la flora del continente africano, de la Península Arábiga, de la isla Socotra y de Madagascar, así como de las islas Seychelles, Mascareñas y Comoras en el Océano Índico. Varias especies del género *Aloe* se reconocen como flora invasora o naturalizada del Mediterráneo, la India, Australia, Caribe, América del Norte y del Sur (Grace y Klopper, 2014).

El origen geográfico de la zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) es considerado aún incierto (Guillot *et al.*, 2008; Guillot y Van Der Meer, 2005), quizás por su amplia distribución en las regiones cálidas alrededor del mundo (Bozzi *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos autores coinciden en que el origen geográfico de la zábila es África; así, Vega *et al.* (2005) afirman que es originaria de la península de Arabia, Xinqi y Gilbert (2000) la ubican en África tropical e incluyen Madagascar y zona tropical de Arabia; Meyer y Staden (1991) alegan que es nativa del Norte de África y Añez y Vásquez, (2005) del Sur de África, mientras que Badar *et al.* (2013) y Zakia *et al.* (2013) sitúan su origen en el Este y Sur de África.

Al igual que muchas plantas suculentas del género *Aloe*, la zábila ha sido recolectada y utilizada desde la antigüedad; fue señalada como "lirio del desierto" en África o "planta de la inmortalidad" en el antiguo Egipto (Badar *et al.*, 2013) y denominada "planta bíblica" por la cantidad de veces que se menciona en el Antiguo y Nuevo testamento (Carpano *et al.*, 2009), en el que curiosamente se relata que Nicodemo utilizó una mezcla de zábila y mirra para embalsamar a Jesús; incluso

se afirma que la belleza de Cleopatra era atribuída al uso de la zábila (Moghaddasi y Kumar, 2011).

Muchas de las especies del género *Aloe* son consideradas plantas medicinales (Guillot *et al.*, 2008) gracias a las diversas sustancias que producen sus hojas (Añez y Vásquez, 2005). La especie *A. barbadensis* es la más destacada de este género ya que produce una gran cantidad de metabolitos primarios como la aloína y también secundarios, lo cual ha generado interés en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética (Campestrini *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2002), por lo que es cultivada y comercializada en la horticultura del presente.

3.1.1. Taxonomía y morfología de la planta de zábila

Durante las últimas décadas la clasificación botánica de la planta de zábila ha sido muy compleja y controvertida, sufriendo varias reclasificaciones, desde la ubicación taxonómica y creación de una nueva familia, hasta la definición de la especie.

Guillot *et al.* (2008), destacan que la familia Aloaceae fue situada durante mucho tiempo como una tribu de la familia Liliaceae denominada "Aloaeae"; sin embargo, estos investigadores concluyen en sus estudios que la familia Aloaceae debe ser tratada como una familia distinta dentro del orden Liliales. Guillot y Van Der Meer (2005) describen un grupo de taxones de la familia Aloaceae e incluyen definitivamente a la planta de zábila dentro de esta familia, aunque posteriormente Moghaddasi y Kumar (2011) y Singh *et al.* (2010), la incluyen dentro de la familia Asphodelaceae. Recientemente en el año 2014, la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), propuso que se reclasifique al género *Aloe* L. en la familia Xanthorrhoeaceae subfamilia

Asphodeloideae. Sin embargo, aclaran que es correcto seguir utilizando los nombres de familia Aloaceae y Asphodelaceae, hasta que sea aceptada la nueva clasificación (Grace y Klopper, 2014).

La primera vez que fue clasificada botánicamente la planta de zábila, fue denominada *Aloe vera* L. por Carl Von Linne en 1720 (Araujo *et al.*, 2002), siendo reclasificada posteriormente por Burmann como *Aloe vera* (L.) Burm. f., y finalmente denominada como *Aloe barbadensis* Mill. por el botánico Philip Miller (Canevaro, 2004). Por esta razón, se han utilizado y aceptado todos ellos como sinónimos taxonómicos (Panwar *et al.*, 2013; Moghaddasi y Kumar, 2011; Guillot *et al.*, 2008; Baksha *et al.*, 2005); sin embargo, Canevaro (2004) recomienda denominar las especies vegetales según el último botánico que haya estudiado la planta, por lo que la tendencia actual en la comunidad científica, es utilizar *Aloe barbadensis* Mill. como nombre científico de la zábila.

La especie *Aloe barbadensis* Mill., es conocida comúnmente con el nombre de aloe, atribuido a los diversos postulados de orígenes etimológicos, entre ellos del término árabe "alloeh", del griego "à/s-alòs" y del hebreo "hallal" (Guillot *et al.*, 2008), y que en todos los vocablos significa sustancia brillante, amarga y transparente. Es importante resaltar que, en esta investigación, se hará referencia a la planta estudiada con el nombre común de "zábila" y el nombre científico de "*Aloe barbadensis* Mill.", y para la clasificación botánica se considerará dentro del género "*Aloe*", familia "Asphodelaceae", orden "Liliales".

La zábila es una planta monocotiledónea, perenne y suculenta (Añez y Vásquez, 2005), de tallo corto (acaulescente) con hojas gruesas y carnosas en forma de roseta, extendidas o ascendentes, lanceoladas y atenuadas hacia el ápice, con un promedio de 40 a 50 cm de longitud y

de 6 a 8 cm de ancho en la base, de coloración verde y con márgenes dentados (Carpano *et al.*, 2009). Las hojas están formadas por una epidermis gruesa cubiertas de una cutícula que rodea el mesófilo, el cual está diferenciado en células del colénquima y células del parénquima, estas últimas son las que conforman el mucílago transparente que es denominado gel (Ramachandra y Srinivasa, 2008).

3.1.2. Importancia y componentes de la zábila

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), realizada en el mes de mayo del año 2014, declaró que la especie *A. barbadensis* es la única del género *Aloe*, que no tiene ningún riesgo ni amenaza de extinción, porque esta planta es cultivada a escala comercial en todo el mundo (Grace y Klopper, 2014).

El cultivo de la zábila ha venido generando una gran expectativa a nivel nacional e internacional, debido a los grandes potenciales que se han descubierto de esta planta en las áreas de la salud y la cosmética (Lugo *et al.*, 2010), incrementándose la necesidad de productos primarios de zábila por parte de las industrias farmacéutica, cosmética y más recientemente, alimentaria (Domínguez *et al.*, 2012; Hamman, 2008; Mukherjee y RoyChowdhury, 2008; Ramachandra y Srinivasa, 2008). La mayor demanda de productos derivados de la zábila se encuentra en los Estados Unidos de América y Europa, especialmente en países como Alemania, Holanda, Francia e Italia (Molero *et al.*, 2013).

Tres productos primarios se extraen de las hojas de zábila: El primero, un líquido espeso, de color amarillo ámbar, amargo y olor desagradable (Molero *et al.* 2013) excretado por las células presentes

en la zona vascular y conocido como látex, goma o acíbar (Vega *et al.*, 2005) que contiene aproximadamente un 28 % de aloína (Domínguez *et al.*, 2012), siendo éste el compuesto de mayor interés para la industria farmacéutica. El segundo producto comercial es el gel o cristal (parénquima) localizado en la parte interna de la hoja y de apariencia gelatinosa, representando de un 65 a un 80 % del peso total de la planta (Domínguez *et al.*, 2012) y contiene aproximadamente un 96 % de agua (Molero *et al.*, 2013). El tercer producto comercial es una fracción lipídica o aceitosa, extraída con solventes orgánicos, utilizada especialmente en la industria cosmética (Vega *et al.*, 2005).

El mayor componente de las hojas de la planta de zábila es el agua, seguido por cenizas (16,88 %), proteína cruda (6,86 %), lípidos (2,91 %), fibra cruda (73,35 %), azúcares solubles totales (363,03 mg·mL⁻¹) y azúcares reductores (123,33 mg·mL⁻¹) (Ahmed y Hussain, 2013). Otros compuestos bioactivos como: aminoácidos, vitaminas (A, B₁₂, C y D), ácido salicílico, lignina y algunas enzimas, esteroides y compuestos fenólicos, también han sido extraídos de la planta (Moghaddasi y Kumar, 2011; Campestrini *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos como: cromonas (aloensina) y antraquinonas (aloína, barbaloína, isobarbaloína y aloemodina), son los de mayor interés para la industria farmacéutica (Domínguez *et al.*, 2012); sin embargo, cuando la aloína y la saponina son ingeridos en cantidades excesivas, pueden causar efectos negativos o tóxicos en el organismo (Narsih *et al.*, 2012).

La industria farmacéutica utiliza el acíbar y/o el gel, para la fabricación de productos derivados de la zábila, tales como pomadas, jarabes, comprimidos y cápsulas (Ramachandra y Srinivasa, 2008). Estos productos se caracterizan por poseer amplias propiedades terapéuticas: anti-inflamatoria, anti-bacteriana, anti-viral, anti-fúngica,

anti-neoplásica y anti-oxidante (Hamman, 2008; Samantaray y Maiti, 2008); además, muestran una destacada actividad inmunomoduladora, gastoprotectora, angiogénica, hipoglucémica e hipolipidémica (Domínguez *et al.*, 2012). Incluso, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América ha aprobado el desarrollo de investigaciones sobre las propiedades y usos de la planta de zábila para el tratamiento del cáncer y del SIDA (Moghaddasi y Kumar, 2011).

En la industria alimentaria, el gel extraído de las hojas de zábila ha sido utilizado como fuente de alimentos funcionales y como ingrediente en otros productos alimenticios derivados de este cultivo; especialmente, para la preparación de bebidas promotoras de la salud. El gel de zábila, también es utilizado en la industria cosmética para la preparación de cremas, lociones, jabones, champús, limpiadores faciales y otros artículos de tocador e higiene personal (Domínguez *et al.*, 2012; Hamman, 2008; Ramachandra y Srinivasa, 2008).

Aunque, el acíbar producido en Venezuela se ha caracterizado por ser uno de los más cotizados a nivel mundial, por su alta concentración de aloína (37 %) (Lugo *et al.*, 2005), la demanda de los productos primarios de la zábila venezolana ha disminuido principalmente por el aumento del número de hectáreas cultivadas y tecnificadas en otros países de América Latina, el Caribe y África del Sur (Molero *et al.*, 2013).

3.1.3. Superficie cultivada y productos primarios de la zábila

La especie *A. barbadensis* se cultiva en climas tropicales y subtropicales, en suelos arenosos o franco-arenosos calcáreos, pobres y con buen drenaje (Díaz y Ávila, 2002), se adapta bien a zonas de

pronunciada sequía, de alta intensidad de los rayos solares, que son característicos de los ambientes xerófilos y zonas cálidas (Molero *et al.*, 2013); incluso, puede tolerar suelos salinos y es altamente resistente a plagas y enfermedades (Moghaddasi y Kumar, 2011).

Las características de clima y suelo en Venezuela favorecen el cultivo de la zábila en varias zonas ecológicas: Bosque Seco Tropical y Bosque Muy Seco Tropical, las cuales abarcan un poco más del 40% del territorio nacional (Añez y Vásquez, 2005), destacando la región occidental (Molero *et al.*, 2013), al igual que algunas zonas áridas y semiáridas del norte de Venezuela con escasas precipitaciones, elevadas temperaturas, alta radiación solar y suelos pobres, que hacen a estas zonas poco aptas para el crecimiento de otros cultivos (Franco *et al.*, 2012), que no poseen el metabolismo crasuláceo (CAM) de la zábila (Franco *et al.*, 2012) para un uso eficiente del agua (Fuentes *et al.*, 2006).

Esta especie está siendo cultivado en algunos países del continente americano, área caribeña, costa mediterránea europea, zonas tropicales de África y algunas islas del Atlántico y la India; sin embargo, las plantaciones más importantes se encuentran en América y el sur de Europa (Moghaddasi y Kumar, 2011; Díaz y Ávila, 2002). En Venezuela, la zábila fue introducida directamente a la región peninsular y costera del estado Falcón por los españoles, ya que era utilizada como medicina para la tripulación durante los primeros viajes a América en los tiempos de su descubrimiento; a partir de 1930, se extendió a los estados Lara y Zulia (Molero *et al.* 2013). Desde ese tiempo la zábila se produce de manera artesanal en plantaciones que varían de pequeña a gran escala (Lugo *et al.*, 2010), sin superar las 7 ha, según estudios descriptivos y explotatorios realizados en el estado Falcón (Piña, 2005; Piña *et al.*, 2005).

La mayoría de las plantaciones comerciales de zábila en Venezuela no están bajo riego, sino que se desarrollan bajo condiciones de secano (Molero *et al.*, 2013). Los estados Zulia y Falcón son los principales estados productores de zábila ubicados en la zona occidental de Venezuela (Molero *et al.* 2013), seguidos por los estados Lara, Sucre y Anzoátegui (Piña, 2005), localizados en las regiones Centro Occidental y Oriental del país (Fig. 1).



Figura 1. Mapa de Venezuela con los principales estados productores de zábila.

En cuanto a las cifras oficiales de la superficie sembrada de zábila en Venezuela no hay registros fiables recientes. Según la IASC (*Internacional Aloe Science Council*, 2009), para el año 2004, Venezuela ocupaba el tercer lugar de América en cuanto a superficie sembrada de zábila con 3400 ha, superada por la República Dominicana y México con 3500 y 10700 ha, respectivamente. No obstante, a partir del año 2004, se comenzó a incrementar la superficie sembrada de zábila en Venezuela, debido a la sustancial demanda de sus productos primarios a nivel nacional e internacional (Lugo *et al.*, 2005) y al impulso del Plan Integral de Desarrollo Agrícola para los años 2007-2008, propuesto por el Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (2007), que contempló un incremento de la superficie sembrada en varios estados de Venezuela. En esta línea, Lugo *et al.* (2010) indican que el estado Falcón alcanzó una superficie sembrada de 5200 ha para el año 2009, mientras que Molero y Bermúdez (2013) señalan que la superficie sembrada en este estado llegó a las 9000 ha en el año 2013; así mismo, indican que no existen cifras oficiales de la superficie sembrada para el estado Zulia.

En Venezuela, los rendimientos de los productos primarios que se extraen de la zábila varían de acuerdo a las condiciones climáticas de la zona y terreno donde se desarrolla el cultivo, a la época de recolección de las hojas (Molero *et al.*, 2013), al manejo agronómico, a la edad de la planta y al producto que se desea comercializar, bien sea acíbar o gel, obteniéndose entre 500 a 800 L·ha⁻¹·año⁻¹ de acíbar para una densidad de 20000 plantas·ha⁻¹ y entre 45000 a 80000 kg·ha⁻¹·año⁻¹ de gel para una población de 10000 plantas·ha⁻¹ (Lugo *et al.*, 2010).

Los altos rendimientos de gel y acíbar de las plantaciones de zábila ubicadas en el Occidente de Venezuela muestran el gran potencial que tiene este cultivo para desarrollar el campo venezolano y mejorar los

ingresos que actualmente se obtienen de la comercialización de este rubro, además de abastecer parte de la demanda de las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria nacional e internacional (Molero *et al.*, 2013), ya que los productos primarios de las plantaciones venezolanas han demostrado alcanzar niveles de calidad que los hacen muy apreciados a nivel mundial (Franco *et al.*, 2012).

3.1.4. Sistemas de propagación de la zábila

La planta de zábila puede reproducirse por vía sexual y asexual o vegetativa. La primera vía se da en forma natural muy escasamente debido a alta esterilidad masculina que presentan sus flores (Rathore *et al.*, 2011), éstas son hermafroditas (Mukherjee y RoyChowdhury, 2008) y su alta incapacidad de reproducirse sexualmente, puede estar relacionada con algunas anomalías cromosómicas, dicogamia, proliferación irregular de las células madres del polen y autoincompatibilidad (Molero y Bermúdez, 2013).

La segunda vía de reproducción, asexual o vegetativa, se realiza mediante la separación de brotes laterales emitidos por la planta madre (hijuelos) durante su crecimiento (Campestrini *et al.*, 2006; Baksha *et al.*, 2005; Díaz y Ávila, 2002). En general, en el sistema de producción convencional se obtienen de 3 a 4 brotes·planta⁻¹·año⁻¹, lo cual es muy lento cuando el propósito es la siembra a escala comercial (Rathore *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2002), ya que se requieren entre 12000 a 16000 plantas para la siembra de 1 ha (Campestrini *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2002). Además, la proliferación de nuevos brotes no siempre es homogénea, puesto que depende de la edad de la planta, su tamaño y su constitución genética (Sing *et al.*, 2009).

Por otra parte, a través del sistema de propagación por separación de hijuelos de la planta madre, puede generarse una mayor incidencia de enfermedades en este cultivo a consecuencia de las lesiones causadas a las plantas donantes con la extracción de los brotes laterales, y con ello, una alta probabilidad de diseminación de enfermedades y plagas hacia otras zonas junto con el material de siembra.

Las técnicas de cultivo de tejidos, se han convertido en una alternativa para la reproducción de plantas que poseen bajos índices de reproducción natural, como es el caso de la zábila (Molero y Bermúdez, 2013; Krishnapuram y Pandey, 2011; Mukherjee y RoyChowdhury, 2008; Matos, 2007; Campestrini *et al.*, 2006; Baksha *et al.*, 2005). Estas técnicas consisten en aislar una porción de la planta (tejido, órgano o célula) y cultivarlo en un medio nutritivo bajo condiciones físicas y químicas artificiales (Roca y Ramírez, 2000). Se ha demostrado que las técnicas de cultivo de tejido en zábila son muy superiores a la propagación convencional, ya que han permitido obtener una mayor tasa y velocidad de propagación de plantas (Molero y Bermúdez, 2013).

3.2. Micropropagación de la zábila

La micropropagación se define como la regeneración *in vitro* de plantas a partir de órganos, tejidos, células o protoplastos, denominados "explantos" (Krishnapuram y Pandey, 2011). Otros autores incorporan a esta definición las características de proliferación rápida y masiva de plantas en ambientes controlados (Ahloowalia y Savangicar, 2004).

Muchos son los factores que determinan el éxito en la micropropagación de una especie; así, para Krishnapuram y Pandey

(2011) la fuente del explante, la composición química del medio de cultivo y el entorno físico para los cultivos, son los principales factores que influyen en la capacidad de regeneración y en la tasa de multiplicación; por lo tanto, para cada especie que se desee micropropagar es necesario optimizar estos factores.

En los últimos diez años se han evaluado muchos de los factores asociados a la micropropagación de zábila generando una serie de metodologías altamente eficientes para producir gran cantidad de plantas. La mayoría de estas metodologías se han basado en la regeneración de plantas de zábila mediante organogénesis axilar y/o adventicia directa, evaluando los componentes de los medios de cultivo en las diferentes fases de la micropropagación de esta especie (Albany *et al.*, 2015; Cardarelli *et al.*, 2014; Molsaghi *et al.*; 2014; Lee *et al.*, 2013; Daneshvar *et al.*, 2013; Zakia *et al.*, 2013; Krishnapuram y Pandey, 2011; Hashem y Kaviani, 2010; Pérez *et al.*, 2010; Hashem y Kaviani, 2008; Mukherjee y RoyChowdhury, 2008; Hosseini y Parsa, 2007; Matos, 2007; Ujjwala, 2007; Vilchez *et al.*, 2007; Albany *et al.*, 2006; Campestrini *et al.*, 2006; Tanabe y Horiuchi, 2006; Baksha *et al.*, 2005). También se han usado otras metodologías basadas en la regeneración via organogénesis adventicia indirecta con la producción de agregados celulares (callos) de zábila, para la posterior regeneración de plantas (Rathore *et al.*, 2011; Badar *et al.*, 2013).

Los resultados de estas investigaciones evidencian que las metodologías de propagación *in vitro* de zábila desarrolladas en los últimos años han superado las limitaciones de la propagación convencional, ya que se ha logrado regenerar mayor cantidad de plantas en menor tiempo y espacio (Hashem y Kaviani, 2010).

3.2.1. Limitaciones y estrategias de la micropropagación masiva

La micropropagación masiva de plantas surge de la necesidad de generar un gran número de plantas, uniformes genéticamente y libres de enfermedades para satisfacer la demanda comercial. Sin embargo, con el desarrollo de la industria de la micropropagación comienzan a identificarse los problemas asociados a esta práctica, entre ellos la inestabilidad genética de las plantas generadas, ya que en el proceso de masificación generalmente se incrementa la frecuencia de variación genética entre las plantas, lo que puede ser particularmente desventajoso cuando el cambio es una reversión a una forma menos deseable (Orellana, 1998^a).

Las investigaciones y experiencias acumuladas durante más de tres décadas en micropropagación, han permitido el desarrollo de metodologías con fines comerciales, basadas en la regeneración de plantas por la inducción de brotes axilares, ya que ofrece mayor estabilidad genética que la organogénesis adventicia y la embriogénesis somática (Pérez *et al.*, 1998). Este método de regeneración de plantas vía organogénesis axilar es denominado "micropropagación convencional" y se realiza a través de la multiplicación a partir de meristemas, ápices y yemas de las plantas (Orellana, 1998^b). Ahora bien, la micropropagación convencional ha dejado de ser un proceso económicamente eficiente (McCown, 2003) debido a los altos costos de producción, convirtiéndose en el principal factor limitante para adoptar esta tecnología como método de propagación comercial (Savangikar, 2004).

Varios investigadores coinciden en que las principales causas de los altos costos de producción son el elevado número de operaciones

manuales (Ilezuk *et al.*, 2005) y el uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo como soportes de los explantes (Quiala *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 1998), que elevan los costos finales de las plantas por el aumento de la mano de obra y el incremento de los costos de los medios de cultivo (Ziv, 1990; 1989).

Los costos de mano de obra en la micropropagación comercial han sido estimados en rangos que oscilan entre el 40 % y el 90 % del costo final de las plantas (Satyahari, 2005; Etienne y Berthouly, 2002; Wang *et al.*, 1999; Alchanatis *et al.*, 1994; Ziv, 1989). El componente más costoso del medio de cultivo es el agente gelificante (agar, fitagel, agargel, u otros polímeros similares); y representa entre el 70 % y el 90 % de los costos del medio (Pérez *et al.*, 1998; Orellana, 1998^b). La omisión del gelificante en el medio de cultivo definitivamente reduciría los costos de producción de las plantas (Aggarwal y Barna, 2004) y facilitaría el proceso de automatización de la micropropagación (Etienne y Berthouly, 2002). Así pues, el uso de medios de cultivo líquidos en las etapas de la micropropagación se considera la solución ideal para reducir los costos de los medios de cultivo, además de permitir la automatización de la producción y con ello la reducción de los costos de mano de obra (Preil, 2005; Ziv, 2005).

En el caso específico de la micropropagación de zábila, la mayoría de las metodologías desarrolladas para la multiplicación masiva de esta especie, se sustentan en la utilización de medios de cultivos gelificados; utilizando agar (Lee *et al.*, 2013; Krishnapuram y Pandey, 2011; Pérez *et al.*, 2010; Hashem y Kaviani, 2010 y 2008; Matos 2007; Campestrini *et al.*, 2006; Tanabe y Horiuchi, 2006; Baksha *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2004; Natali *et al.*, 1990;), gellan (Matos *et al.*, 2000), gelrite (Meyer y Staden, 1991) y phytigel (Ujjwala, 2007). No obstante, en la búsqueda de una mayor eficiencia de la micropropagación de zábila han surgido

nuevos protocolos para la multiplicación *in vitro* de esta especie, basados en el uso de sistemas de medios líquidos obteniendo en la mayoría de los casos igual número de plantas que en los medios gelificados, pero un menor gasto al omitir el agente gelificante (Albany *et al.*, 2015; Cardarelli *et al.*, 2014; Vilchez *et al.*, 2007; Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna, 2004).

3.2.2. Sistemas de medios de cultivo líquidos

Muchas son las ventajas de los sistemas de cultivo en medios líquidos que permiten reducir los costos de producción y aumentar la eficiencia de la micropropagación de plantas. Adelberg (2004) y Berthouly y Etienne, (2005) señalan que los sistemas líquidos proporcionan condiciones de cultivo uniforme, el medio puede ser renovado fácilmente sin necesidad de cambiar el recipiente, la limpieza del recipiente después de un período de cultivo es más sencilla y generalmente, se reduce el número de subcultivos. Estos sistemas también disminuyen el tiempo de duración de cada subcultivo, facilitan la manipulación de los explantes en el momento de la siembra y permiten cambiar la composición del medio de cultivo por simple transferencia (Alvard *et al.*, 1993). Además, la esterilización del medio puede realizarse por microfiltración sin afectar los compuestos termolábiles del medio (Etienne y Berthouly, 2002).

Desde el punto de vista biológico, Lorenzo *et al.* (1998) señalan que los medios de cultivo líquido favorecen la absorción de los nutrientes por parte de los tejidos *in vitro*; además, permite un aumento en las tasas de crecimiento en comparación con el medio gelificado, debido a que una mayor superficie del tejido cultivado está en contacto con el medio, y cuando es aireado o agitado se reducen los gradientes de difusión entre éste y el tejido (Etienne y Berthouly,

2002). Estos dos factores combinados permiten una toma más eficiente de nutrientes y reguladores de crecimiento, de modo que en algunas especies es posible emplear medios de cultivo desprovistos de estos reguladores. Por otro lado, la aireación y/o agitación de los medios líquidos evitan que los metabolitos tóxicos se acumulen en la proximidad de los tejidos (George, 1993).

Para varios investigadores (Etienne y Berthouly, 2002; Jeong *et al.*, 1995; Orellana, 1998^a; Pérez *et al.*, 1998; Teisson *et al.*, 1996), la principal ventaja del uso de los medios de cultivo líquido desde el punto de vista económico es que permiten la automatización o semi-automatización de los procesos de la micropropagación, para disminuir los costos por mano de obra y los costos de los medios de cultivo, haciendo que el proceso sea competitivo y eficiente. Sin embargo, los medios de cultivo líquido pueden causar un efecto negativo en la micropropagación de algunas plantas, manifestándose desordenes fisiológicos o afectándose el crecimiento de algunos tejidos *in vitro*, bien sea por "hiperhidricidad" o "hipoxia" (Berthouly y Etienne, 2005; Ziv, 2005; Pérez *et al.*, 1998; Alvard *et al.*, 1993; Ziv *et al.*, 1998); especialmente cuando los tejidos están totalmente sumergidos en el medio líquido, sin agitación ni aireación (estáticos).

La hiperhidratación de los tejidos también es conocida como "vitrificación" y se refiere a un desorden morfológico y fisiológico que provoca una apariencia cristalina, turgente y acuosa del tejido, unido en muchos casos con un crecimiento distorsionado de los órganos que se vuelven translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Berthouly y Etienne, 2005; Posada *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 1998; Pérez, 1998; Ziv y Shemesh, 1996); todo ello, a consecuencia de la acumulación de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos (Ziv, 1995).

Por otra parte, la inmersión continua de los tejidos en los medios líquidos provoca síntomas de estrés oxidativo, producto del incremento de los niveles de H₂O₂ por bajos niveles de oxígeno en el medio (Damiano *et al.*, 2003; Saher, 2004); este estrés es también conocido como "hipoxia" y produce serios efectos en el crecimiento de los explantes (Orellana, 1998^b). Por lo tanto, para el establecimiento de un sistema de multiplicación eficiente en medios de cultivos líquidos, no sólo es necesario resolver los problemas de hiperhidricidad sino también los de aireación del medio (Sandal *et al.*, 2001).

Existen varias alternativas para disminuir los problemas de hiperhidricidad e hipoxia de los tejidos cultivados en los sistemas de medios líquidos, que van desde el uso de soportes (Albany *et al.*, 2015; Gangopadhyay *et al.*, 2002), disminución del volumen del medio, aireación y/o agitación de los envases de cultivo (Albany *et al.*, 2006; Chen y Ziv, 2001; Sandal *et al.*, 2001) hasta la adición al medio de sustancias químicas denominadas anti-vitrificantes (Whitehouse *et al.*, 2002). Sin embargo, para la micropropagación masiva de plantas, estas alternativas suelen ser poco viables dado el volumen de plantas que se producen, por lo que se han diseñado equipos basados en la inmersión temporal de los tejidos u órganos en el medio de cultivo por un tiempo determinado, denominados "sistemas de inmersión temporal" para evitar estos problemas (Georgiev *et al.*, 2014; Berthouly y Etienne, 2005; Ziv, 2005; Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994).

En las diferentes fases de la micropropagación de zábila se han comparado los sistemas de cultivo basados en medios líquidos con los sistemas en medios gelificados, obteniéndose resultados favorables con el empleo de medios de cultivo líquidos estáticos utilizando soporte de papel en las fases de establecimiento y enraizamiento *in vitro*, obteniendo un mayor crecimiento de los brotes, en menor tiempo

(Albany *et al.*, 2015). En la fase de multiplicación se obtuvo mayor número de brotes cuando se utilizó el sistema de inmersión continua con soporte metálico (Cardarelli *et al.*, 2014); sin embargo, cuando se emplearon los sistemas de inmersión temporal, los valores del número de brotes fueron similares a los observados en los medios gelificados, pero con mayor crecimiento de los brotes (Albany *et al.*, 2015; Vilchez *et al.*, 2007). En todos estos casos, la omisión de los agentes gelificantes en el medio de cultivo permitió un ahorro en los costos de los medios, incrementándose la eficiencia de la micropropagación de zábila.

3.2.2.1. Sistemas de inmersión temporal: Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®)

Alvard *et al.*, (1993) diseñaron los sistemas de inmersión temporal (SIT) basándose en el contacto intermitente del medio de cultivo con los tejidos u órganos por un corto período de tiempo, evitando así los efectos negativos de la hiperhidricidad e hipoxia que afectan el crecimiento de los cultivos *in vitro*.

La eficiencia de los SIT versus los medios gelificados en la fase de multiplicación *in vitro* parece ser debido a las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo (Pérez *et al.*, 1998; Posada *et al.*, 2003; Etienne y Berthouly, 2002); que permiten la combinación de la ventilación y del contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes (Etienne y Berthouly, 2002), aportando un suministro óptimo de nutrientes y reguladores de crecimiento a los tejidos, así como una mejor aireación, circulación y absorción del medio de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005; Ziv, 2005).

Pérez *et al.* (1998) detallan que el contacto directo y renovado del medio con toda la superficie del explante durante cada inmersión, hace más eficiente el aporte de los elementos nutritivos, y que la renovación completa de la atmósfera incrementa el suministro de oxígeno dentro del recipiente a intervalos regulares evitando la acumulación de gases nocivos, como el etileno, producidos por los cultivos *in vitro*. Además, la inmersión completa de los explantes por tiempos muy cortos en los SIT permite formar una película de medio de cultivo sobre los tejidos que impide la desecación y disminuye la resistencia a la difusión de gases, minimizando la interrupción del intercambio de gases entre las plantas y la atmósfera (De Fera *et al.*, 2003; Etienne y Berthouly, 2002; Pérez *et al.*, 1998; Alvard *et al.*, 1993).

Varios investigadores señalan que los SIT incrementan la eficiencia biológica y productiva de los cultivos *in vitro* en comparación con otros sistemas basados en el uso de medios líquidos o gelificados. En la propagación de varias especies por vía embriogénica u organogénica (Jiménez, 2005) se han incrementado los coeficientes de multiplicación, la calidad de las plantas y el rendimiento, lo que implica una reducción de los costos de producción de las plantas *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 1998; Teisson y Alvard, 1994). Además, los SIT brindan la posibilidad de automatizar algunas etapas del proceso de micropropagación (Ziv, 2005; Jiménez y De Fera, 1998; Alvard *et al.*, 1993), al tiempo que ofrecen mayor facilidad para el escalado de la producción de ciertos cultivos *in vitro*, con la finalidad de obtener grandes volúmenes de plantas para su comercialización (Jiménez, 2005).

A lo largo de los años se han diseñado y propuesto diferentes SIT, entre los que destacan las máquinas oscilantes o de inclinación (Harris y Manson, 1983), los sistemas de inmersión completa con mecanismo de

renovación completa del medio de cultivo (Tisserat y Vandercook, 1985), los sistemas de inmersión parcial con mecanismo de renovación del medio de cultivo (Aitken y Jones, 1987; Aitken y Davis, 1988) y los sistemas de inmersión completa por transferencia neumática del medio líquido sin reposición de medio (Alvard *et al.*, 1993). De estos últimos se han descrito diferentes diseños, donde se incluyen los más simples y fáciles de usar y por ende los de mayor aplicabilidad para la micropropagación de especies de interés comercial (Georgiev *et al.*, 2014). Algunos diseños de estos SIT simples y fáciles de usar han sido elaborados con insumos y materiales de los propios laboratorios de investigación (Giménez *et al.*, 2004; De Fera *et al.*, 2003; Albany, 2001; Lorenzo *et al.*, 1998; Teisson *et al.*, 1996) y otros SIT han sido fabricados por casas comerciales que se encuentran actualmente disponibles en el mercado, como los BIT[®] (**B**iorreactor de **I**nmersión **T**emporal) y los RITA[®] (**R**ecipiente de **I**nmersión **T**emporal **A**utomatizados) (Georgiev *et al.*, 2014), entre otros.

Los BIT[®] están conformados por dos recipientes interconectados por tubos de silicona, uno de los recipientes o contenedores almacena el medio de cultivo líquido, mientras que el otro recipiente contiene el material vegetal que puede o no contener algún tipo de material de soporte para los explantes, como goma espuma de poliuretano, metal o tamices de nylon. Los componentes y el funcionamiento de los BIT[®] se indican en la figura 2 (Georgiev *et al.*, 2014).

El diseño simple y confiable de los BIT[®] los hace accesibles para muchos laboratorios. Sin embargo, una de las principales desventajas de los BIT[®] es la automatización integral, ya que requieren el doble de relojes temporizadores y electroválvulas que el sistema RITA[®] (Georgiev *et al.*, 2014).

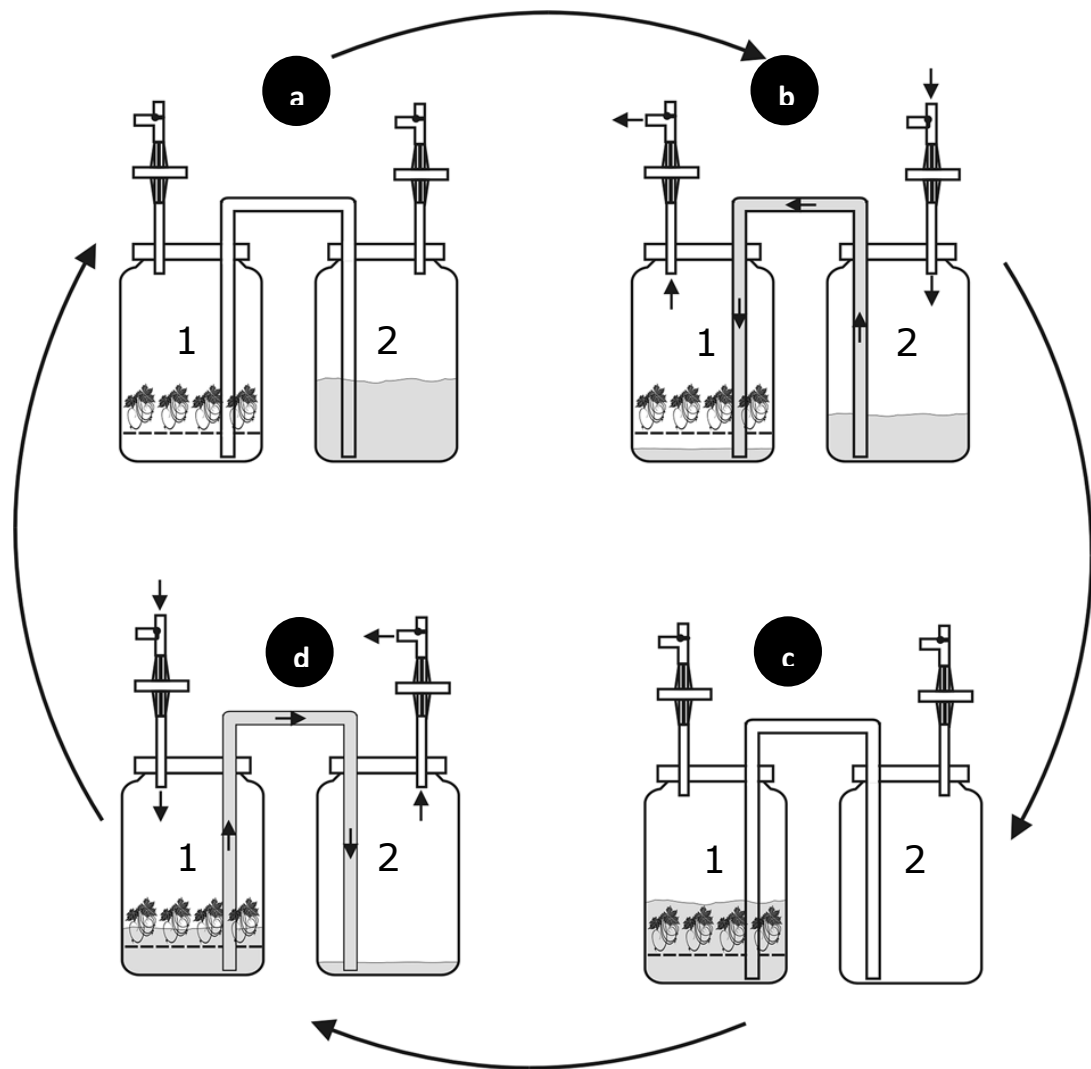
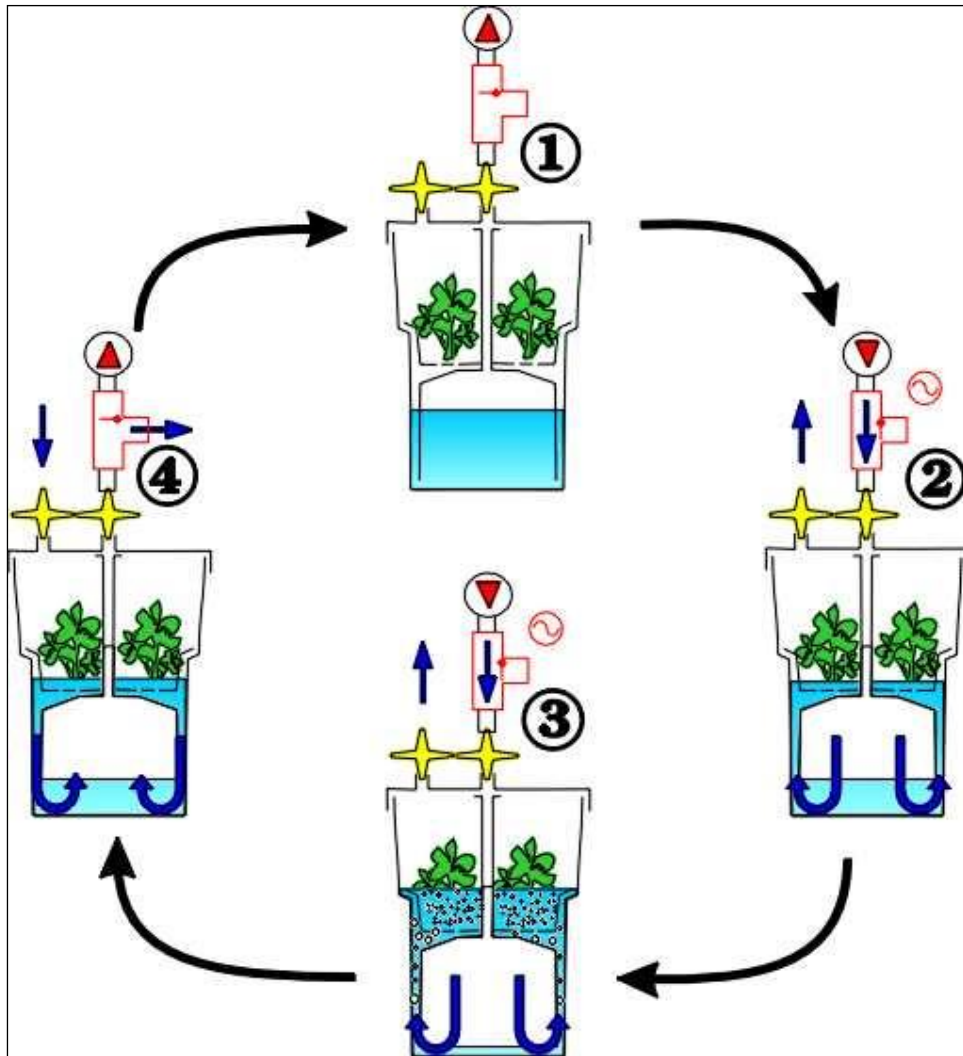


Figura 2. Diagrama de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal tipo BIT® (Georgiev *et al.*, 2014). (a) Los explantes están colocados en el recipiente 1 y todo el volumen del medio de cultivo líquido en el recipiente 2, con las entradas de las electroválvulas de ambos recipientes cerradas. (b) Se abre la electroválvula del recipiente 2 permitiendo la entrada de aire que comprime medio de cultivo impulsándolo al recipiente 1. (c) Una vez transferido todo el volumen del medio de cultivo desde el recipiente 2 al 1, se abre la electroválvula del recipiente 1 permitiendo la salida del flujo de aire hacia la atmósfera. El tiempo de inmersión de los explantes y burbujeo comienza una vez que pasa todo el medio de cultivo desde el recipiente 2 al recipiente 1. (d) Después del tiempo de inmersión predeterminado se abre la electroválvula del recipiente 2 y la inyección de aire por la entrada de la electroválvula del recipiente 1 hace retornar el medio de cultivo al recipiente 2. →: Indica el flujo o movimiento del aire y del medio, ⇩: electroválvula cerrada, ⇨: electroválvula abierta ⚡: filtros de aire.

El sistema RITA[®] consiste en un envase o recipiente de cultivo de 1 litro de capacidad dividido en dos compartimientos, el superior aloja material vegetal y el inferior el medio de cultivo líquido; ambos compartimientos están conectados mediante un tubo central unido a un filtro de aire. El funcionamiento de los RITA[®] (CIRAD, 2015) se describe en la figura 3. Además de su funcionamiento simple y fiable, otras ventajas le han sido atribuidas, como su diseño compacto, donde los elementos internos están conectados entre sí y pueden ser manipulados como un solo recipiente, facilitando el manejo de los cultivos y favoreciendo su uso en espacios pequeños; además, este sistema garantiza un suministro suficiente de humedad relativa dentro del mismo recipiente y separación completa de los propágulos del medio de cultivo líquido (Georgiev *et al.*, 2014).

Los RITA[®] fueron diseñados en el laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia basados en el principio de los SIT descrito por Teisson *et al.* (1996). Este SIT ha sido el más difundido en el mundo y se ha utilizado exitosamente para la propagación de varias especies de interés agrícola, ornamental y medicinal (Berthouly y Etienne, 2005); incluso es el más utilizado para la micropropagación de plantas con fines comerciales (Georgiev *et al.*, 2014).

Para desarrollar un sistema de micropropagación eficiente en los SIT, es esencial optimizar los parámetros técnicos para cada cultivo, destacando el tiempo y la frecuencia de inmersión como los más críticos, ya que gobiernan el consumo de nutrientes en los tejidos cultivados (Berthouly y Etienne (2005). La frecuencia de inmersión permite renovar la atmósfera gaseosa dentro del recipiente, aumentando el suministro de oxígeno y eliminando los gases nocivos en el recipiente (Etienne y Berthouly, 2002).



Fuente: <http://www.vitropic.fr/rita>

Figura 3. Diagrama de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA® (CIRAD, 2015). ① Los explantes están colocados sobre un disco de poliuretano en el compartimiento superior. ② Una inyección de aire estéril, aplicada en la parte baja del recipiente, permite al medio de cultivo subir a la parte alta del recipiente donde se encuentran los explantes, por efecto de una sobrepresión. ③ El aire inyectado permite la oxigenación del medio de cultivo. El aire de la parte alta del recipiente se renueva totalmente. ④ Finalizado el tiempo de inmersión programado, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran dentro del recipiente, y el medio de cultivo vuelve a bajar por gravedad al compartimiento inferior del recipiente. Por el efecto de adhesión, una fina película de medio de cultivo se mantiene en contacto sobre los explantes. ➡: Indica el flujo o movimiento del aire, ✨: Representan los filtros de aire, ▼: Indica el funcionamiento del compresor de aire (encendido), ▲: Indica el no funcionamiento del compresor de aire (apagado), □: Indica el funcionamiento o no de la electroválvula.

Los mejores resultados de tiempo y frecuencia de inmersión en los SIT se han obtenido cuando son bastante espaciados (frecuencia y tiempo bajos), aunque se han observado diferencias notables entre las especies y los distintos sistemas de regeneración (Berthouly y Etienne, 2005; Jiménez, 2005; Pérez *et al.*, 1998), de tal manera, que la alta eficiencia biológica de los SIT está determinada por la mejor combinación de estos factores (Berthouly y Etienne, 2005).

Optimizar el volumen de medio de cultivo en los SIT también es muy importante, volúmenes altos pudieran ser menos eficientes, dado que la secreción de moléculas químicas por parte de los explantes estimulan la proliferación de brotes, y éstas moléculas se encontrarían más diluidas cuando se usa un mayor volumen de medio de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005). Sin embargo, el volumen total del medio del cultivo está estrechamente relacionado con la cantidad de brotes o explantes colocados en los recipientes de cultivo; así, existe una relación entre la cantidad de brotes y el volumen de medio que tendría disponible cada explante, que determina la disponibilidad de nutrientes para cada uno de los brotes sembrados en los envases de cultivo (De Fera *et al.*, 2003).

Aunque la cantidad de brotes es un factor determinante en los protocolos de micropropagación, este factor ha sido poco investigado en los SIT (Etienne y Berthouly, 2002; Orellana, 1998^a). Generalmente, el número de brotes en cada recipiente se establece de forma empírica, considerando en pocos casos el diámetro del recipiente. No evaluar este factor en los recipientes de cultivo, podría acarrear múltiples problemas, ya que con una baja densidad, estarían subutilizados los recipientes ocasionando una pérdida de espacio y de medio de cultivo; por el contrario, cuando la densidad de los explantes es demasiado alta, el

crecimiento y proliferación de los brotes estaría limitado, necesitando realizar más subcultivos (Orellana, 1998^a).

Los RITA[®] se han utilizado exitosamente para aumentar la eficiencia de la micropropagación de muchas especies; entre ellas, *Psidium guajava* (Vilchez y Albany, 2014; De Feria *et al.*, 2003), *Musa* spp. (Colmenares y Giménez, 2003), *Eucalyptus* (Alister *et al.*, 2005), *Dioscorea alata* (Salazar y Hoyos, 2007) y *Xanthosoma sagittifoli* (Vilchez *et al.*, 2011). Incluso se han utilizado los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila, mostrando los brotes un mayor crecimiento longitudinal (Vilchez *et al.*, 2007; Albany *et al.*, 2015). Por otra parte, en la fase de multiplicación del cv. Williams de banano en SIT, los brotes presentaron un mayor desarrollo vegetativo con abundantes hojas y raíces, disminuyendo la tasa de multiplicación (Colmenares y Giménez, 2003). De manera similar, los brotes del cv. Gran Enano mostraron un crecimiento excesivo de tallos y hojas que no son aprovechables en la fase de multiplicación y que además dificultan la manipulación y reducen el volumen de los SIT (Albany *et al.*, 2005^b).

3.2.3. Reguladores de crecimiento en los medios de cultivos para la multiplicación *in vitro*

Los reguladores de crecimiento han sido ampliamente utilizados para mejorar la capacidad de regeneración de plantas *in vitro* (Bello *et al.*, 2010). Un balance apropiado de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de ápices, yemas o meristemos; en este balance, se deben considerar las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presente en el explante; de hecho, en algunos casos las concentraciones endógenas de estos reguladores son suficientes para obtener una respuesta por parte del explante (Jiménez, 1998).

Usualmente, para la fase de multiplicación *in vitro* vía organogénica, es necesario suministrar en los medios de cultivo citoquininas en mayor proporción que las auxinas. Esto se debe a que la concentración endógena de citoquininas en los brotes suele ser baja, ya que el principal sitio de síntesis de estas fitohormonas son las raíces (Jiménez, 1998) y estas raíces son eliminadas durante la manipulación de los explantas para iniciar el siguiente ciclo de multiplicación. Por otra parte, la formación de brotes se ve favorecida por una alta relación citoquinina/auxina (Murashige, 1974).

Lo contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, como los ápices y meristemos empleados en el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de las auxinas, por lo que la concentración endógena de las mismas suele ser alta. Sin embargo, cuando los ápices o meristemos son muy pequeños o las yemas se encuentran en reposo, es común que la cantidad endógena de auxinas sea muy baja, por lo que es necesario adicionarlas en los medios de cultivo (Jiménez, 1998).

Las giberelinas (GAs) son una familia de fitohormonas diterpénicas, que presentan estructuras tetracíclicas de 19 a 20 carbonos (Ospina *et al.*, 2005). Se han identificado y caracterizado un grupo de GAs que tienen diversas funciones como la movilización de sustancias de reserva en las semillas, estimulación de la germinación, promoción del crecimiento longitudinal especialmente de los entrenudos, etc. (Ospina *et al.*, 2005). Estos procesos parecen depender de la concentración de GAs, que se sintetizan en las plantas a través de una compleja ruta de biosíntesis en la que participan diversas enzimas, algunas de éstas con propiedades reguladoras (Vidal *et al.*, 1998). Aparentemente la biosíntesis de estas fitohormonas en los cultivos *in vitro* es suficiente

para el crecimiento de los tejidos, por lo que no se suelen incorporar a los medios de cultivo (Jiménez, 1998).

La biosíntesis de giberelinas sigue una ruta secuencial que ha sido estudiada *in vitro*, con el objetivo de identificar los puntos de interacción con inhibidores de esta ruta, que detienen o disminuyen parcialmente la producción de estas giberelinas (Ospina *et al.*, 2005). La Figura 4 incluye un esquema de la biosíntesis de las GAs de acuerdo de la propuesta de Chaney y Bai (2004) y Rademacher (2000).

3.2.3.1. Retardantes del crecimiento: Ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ)

Existen compuestos sintéticos que inhiben la biosíntesis de las GAs como el ancimidol, paclobutrazol y uniconazol, entre otros (Chaney y Bai, 2004; Rademacher, 2000; Smith *et al.*, 1991), y que son catalogados como retardantes de crecimiento.

En la agricultura, los retardantes del crecimiento han tenido un amplio uso para el control del crecimiento de las plantas (Rademacher, 2000). En el cultivo *in vitro* han tenido efectos positivos en la reducción de la deshidratación de las plantas, al ser transferidas a condiciones *ex vitro* (Smith *et al.*, 1991).

Rademacher (2000) señala que se han identificado cuatro grupos diferentes de inhibidores o retardantes de crecimiento (RC) de las GAs; de estos cuatro grupos, los compuestos que están formados por estructuras heterocíclicas, que contienen nitrógeno, son los que inhiben las reacciones tempranas de la ruta biosintética de las GAs, entre ellos el ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) (Fig. 4), que actúan como inhibidores de las enzimas mono-oxigenasas que catalizan las

oxidaciones que tienen lugar en el retículo endoplasmático en la biosíntesis de GAs (Ospina *et al.*, 2005).

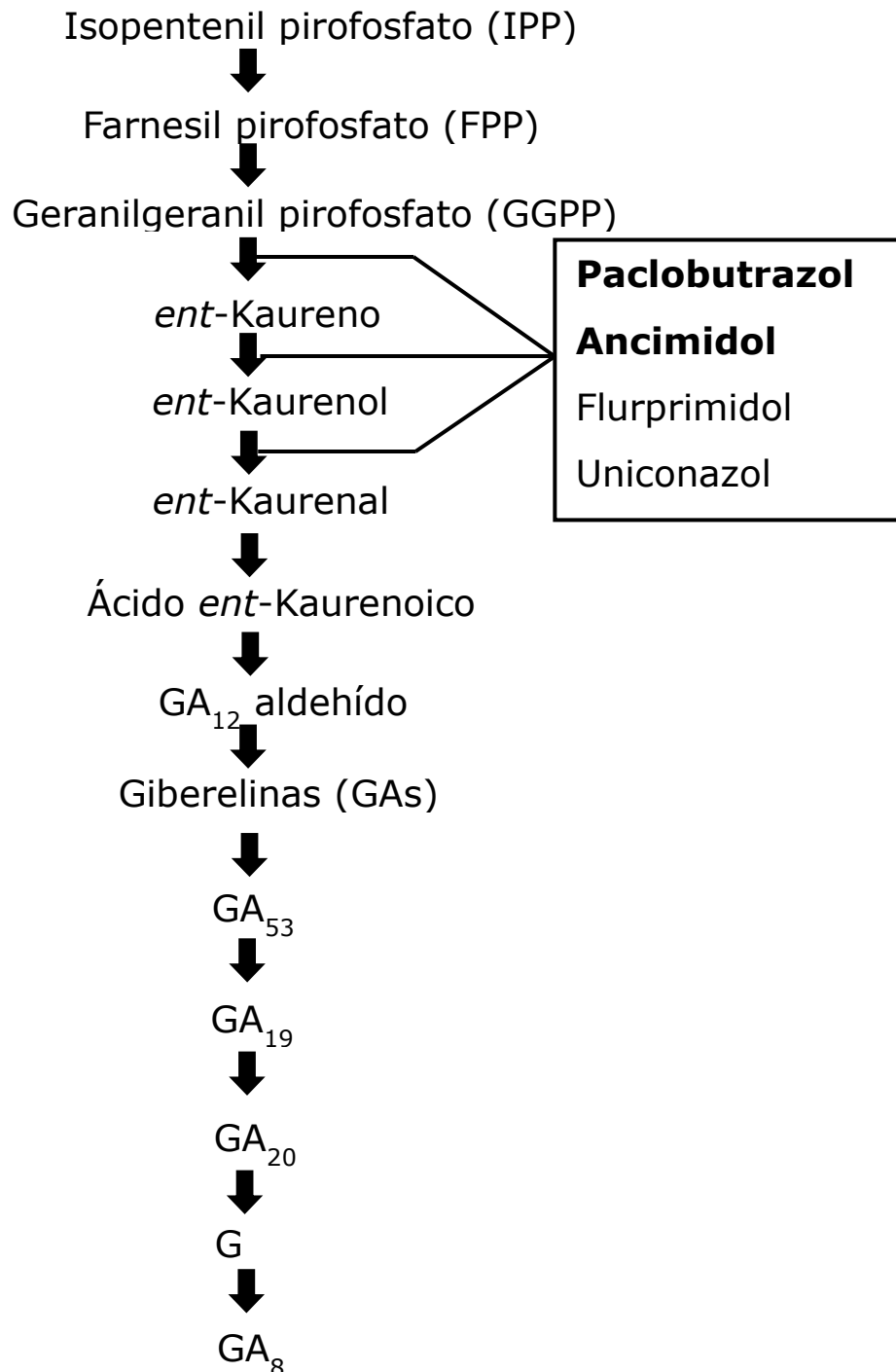


Figura 4. Ruta de biosíntesis de las Giberelinas (GAs) (Chaney y Bai, 2004; Rademacher, 2000). El recuadro incluye algunos de los retardantes de crecimiento que inhiben la *ent*-kaureno oxidasa en la biosíntesis de las GAs.

El ANC (α -ciclopropil-(*p*-metoxifenil)-5-pirimidinmetanol), contiene fracciones heterocíclicas de nitrógeno que derivan de las pirimidinas (Žiauka y Kuusienė, 2010; Smith *et al.*, 1991). El ANC (Fig. 5) se une a la enzima mono-oxigenasa del citocromo P450, desplazando al oxígeno de su sitio de unión con el hierro y cambiando la estructura de la enzima, de tal manera, que se interrumpe la producción de las GAs y en consecuencia, se da la reducción del crecimiento de la planta y puede afectar también los niveles de otras fitohormonas (Ospina *et al.*, 2005).

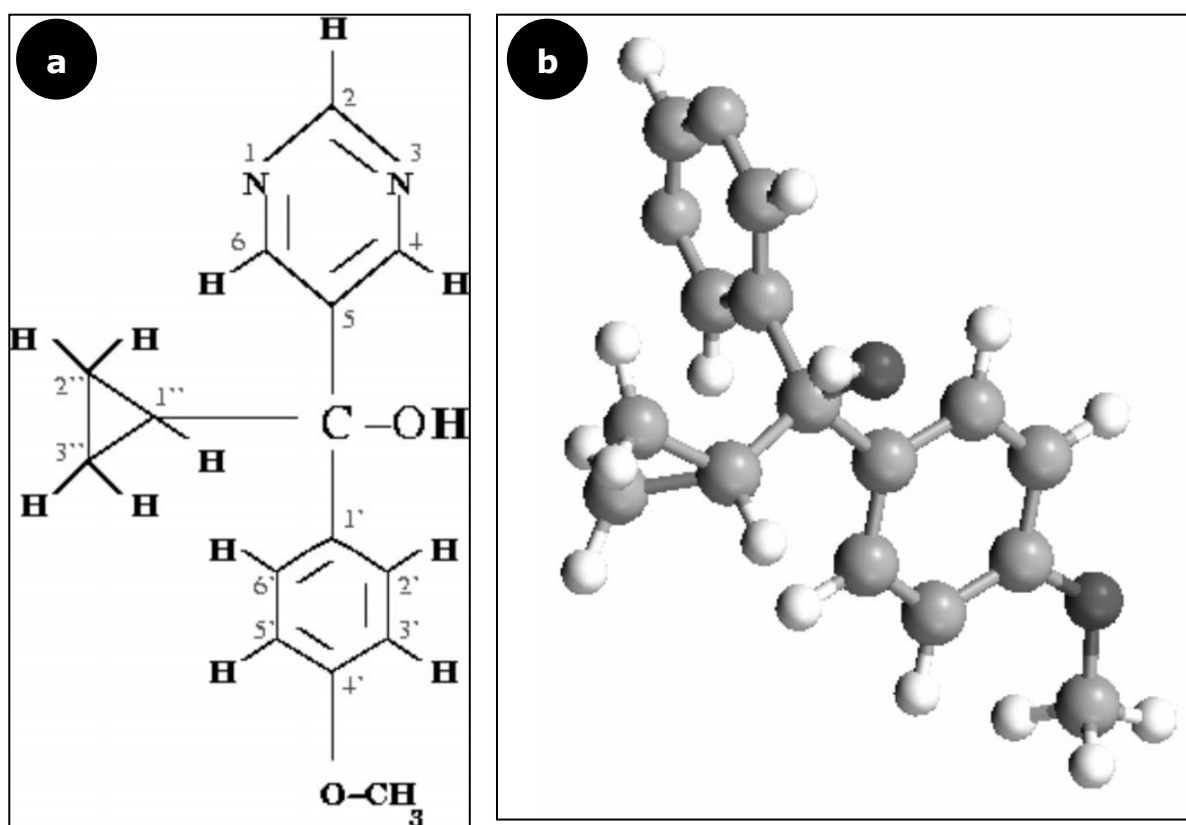


Figura 5. Estructura química del ancimidol (Ospina *et al.*, 2005). (a) Estructura química del ancimidol de masa molecular: $C_{15}H_{16}N_2O_2$. (b) Modelo tridimensional de la estructura del ancimidol.

El Paclobutrazol [(2RS, 3RS)-1-4-(clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H, 1,2,4-triazolil) 3-pentanol], considerado como un derivado de los triazoles, está compuesto por una mezcla de enantiómeros de 2R, 3R y 2S, 3S gracias a sus dos carbonos asimétricos (Fig. 6). Su enantiómero óptico 2S, 3S desempeña una pronunciada actividad reguladora del crecimiento de las plantas, mientras que el enantiómero 2R, 3R es más activo en la inhibición de la biosíntesis del estero, exhibiendo propiedades fungicidas, especialmente sobre *Basidiomycete* y *Ascomycete*, con una baja actividad en la regulación del crecimiento de las plantas (Ribeiro *et al.*, 2011; Sugavanam, 1984).

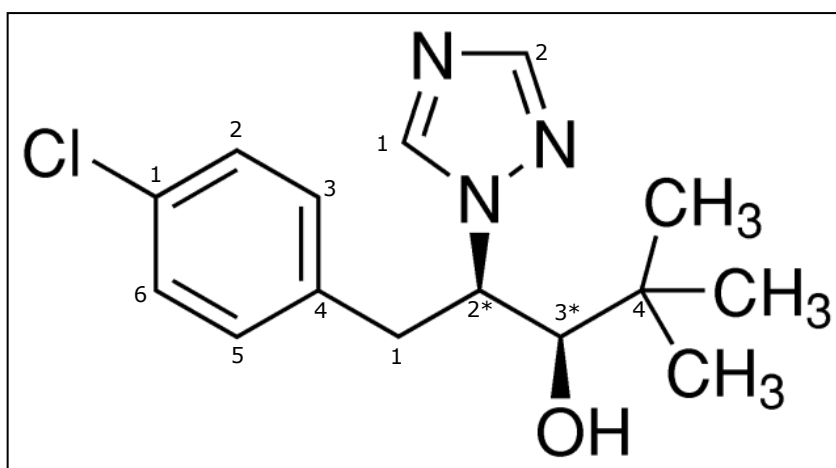


Figura 6. Estructura química del paclobutrazol (Sugavanam, 1984). Masa molecular: $C_{15}H_{10}ClN_3O$. Carbonos asimétricos: 2* y 3*.

El enantiomero "S" mantiene ciertas similitudes estructurales con el *ent*-kaureno y *ent*-kaurenol, dos compuestos claves en la ruta de biosíntesis de GAs; por lo tanto, puede inhibir las mono-oxigenasas del citocromo P450 que catalizan la oxidación del *ent*-kaureno y *ent*-kaurenol a ácido *ent*-kaurenoico, de tal manera que disminuyen los

niveles de GAs y con ello su actividad biológica (Ribeiro *et al.*, 2011), mostrando las plantas un retraso global en el crecimiento (Sugavanam, 1984).

Bello *et al.* (2010) señalan que el PBZ ha demostrado ser uno de los reguladores de crecimiento más eficaces para modular la organogénesis y la embriogénesis somática en los cultivos *in vitro*. Sin embargo, en el proceso de micropropagación de diversos géneros, tanto el PBZ como el ANC han sido usados exitosamente [*Capsicum* (Bello *et al.*, 2010); *Populus* (Žiauka y Kuusienė, 2010); *Musa* (De Souza *et al.*, 2010; Albany *et al.*, 2005^a); *Dendrobium* (Te-chato *et al.*, 2009); *Vaccinium* (Ross y Castillo, 2009); *Aframomum* (Tefera y Wannakrairoj, 2006); *Lilium* (Thakur *et al.*, 2006); *Hosta* (Maki *et al.*, 2005); *Dioscorea* (Meneses *et al.*, 2000); *Solanum* (Opatrná *et al.*, 1997; Ziv y Shemesh, 1996); *Philodendrom* (Ziv y Ariel, 1991); *Nephrolepsis* (Ziv y Hadar, 1991); *Chrysanthemum* (Smith *et al.*, 1991) y *Gladiolus* (Ziv, 1989 y 1990)].

Rademacher (2000) señala que estos RC (ANC y PBZ) pueden influir de manera distinta en diferentes especies, y ello dependerá de las concentraciones utilizadas. Por otra parte, las diferencias en la respuesta de los brotes a las concentraciones de los RC incorporados en los medios de cultivo, no sólo dependerán de la especie con la cual se trabaja, sino también del estado fisiológico del explante de partida (Te-chato *et al.*, 2009).

Generalmente las concentraciones de los RC en la propagación *in vitro* suelen ser muy bajas en comparación con los otros reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo y también dependen de las condiciones del medio, gelificado o líquido. En medios líquidos se han evaluado concentraciones de ANC inferiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para la micropropagación de *Hosta* "Blue Vision" (Maki *et al.*,

2005) y *Vaccinium corymbosum* en biorreactores (Ross y Castillo, 2009), respectivamente. En medios gelificados, se han estudiado concentraciones muy bajas (menores de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de PBZ para la micropropagación de *Dendrobium* Frederick's (Te-chato *et al.*, 2009). En los SIT se utilizaron concentraciones inferiores a $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANC o PBZ para la multiplicación *in vitro* de banano cv. Gran Enano (Albany *et al.*, 2005^a; Ziv, 2005).

En todas las especies y sistemas evaluados en cultivo *in vitro* utilizando RC, es común observar cambios en la morfología de los tejidos y las plantas cultivadas. Estos cambios se manifiestan en una disminución en la altura de la planta y longitud de las hojas, así como un engrosamiento de tallos y hojas, en algunos casos (De Souza *et al.*, 2010; Žiauka y Kuusienė, 2010; Te-chato *et al.*, 2009; Thakur *et al.*, 2006; Albany *et al.*, 2005^a) y en mayor o menor cuantía, según las concentraciones de los RC (Sarkar *et al.*, 2001).

Los cambios morfológicos que inducen los RC en las plantas cultivadas *in vitro* son considerados por algunos investigadores como transitorios (Sarkar *et al.*, 2001; Albany *et al.*, 2005^b), ya que los brotes retoman su crecimiento y forma habitual, una vez que se transfieren a medios exentos de estos RC, o tras de aplicar GAs en los medios de cultivo (Bello *et al.*, 2010).

Por otra parte, la combinación de reguladores de crecimiento en los medios condiciona la respuesta de los tejidos y brotes cultivados en los mismos. Al respecto, varios investigadores (Maki *et al.*, 2005; Tefera y Wannakrairoj, 2006; Thakur *et al.*, 2006; Gaba *et al.*, 1996) han señalado un incremento en la proliferación de los brotes nuevos en los explantes cultivados debido a la interacción sinérgica entre estos RC (ANC y PBZ) y las citoquininas más utilizadas (BAP y TDZ), en los medios de multiplicación *in vitro*. Este incremento es explicado por el

desvío de nutrientes hacia la formación de nuevos brotes, como consecuencia de la reducción del crecimiento de la lámina foliar en presencia de los RC. Esta respuesta de los cultivos al efecto sinérgico entre los RC y las citoquininas, estará condicionada al balance endógeno de las fitohormonas que alcancen los tejidos cultivados, al estado fisiológico del explante (Te-chato *et al.*, 2009), y al tipo y concentración de los reguladores de crecimiento utilizados.

3.3. Estabilidad genética de las plantas micropropagadas

El cultivo *in vitro* puede ser muy estresante para las células vegetales y puede involucrar eventos mutagénicos durante el transcurso de diversos procesos, especialmente en la formación de callo organogénico y embriogénico, y en la regeneración de plantas, que podrían generar variación de origen nuclear y/o citoplasmático (Silva *et al.*, 2009).

La variación genética en las plantas regeneradas *in vitro* a partir de la planta madre depende de muchos factores, entre ellos: la tasa normal de variación del genotipo, la edad del cultivo (Sánchez y Jiménez, 2009), el tipo de explante (Shuangxia *et al.*, 2008), el sistema de regeneración (Rathore *et al.*, 2011) y hasta las condiciones del ambiente *in vitro* (Araujo *et al.*, 2002), ya que éstas implican el uso de productos químicos y modificaciones de los factores físicos y ambientales para inducir el crecimiento (Bairu y Kane, 2011). Para Bairu *et al.* (2011), Silva *et al.* (2009) y Venkatachalam *et al.* (2007) los reguladores de crecimiento y sus concentraciones en el medio, así como el número y duración de los ciclos *in vitro*, constituyen una de las principales causas de variación genética en plantas micropropagadas.

En general, las plantas micropropagadas podrían sufrir ciertas modificaciones en el genoma y producir plantas *in vitro* diferentes a la planta original (De Lima *et al.*, 2006), por lo que mantener plantas fieles a su tipo es un requisito indispensable para el establecimiento de cualquier metodología de propagación *in vitro* (Bhatia *et al.*, 2011). Por otra parte, aunque la presencia de variantes somaclonales puede ser un problema importante en la micropropagación de plantas (Mamdouh *et al.*, 2014), ésta ha sido utilizada para incrementar la variabilidad genética en programas de mejora, donde se han obtenido variedades comerciales con caracteres agronómicos superiores a los de la planta de origen (Silva *et al.*, 2009).

El estudio de la variación somaclonal en la población de plantas regeneradas es muy importante para garantizar la identidad de las plantas a comercializar (Saha *et al.*, 2014). En tal sentido, Guo *et al.* (2007) señalan que es necesario establecer un sistema de micropropagación que produzca plantas genéticamente idénticas y estables, recomendando utilizar los meristemos axilares como explantes para obtener grandes volúmenes de material de siembra uniforme y reducir el riesgo de la variabilidad somaclonal durante la micropropagación.

A pesar de las amplias ventajas que presenta la micropropagación utilizando yemas axilares como método de clonación rápido para la zábila, es necesario realizar un seguimiento del grado de fidelidad genética de las plantas micropropagadas, para detectar variantes del genotipo que se desea propagar (Samantaray y Maiti, 2008). La sostenibilidad de los sistemas de regeneración con fines de propagación comercial depende del mantenimiento de la integridad genética de las plantas obtenidas (Rathore *et al.*, 2011), siendo imprescindible su valoración para determinar la eficiencia del sistema de regeneración.

La estabilidad genética de las plantas micropropagadas con respecto a la planta madre ha sido estudiada a través de métodos tradicionales evaluando características morfológicas o fisiológicas (De Lima *et al.*, 2006); más recientemente, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares, que superan en la mayoría de los casos las limitaciones de los métodos tradicionales (Silva *et al.*, 2009). En esta línea, los cambios producidos durante el cultivo *in vitro* que no afecten el producto génico de interés o a la actividad biológica del mismo (Palombi y Damiano 2002), sólo pueden ser detectados y caracterizados con el estudio de la variación a nivel del ADN (Mamdouh *et al.*, 2014; De Lima *et al.*, 2006).

3.3.1. Técnicas moleculares para el estudio de la estabilidad genética

Históricamente, los análisis de diversidad o variabilidad genética han estado relacionados con estudios de anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología (Orona *et al.*, 2006). Posteriormente surgen los estudios citológicos convirtiéndose en uno de los métodos primarios para el análisis de la variación somaclonal en muchas especies (Saha *et al.*, 2014) y recientemente, los marcadores moleculares de ADN han demostrado ser más adecuados para establecer la similitud genética, o no, entre las plantas propagadas *in vitro* (Saha *et al.*, 2014; Rathore *et al.*, 2011).

Los análisis moleculares mediante el uso de ADN utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han convertido en una práctica común para el análisis de la variación somaclonal (Guo *et al.*, 2007). La técnica de la PCR se basa en la ocurrencia *in vitro* de una reacción química catalizada por la ADN polimerasa (Meneses y Oloriz, 1998), en la cual se logra sintetizar, multiplicar o amplificar muchas

veces un pedazo o fragmento de ADN, gracias a la termoestabilidad de la ADN polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas; esta enzima proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en altas temperaturas (79 °C a 85 °C), y de ahí su nombre comercial conocido como "Taq polimerasa" (Espinosa, 2007).

La PCR implica la ejecución de una serie repetida de ciclos de reacción, cada uno de los cuales involucra tres fases, la desnaturalización del ADN, la hibridación o alineamiento de los iniciadores a sus secuencias complementarias y la extensión del segmento ADN (Meneses y Oloriz, 1998). La temperatura y el tiempo establecidos para cada fase y el número de ciclos serán específicos para el producto que se desea amplificar (Rodríguez y Barrera, 2004). Los iniciadores o cebadores, son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia de interés de ADN que se desea amplificar y son complementarias a ésta (Tamay *et al.*, 2013). Para Rodríguez y Barrera (2004) estos iniciadores son los componentes más sensibles en la PCR y determinan el éxito de un ensayo, ya que generan los marcadores moleculares de ADN que permiten evaluar la estabilidad e inestabilidad genética de las plantas.

3.3.1.1. Amplificaciones Aleatorias de ADN Polimórfico (RAPD) y Secuencias Simples Internas Repetidas (ISSR)

Los RAPD son amplificaciones aleatorias de ADN polimórfico y se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al iniciador u oligonucleotidos de 10 bases, a lo largo del genoma (Rentarúa, 2007). Los ISSR son marcadores moleculares conocidos como secuencias internas simples repetidas de di o trinucleótidos abundantes en el genoma (Sánchez *et al.*, 2012) y se

caracterizan por ser ligeramente de mayor longitud (16-20 bases) que los RAPD.

Los cambios en la secuencia de nucleótidos en el ADN en los sitios de acoplamiento con estos iniciadores (RAPD e ISSR) y la inserción o delección de fragmentos en estos sitios producen polimorfismos entre los individuos, generándose diferentes patrones de bandeos una vez realizada la electroforesis y tinción de los productos de la PCR. El número de bandas monomórficas o polimórficas observadas permiten valorar la estabilidad o inestabilidad genética de plantas derivadas del cultivo *in vitro*.

Los RAPD e ISSR son los marcadores con frecuencia utilizados en estudios de estabilidad e inestabilidad genética de plantas micropropagadas, por ser unas técnicas sencillas, rápidas (Saha *et al.*, 2014), rentables, altamente discriminatorias, fiables y sólo requieren una pequeña cantidad de ADN; además, no se necesita ninguna información previa sobre la genoma para el diseño de estos iniciadores (Bhatia *et al.*, 2011). Los resultados de algunos estudios de estos parámetros en varias especies de plantas micropropagadas se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Estudios realizados para la evaluación de la estabilidad genética en plantas micropropagadas.

Marcador Molecular	Género o especie	Sistema de regeneración	Número de bandas			Estudio de la estabilidad genética	Referencia
			T	M	P		
RAPD	<i>Aloe vera</i>	Organogénesis adventicia (I)	119	107	12	Inestable	Rathore <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Aloe vera</i>	Organogénesis axilar	119	119	0	Estable	Rathore <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Ceropegia santapau</i>	Organogénesis adventicia (I)	52	52	0	Estable	Chavan <i>et al.</i> , 2014
RAPD	<i>Ceropegia santapau</i>	Organogénesis adventicia (D)	48	48	0	Estable	Chavan <i>et al.</i> , 2014
RAPD	<i>Alpinia galanga</i>	Organogénesis axilar	48	48	0	Estable	Parida <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Bacopa monnieri</i>	Organogénesis axilar	115	108	7	Inestable	Muthiah <i>et al.</i> , 2013
RAPD	<i>Cuphea procumbens</i>	Organogénesis axilar y adventicia	217	217	0	Estable	Fatima <i>et al.</i> , 2012
RAPD	<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>	Organogénesis axilar	162	162	0	Estable	Singh <i>et al.</i> , 2013
RAPD	<i>Gerbera jamesonii</i>	Organogénesis axilar y adventicia (D)	54	54	0	Estable	Bhatia <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Kaempferia galanga</i>	Organogénesis adventicia	83	83	0	Estable	Mohanty <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Mucuna pruriens</i>	Organogénesis axilar	85	85	0	Estable	Sathyanarayana <i>et al.</i> , 2008
RAPD	<i>Musa</i> AAB	Organogénesis adventicia	88	74	10	Inestable	Silva <i>et al.</i> , 2009

(D): Directa. (I): Indirecta. T: totales. M: monomórficas. P: polimórficas

Cuadro 1. Continuación

Marcador Molecular	Género o especie	Sistema de regeneración	Número de bandas			Estudio de la estabilidad genética	Referencia
			T	M	P		
RAPD	<i>Musa acuminata</i>	Organogénesis axilar	377	377	0	Estable	Lakshmanan <i>et al.</i> , 2007
RAPD	<i>Ocimum basilicum</i>	Organogénesis axilar	92	92	0	Estable	Saha <i>et al.</i> , 2014
RAPD	<i>Rauvolfia tetraphylla</i>	Organogénesis axilar	165	165	0	Estable	Faisal <i>et al.</i> , 2012
RAPD	<i>Sapindus trifoliatus</i>	Organogénesis axilar	89	89	0	Estable	Asthana <i>et al.</i> , 2011
RAPD	<i>Solanum tuberosum</i>	Organogénesis axilar	58	58	0	Estable	Tiwari <i>et al.</i> , 2013
RAPD	<i>Stylosanthes capitata</i>	Organogénesis adventicia (D)	95	95	0	Estable	De Lima <i>et al.</i> , 2006
RAPD	<i>Viola patrinii</i>	Organogénesis adventicia (I)	86	86	0	Estable	Chalageri y Babu, 2012
RAPD	<i>Viola pilosa</i>	Organogénesis axilar	17	17	0	Estable	Soni y Kaur, 2014
RAPD	<i>Vitex trifolia</i>	Organogénesis axilar	123	123	0	Estable	Ahmad <i>et al.</i> , 2013
RAPD	<i>Vitis</i> spp.	Organogénesis axilar	84	84	0	Estable	Alizadeh y Singh, 2009
RAPD	<i>Withania somnifera</i>	Organogénesis axilar y adventicia	70	70	0	Estable	Nayak <i>et al.</i> , 2012

(D): Directa. (I): Indirecta. T: totales. M: monomórficas. P: polimórficas

Cuadro 1. Continuación

Marcador Molecular	Género o especie	Sistema de regeneración	Número de bandas			Estudio de la estabilidad genética	Referencia
			T	M	P		
ISSR	<i>Aloe vera</i>	Organogénesis adventicia (I)	73	62	11	Inestable	Rathore <i>et al.</i> , 2011
ISSR	<i>Aloe vera</i>	Organogénesis axilar	73	73	0	Estable	Rathore <i>et al.</i> , 2011
ISSR	<i>Ceropegia santapau</i>	Organogénesis adventicia (D)	39	39	0	Estable	Chavan <i>et al.</i> , 2014
ISSR	<i>Ceropegia santapau</i>	Organogénesis adventicia (I)	44	33	11	Inestable	Chavan <i>et al.</i> , 2014
ISSR	<i>Allium ampeloprasum</i>	Organogénesis axilar	32	32	0	Estable	Gantait <i>et al.</i> , 2010
ISSR	<i>Alpinia galanga</i>	Organogénesis axilar	70	70	0	Estable	Parida <i>et al.</i> , 2011
ISSR	<i>Bacopa monnieri</i>	Organogénesis axilar	130	125	5	Inestable	Muthiah <i>et al.</i> , 2013
ISSR	<i>Cucumis sativus</i>	Adventicia indirecta	34	6	28	Inestable	Mamdouh <i>et al.</i> , 2014
ISSR	<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>	Organogénesis axilar	181	181	0	Estable	Singh <i>et al.</i> , 2013
ISSR	<i>Gerbera jamesonii</i>	Organogénesis axilar y adventicia (D)	55	55	0	Estable	Bhatia <i>et al.</i> , 2011
ISSR	<i>Kaempferia galanga</i>	Organogénesis adventicia	54	54	0	Estable	Mohanty <i>et al.</i> , 2011
ISSR	<i>Lilium orientalis</i>	Organogénesis adventicia	67	63	4	Inestable	Liu y Yang, 2012 ^a

(D): Directa. (I): Indirecta. T: totales. M: monomórficas. P: polimórficas

Cuadro 1. Continuación

Marcador Molecular	Género o especie	Sistema de regeneración	Número de bandas			Estudio de la estabilidad genética	Referencia
			T	M	P		
ISSR	<i>Malus × domestica</i> <i>Borkh</i>	Organogénesis axilar	134	101	33	Inestable	Pathak y Dhawan, 2012
ISSR	<i>Musa acuminata</i>	Organogénesis axilar	47	47	0	Estable	Lakshmanan <i>et al.</i> , 2007
ISSR	<i>Ocimum basilicum</i>	Organogénesis axilar	53	53	0	Estable	Saha <i>et al.</i> , 2014
ISSR	<i>Prunus mume</i>	Organogénesis axilar	49	49	0	Estable	Ning <i>et al.</i> , 2007
ISSR	<i>Psidium guajava</i>	Organogénesis axilar	93	84	9	Inestable	Liu y Yang, 2012 ^b
ISSR	<i>Rauvolfia tetraphylla</i>	Organogénesis axilar	140	140	0	Estable	Faisal <i>et al.</i> , 2012
ISSR	<i>Solanum tuberosum</i>	Organogénesis axilar	56	56	0	Estable	Tiwari <i>et al.</i> , 2013
ISSR	<i>Viola pilosa</i>	Organogénesis axilar	9	9	0	Estable	Soni y Kaur, 2014
ISSR	<i>Vitis</i> spp.	Organogénesis axilar	81	81	0	Estable	Alizadeh y Singh, 2009
ISSR	<i>Withania somnifera</i>	Organogénesis axilar y adventicia	53	53	0	Estable	Nayak <i>et al.</i> , 2012

(D): Directa. (I): Indirecta. T: totales. M: monomórficas. P: polimórficas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental de esta investigación fue dividida en dos etapas; la primera, donde se realizaron los procedimientos para evaluar los principales parámetros técnicos de los sistemas de inmersión temporal en la multiplicación *in vitro* de sábila; y la segunda etapa, donde se emplearon las técnicas moleculares necesarias para el análisis de la estabilidad genética de las vitroplantas de sábila obtenidas en la etapa anterior. Ambas investigaciones fueron realizadas en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología "Silvia León de Sierralta", de la Facultad de Agronomía, de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

4.1. Propagación *in vitro* de sábila

En esta etapa se realizaron un total de cinco experimentos con la finalidad de definir los parámetros técnicos y biológicos para el proceso de multiplicación *in vitro* de sábila utilizando **Retardantes de Crecimiento (RC)** en los medios de cultivo y **Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®])**. En el conjunto de experimentos de esta etapa se realizaron una serie de procedimientos y técnicas generales que se describen después del subapartado de material vegetal.

Material vegetal: El material necesario para los experimentos de la fase de multiplicación se generó siguiendo el procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* descrito por Albany *et al.* (2006). Se seleccionaron entre 25 y 30 hijuelos sanos de una planta de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) identificada como I-24-L, crecida en condiciones de campo en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo de CORPOZULIA del Estado Zulia (latitud Norte 10°49'40" y

longitud Oeste 79°46'31"). Tras la desinfección de los vástagos de zábila se procedió a realizar las manipulaciones *in vitro* y siembra de los explantes en medios de cultivo líquido con puente Heller siguiendo la metodología propuesta por Albany *et al.* (2015). Una vez establecido el material se procedió a su multiplicación realizando cuatro ciclos de cultivo (subcultivos) siguiendo la metodología establecida por Pérez *et al.* (2010) para obtener el número de brotes *in vitro* de zábila necesarios para los experimentos de esta etapa. Estos brotes fueron seleccionados con mínimo de 4 hojas expandidas y una longitud mínima de 4 cm (Fig. 7).



Figura 7. Cultivos *in vitro* de brotes de zábila (*A. barbadensis*) del cuarto ciclo de cultivo para iniciar los experimentos de la etapa de propagación *in vitro*.

4.1.1. Técnicas y procedimientos generales

Manejo de los brotes *in vitro*: Se realizó bajo condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar horizontal (EQU/06-EHC, ESCO[®], EEUU). Para las disecciones de los tejidos en los experimentos *in vitro* se utilizaron pinzas, bisturíes y placas de Petri previamente esterilizadas en autoclave a 121 °C y 1,2 kg·cm⁻² durante 30 min y secadas en estufa a 70 °C por 8 h. Los instrumentos de disección (pinzas y bisturíes) fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v), entre cada manipulación de los brotes *in vitro*.

Medios de Cultivo: Como medio de cultivo básico (MB) se utilizó el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 100 mg·L⁻¹ de mioinositol, 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg·L⁻¹ de cisteína y 30 g·L⁻¹ de sacarosa.

Para la fase de multiplicación se utilizó el medio de cultivo propuesto por Pérez *et al.* (2010) basado en el MB con 1 mg·L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) pero en estado líquido, denominándose en adelante medio básico de multiplicación (MBM). En algunos casos se incorporó un tratamiento de medio de cultivo gelificado con 4 g·L⁻¹ de Agargel (Sigma[®]), por ser el método convencional para la propagación *in vitro* de zábila.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5,8 ± 0,1 antes de la esterilización en autoclave a 121 °C y 1,2 kg·cm⁻². El tiempo de esterilización para los medios de cultivo contenidos en envases tipo RITA[®] fue de 30 min y en los tubos de ensayo de 50 mL de capacidad y frascos de vidrio de 100 mL de capacidad, fue de 20 min. La esterilización de las soluciones concentradas de los retardantes de crecimiento (ancimidol y paclobutrazol) se realizó por filtración con jeringa y filtro de acetato de celulosa (MFS 25), ambos estériles dentro

de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas y posteriormente se adicionó a cada envase que contenía el medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave.

Los cultivos en medio líquido se colocaron en un agitador orbital (Environmental incubator shaker, New Brunswick Scientific, N.J., USA) a 100 rpm y los **Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)** utilizados fueron los de la marca comercial RITA[®], desarrollados en Montpellier, Francia por el laboratorio Biotrop del CIRAD (**C**entre de **C**oopèration **I**nternationale en **R**eserche **A**gronomique pour le **D**èveloppement). Para el funcionamiento de los SIT se emplearon electroválvulas de una sola vía controladas por un temporizador programable de un canal, un compresor de aire libre de aceite y mangueras reforzadas con derivaciones tipo "T" hacia cada sistema. El esquema de funcionamiento de los RITA[®] se indica en la Figura 3 (apartado 3.2.2.1.).

Condiciones de cultivo *in vitro*: Las condiciones ambientales del área de crecimiento para el desarrollo de los cultivos *in vitro* fue de una temperatura media de 26 ± 2 °C, humedad relativa de 45 ± 2 % y suministro de luz blanca fluorescente con radiación fotosintéticamente activa de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Medidas de peso y longitud: Todas las mediciones expresadas en valores de distancia (mm) se realizaron con un vernier digital (Electronic Digital Caliper) y los valores de peso (g) fueron obtenidos mediante el uso de una balanza de precisión (EK-120A, A&D CO., Japón).

Todos los datos de las variables evaluadas fueron registrados y almacenados en un ordenador, en una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Office Professional Plus, 2010).

4.1.2. Comparación del ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) como retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de zábila

Se diseñó un experimento totalmente al azar para comparar el efecto del Paclobutrazol (PBZ) y Ancimidol (ANC) como Retardantes del Crecimiento (RC) a una concentración predeterminada de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el MBM en estado líquido con agitación continua. Se incluyeron dos tratamientos adicionales; el primero en medio líquido en agitación continua y el segundo en medio gelificado, ambos constituidos por el MBM sin retardante del crecimiento (cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos diseñados para evaluar el efecto de los retardantes de crecimiento (RC) paclobutrazol (PBZ) y ancimidol (ANC), a una concentración de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el medio de cultivo líquido en agitación continua para la multiplicación *in vitro* de zábila.

Tratamiento	Medio básico de multiplicación (MBM)
T ₁	MBM líquido + $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de PBZ
T ₂	MBM líquido + $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANC
T ₃	MBM líquido sin RC
T ₄	MBM gelificado sin RC

Se utilizaron frascos de vidrio con 20 mL del medio de cultivo según el tratamiento y en cada uno de ellos se colocaron 3 brotes *in vitro* de zábila del cuarto ciclo de cultivo; representando cada brote una unidad experimental y cada frasco una repetición. Se establecieron 10 repeticiones por cada tratamiento para un total de 40 frascos y 120 explantes. Una vez transcurridos 30 días de cultivo, se evaluó una variable morfológica (formación de conglomerados de brotes) y cuatro variables de producción de los brotes *in vitro* cultivados, que se describen a continuación:

- Formación de conglomerado de brotes: Presencia de conglomerados o agregados de nuevos brotes *in vitro* pequeños y compactos alrededor de la base del brote cultivado, denominado en algunos casos "cluster" (Fig. 8).



Figura 8. Apariencia del conglomerado o cluster de zábila (*A. barbadensis*). El círculo amarillo encierra el conjunto de nuevos brotes *in vitro* pequeños y compactos alrededor de la base del brote cultivado, lo que se denominó "conglomerado".

- Número de brotes nuevos: formados a partir de cada brote cultivado.
- Longitud del brote: Distancia medida en milímetros (mm) desde la parte basal del brote cultivado hasta el extremo distal de su hoja más larga.
- Peso fresco: Valor promedio obtenido del peso total en gramos (g) de todos los brotes (cultivados y nuevos) de cada repetición (frasco o RITA[®]), dividido entre el número de brotes cultivados por repetición.

- **Peso seco:** Valor promedio obtenido del peso total en gramos (g) de todos los brotes (cultivados y nuevos) de cada repetición (frasco o RITA[®]), secados en estufa a 60 ± 2 °C durante 72 horas (parcialmente seco); divididos entre el número de brotes cultivados por repetición.

4.1.3. Determinación de la concentración de ancimidol (ANC) en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila

Basado en los resultados obtenidos de la evaluación anterior se seleccionó el ANC como retardante de crecimiento. Para evaluar las concentraciones de 0; 1; 2,5 y 5 mg·L⁻¹ de ANC en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] se diseñó un experimento totalmente aleatorizado (cuadro 3), con una frecuencia y tiempo de inmersión predeterminados de 4 veces·día⁻¹ (cada 6 horas) y 1 min; respectivamente. Para ampliar la evaluación del ANC en la propagación *in vitro* de zábila se incluyó un tratamiento en medio de cultivo gelificado, por ser el método convencional descrito para la propagación de esta especie.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar las concentraciones de ancimidol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) para la multiplicación *in vitro* de zábila.

Tratamiento	Concentraciones de ANC en el medio de cultivo
T ₁	MBM + 0 mg·L ⁻¹ de ANC
T ₂	MBM + 1 mg·L ⁻¹ de ANC
T ₃	MBM + 2,5 mg·L ⁻¹ de ANC
T ₄	MBM + 5 mg·L ⁻¹ de ANC
T ₅	MBM Gelificado sin ANC

En cada RITA[®] se introdujeron 10 brotes *in vitro* de zábila del cuarto ciclo de cultivo que contenían 250 mL del MBM con las

respectivas concentraciones de ancimidol a evaluar y se utilizaron 5 RITA[®] (repeticiones) por cada tratamiento. Para el tratamiento en medio gelificado sin ANC, se utilizaron 5 frascos de vidrio (repeticiones) con 20 mL del MBM en el que se sembraron 3 brotes *in vitro* de zábila de la misma edad de cultivo.

Transcurridos 30 días de cultivo, se evaluaron las variables morfológicas y de producción de los brotes cultivados, descritas en el experimento anterior.

4.1.4. Evaluación del tiempo y frecuencia de inmersión en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila con ANC

Para determinar el tiempo y la frecuencia de inmersión en los RITA[®], se diseñó un experimento factorial con dos niveles de estudio para cada factor: tiempo de inmersión (1 y 2 min) y frecuencia de inmersión (2 y 4 veces·día⁻¹) (cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos para determinar el tiempo y la frecuencia de inmersión en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila con 1 mg·L⁻¹ de ANC.

Tratamiento	Programa de inmersión	
	Tiempo (min)	Frecuencia (veces·día ⁻¹)
T ₁	1	2
T ₂	2	2
T ₃	1	4
T ₄	2	4

Para cada tratamiento se utilizaron 5 RITA[®] (repeticiones) con 250 mL de MBM que contenía 1 mg·L⁻¹ de ANC como concentración del RC seleccionada del experimento anterior. En cada RITA[®] se

introdujeron 10 brotes *in vitro* de zábila del cuarto ciclo de cultivo para un total de 20 RITA[®] y 200 brotes *in vitro*. Después de 30 días de cultivo se evaluaron las variables morfológicas y de producción de los brotes cultivados: número de brotes, longitud del brote, peso fresco y peso seco, descritas en el experimento de comparación de retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de zábila.

4.1.5. Efecto de la cantidad de brotes en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila con ANC

Se diseñó un experimento aleatorizado con 5 repeticiones (RITA[®]) por tratamiento para evaluar la influencia de la cantidad de brotes *in vitro* de zábila (6, 8, 10 y 12) sembrados en los RITA[®] (cuadro 5) que contenían 250 mL de MBM con 1 mg·L⁻¹ de ANC. Los brotes seleccionados para esta evaluación pertenecían al cuarto ciclo de cultivo.

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos para evaluar la cantidad de brotes *in vitro* de zábila sembrados en los RITA[®] para la multiplicación con ANC.

Tratamiento	Cantidad de brotes <i>in vitro</i> sembrados en los RITA [®]
T ₁	6
T ₂	8
T ₃	10
T ₄	12

Los RITA[®] se programaron a frecuencia de inmersión de 2 veces·día⁻¹ durante 1 min, según los resultados del experimento anterior. Transcurridos 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables morfológicas y de producción de los brotes cultivados: número de brotes, longitud del brote, peso fresco y peso seco, descritas en el

primer experimento de comparación de retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de zábila.

4.1.6. Estudio comparativo de variables morfológicas y de producción antes y después de la fase de enraizamiento utilizando brotes de zábila multiplicados con y sin ANC en los RITA[®]

Para evaluar el efecto residual del retardante de crecimiento (ANC) se compararon las variables morfológicas y de producción al inicio y al final del proceso de la fase de enraizamiento de los brotes multiplicados en los RITA[®] con y sin RC. Estos brotes fueron obtenidos de la multiplicación inicial de 10 brotes cultivados en los RITA[®] que contenían 250 mL de MBM sin y con 1 mg·L⁻¹ ANC. Se utilizaron 5 RITA[®] con y sin RC (cuadro 6), programados a un tiempo de inmersión de 1 min con una frecuencia de 2 veces·día⁻¹. Transcurridos 30 días de cultivo se seleccionaron de forma aleatorizada 15 brotes de cada RITA[®], para un total de 75 brotes (repeticiones) por cada tratamiento.

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos para comparar, en la fase de enraizamiento, brotes multiplicados en los RITA[®], con y sin Ancimidol (ANC).

Tratamiento	Procedencia del brote para el enraizamiento
T ₁	Multiplicados en RITA [®] con ANC
T ₂	Multiplicados en RITA [®] Sin ANC

Para el enraizamiento, los 75 brotes de cada tratamiento fueron cultivados en tubos de ensayo que contenían 15 mL de MB sin reguladores de crecimiento en estado líquido con soporte de papel de filtro (puente Heller).

En la evaluación del efecto residual del RC en los brotes multiplicados con y sin ANC, se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con 75 repeticiones, donde se evaluaron una variable de producción (número de hojas) y cinco variables morfológicas al inicio de la fase de enraizamiento, descritas a continuación:

- Número de hojas: Se contabilizaron todas las hojas de cada brote.
- Longitud del brote: Distancia medida en milímetros (mm) desde la parte basal del brote hasta el extremo distal de su hoja más larga (Fig. 9 a).
- Diámetro del brote: Distancia medida en milímetros (mm) del diámetro externo ubicado en la base del brote (Fig. 9 b).
- Longitud de la hoja: Distancia medida en milímetros (mm) desde la base de la hoja central del brote hasta el extremo distal de la hoja central (Fig. 9 c).
- Ancho de la hoja: Distancia medida en milímetros (mm) entre los bordes en la zona media de la hoja central del brote (Fig. 9 d).
- Grosor de la hoja: Distancia medida en milímetros (mm) comprendida entre la cara adaxial y abaxial en la zona media de la hoja central del brote (Fig. 9 e).

Al cabo de 35 días de cultivo en la fase de enraizamiento se realizó la evaluación final de las variables descritas anteriormente (Fig. 9), incluyendo el número de raíces emitidas por cada brote.

Los brotes enraizados fueron colocados en bandejas de aclimatación con un sustrato compuesto de arena lavada y materia orgánica en proporción 2:1 v/v, manteniendo la identificación de los brotes según su procedencia (multiplicados con o sin ANC).

Las bandejas de aclimatación fueron ubicadas en un área del laboratorio para mantener las condiciones ambientales controladas y garantizar el crecimiento y calidad fitosanitaria de las vitroplantas de zábila para los posteriores análisis moleculares.

4.1.7. Análisis estadístico en la propagación *in vitro* de zábila

La distribución normal de los datos de las variables dependientes se corroboró mediante la prueba de Shapiro-Wilk; aquellos datos de las variables que no mostraron una distribución normal se ajustaron mediante las transformaciones que se especifican en cada caso.

En la comparación del ANC y PBZ como retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de zábila los valores de la variable formación de conglomerado de brotes fueron transformados por la función matemática del coseno del valor de la variable y la variable número de brotes con la función matemática de la raíz cuadrada del valor más uno.

En la determinación de la concentración de ANC en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila, los valores de las variables longitud del brote, número de brotes y el peso seco fueron transformados por la función matemática de la raíz cuadrada del valor más uno.

En el efecto de la cantidad de brotes *in vitro* en los RITA[®] para la multiplicación de zábila con ANC, los valores de la variable longitud del brote fueron transformados con la función matemática del logaritmo en base diez del valor de la variable más uno y los valores del número de brotes, fueron transformados con la función matemática de la raíz cuadrada del valor más uno.

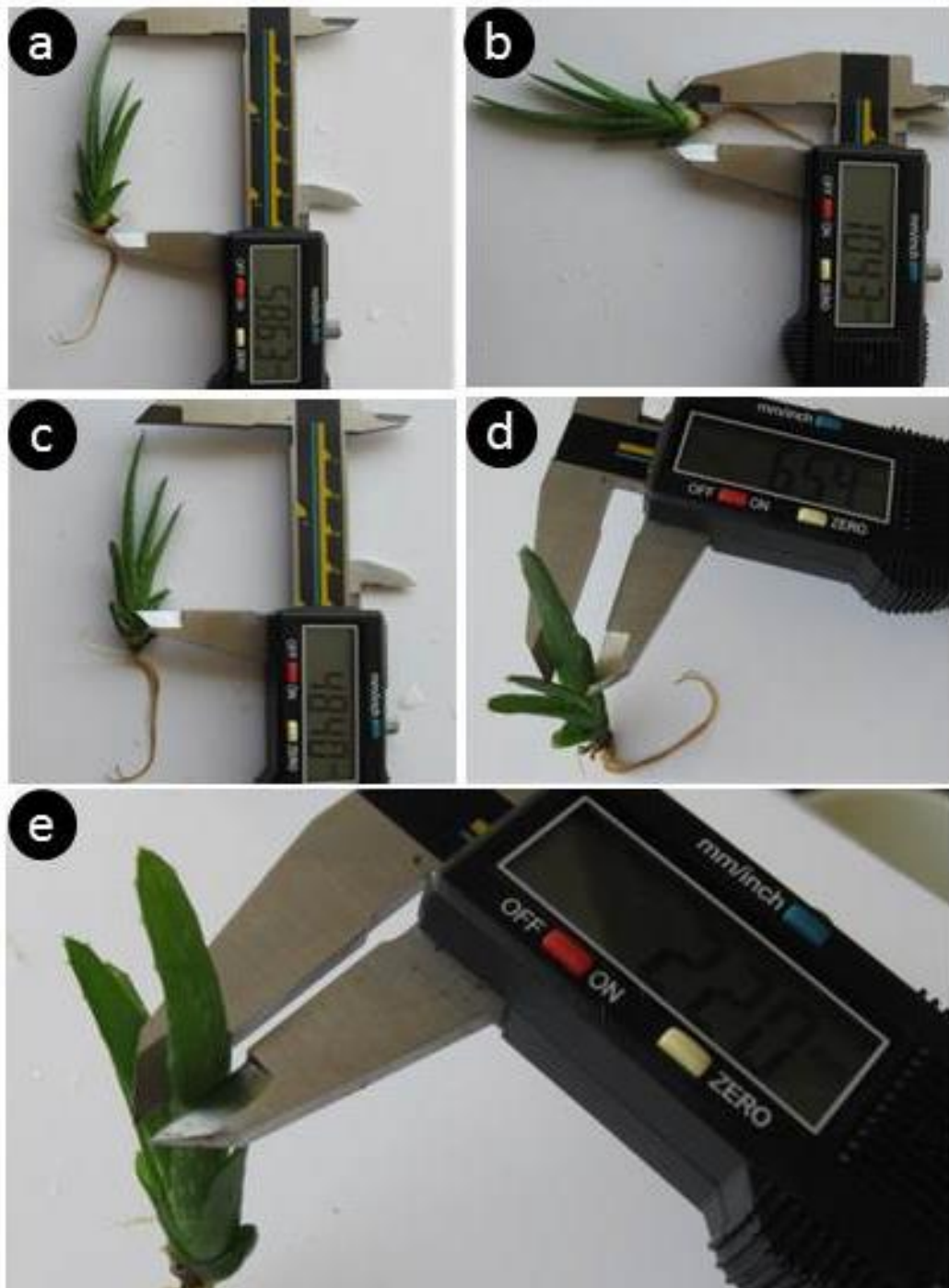


Figura 9. Variables morfológicas medidas en los brotes de zábila (*A. barbadensis*). (a) Longitud del brote. (b) Diámetro del brote. (c) Longitud de la hoja. (d) Ancho de la hoja. (e) Grosor de la hoja.

Para determinar el efecto de los factores de estudio sobre las variables descritas en cada experimento de la propagación *in vitro* de zábila se realizó el análisis de la varianza al nivel de significación de $p < 0,01$ ó $p < 0,05$. Se realizó la prueba de comparación de medias de *Tukey* para distinguir y agrupar los valores medios de las variables que resultaron estadísticamente diferentes y/o similares entre sí.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computarizado Statistix versión 8.0 (Statistix, 2003) para ambiente Microsoft® Windows.

4.2. Técnicas moleculares para el análisis de la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila

En la segunda etapa de la investigación se realizaron primeramente extracciones de ADN del tejido foliar de vitroplantas de Zábila obtenidas del protocolo de propagación *in vitro* desarrollado en la primera etapa de la investigación y posteriormente se desarrollaron las PCR con iniciadores de tipo RAPD e ISSR.

4.2.1. Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se seleccionaron 14 vitroplantas de Zábila (V_1 a V_{14}) de forma aleatorizada con 180 días de aclimatación en macetas, provenientes del proceso de multiplicación *in vitro* en los RITA® con retardante de crecimiento. De igual manera se seleccionó un hijuelo (H), obtenido de la propagación convencional de la misma planta madre (I-24L) que dió origen a las vitroplantas, con características similares a éstas en cuanto a longitud y número de hojas. Esto hizo un

total de 15 plantas de zábila seleccionadas e identificadas (Fig. 10) para el estudio molecular.

En condiciones de asepsia, utilizando guantes de latex e instrumentos esterilizados (placas de Petri, pinzas y bisturí) se seleccionó una hoja joven de igual apariencia en cuanto a longitud y grosor, de cada planta seleccionada. Las hojas fueron cortadas y desinfectadas con una solución de NaClO al 3 % v/v durante 2 min, enjuagadas con suficiente agua destilada-estéril y colocadas sobre la placa de Petri con una pinza estéril.



Figura 10. Grupo de plantas de zábila (*A. barbadensis*) provenientes de la multiplicación *in vitro* con ancimidol (ANC) seleccionadas para el estudio molecular.

Manteniendo las condiciones de asepsia se eliminó el margen dentado y espinoso de la hoja con un bisturí (Fig. 11 a), seguido de una incisión transversal justo debajo de la epidermis de la cara adaxial de la hoja (Fig. 11 b). Luego se insertó un alambre fino y estéril soportado en un Flosbrush[®] (mango de auto dispensación de hilo dental) (Fig. 11 c) y se deslizó a lo largo de la hoja (Fig. 11 d), para obtener una lámina delgada con la menor cantidad posible de gel, constituida por: la cutícula, la epidermis y las células parenquimatosas; que en lo sucesivo se denominará tejido foliar (Fig. 11 e). Seguidamente, se cortaron círculos de 0,5 cm de diámetro de la zona media-basal del tejido foliar (Fig. 11 f), utilizando un bisturí y una plantilla colocada debajo de la placa de Petri para delimitar el área seccionada. Cada círculo de tejido foliar de peso comprendido entre 50 y 55 mg, fue introducido en un tubo nuevo y estéril de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad, previamente identificado según la procedencia del tejido foliar (vitroplantas e hijuelo).

El círculo de tejido foliar constituyó el material vegetal requerido para el proceso de extracción de ADN (Doyle y Doyle, 1990) con modificaciones. Los pasos y procedimientos para la extracción de ADN se describen a continuación:

1. Se añadieron 500 μ L de la solución tampón de extracción 1 X [2 % CTAB; 100 mM Tris-HCl (pH 8); 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1 % PVP 40; 0,2 % de 2-mercaptoetanol], a cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contenía el círculo de tejido foliar.
2. Se homogeneizaron las muestras con un pistilo azul estéril (Thomas Scientific, EEUU) durante 5 segundos aproximadamente utilizando un taladro (DW503, Dewalt[®], Brasil).

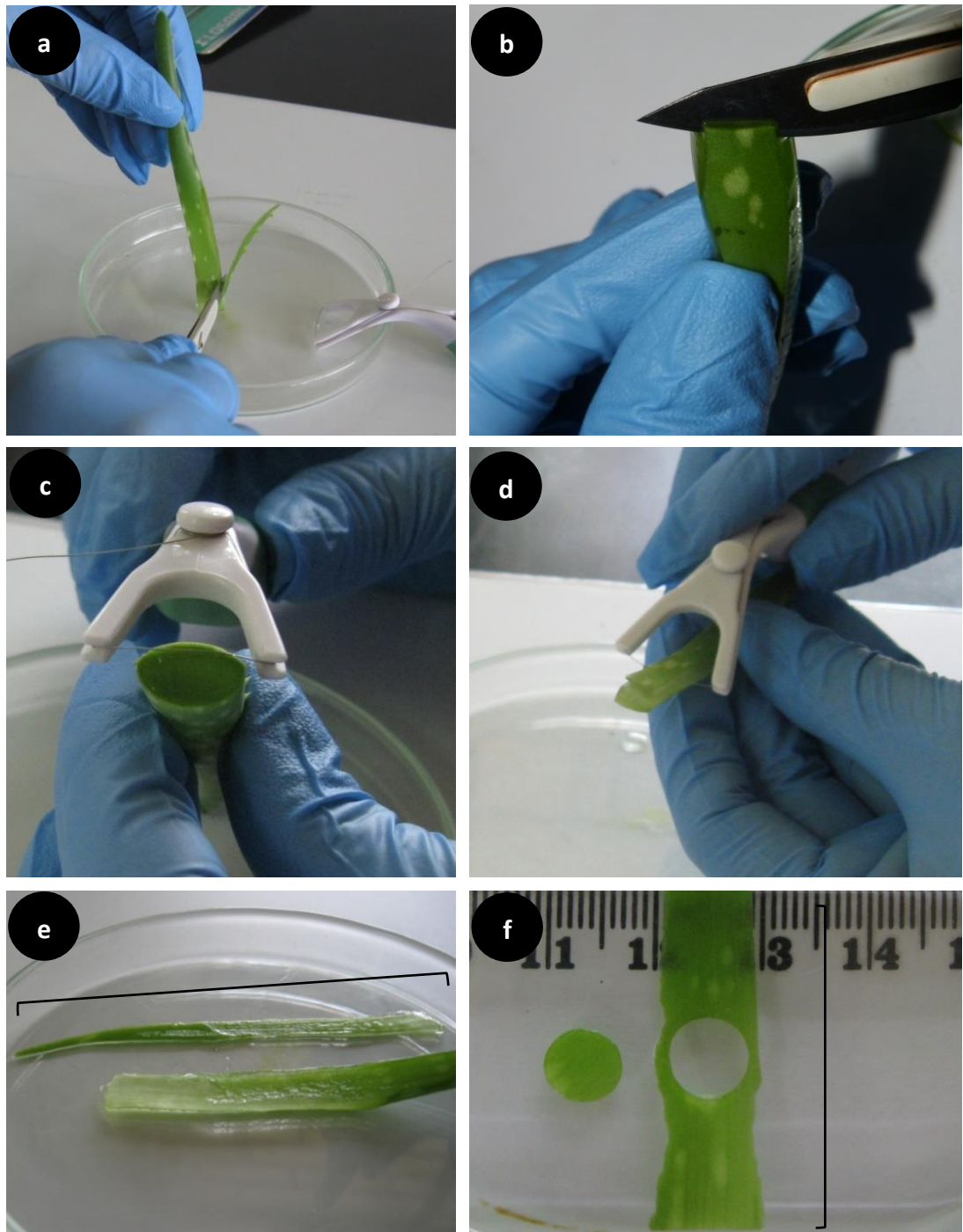


Figura 11. Proceso de extracción del tejido foliar de zábila (*A. barbadensis*). (a) Corte del margen dentado y espinoso de la hoja con bisturí. (b) Incisión transversal debajo de la epidermis de la cara adaxial de la hoja. (c) Inserción del alambre fino y estéril con el Flosbrush®. (d) Recorrido del alambre a lo largo de la hoja. (e) La línea negra indica la lámina completa del tejido foliar seleccionado. (f) La línea negra indica la zona media-basal del tejido foliar donde se corta el círculo de 0,5 cm de diámetro para la extracción de ADN.

3. Se incubaron las muestras en baño de María durante 30 min a 65 °C.
4. A cada tubo de microcentrífuga se le agregaron 500 µL de una solución recién preparada de Cloroformo:isoamil en proporción de 24:1 v/v, seguido de una agitación en vortex por pocos segundos.
5. Se centrifugaron las muestras a 18400 *g* durante 5 min.
6. Se recuperó la fase acuosa de cada tubo de microcentrífuga 340 µL (2 veces 170 µL) y fue transferida a un tubo nuevo y estéril de microcentrífuga previamente identificado.
7. Se le agregaron 8,5 µL de ARNasa (4 mg·mL⁻¹), para una concentración final de 100 µg de ARNasa por cada 1 mL de fase acuosa (Romano y Miranda, 1999).
8. Posteriormente las muestras fueron incubadas en la estufa a 37 °C durante 30 min.
9. Se adicionó a cada tubo de microcentrífuga 500 µL de isopropanol frío (4 °C) y luego se invirtió el tubo de 5 a 10 veces.
10. Las muestras fueron incubadas a -20 °C durante 30 min.
11. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 18400 *g* y 4 °C, durante 15 min.
12. De cada tubo de microcentrífuga se descartó el sobrenadante y se le agregaron 500 µL de etanol al 100 % frío (4 °C).
13. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 18400 *g* y 4 °C, durante 5 min.
14. De cada tubo de microcentrífuga se descartó el sobrenadante y se colocaron en la estufa a 40 °C hasta evaporar el etanol.
15. Finalmente los precipitados deshidratados de las extracciones de ADN (*pellet*) fueron conservados a -20 °C.

4.2.1.1. Concentración, pureza e integridad del ADN extraído

Los *pellet* de ADN fueron resuspendidos a temperatura ambiente del laboratorio ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) con $40\text{ }\mu\text{L}$ de solución tampón esterilizada de TE-8 [10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA], previamente ajustada a pH 8.

Las soluciones de ADN fueron cuantificadas con un espectrofotómetro UV-visible (Bioware DNA, WPA, Cambridge, RU) que permite obtener directamente la concentración de ADN en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y el valor de pureza mediante la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ para cada muestra.

La integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis horizontal en geles de $0,8\%$ de agarosa, utilizando una cámara de electroforesis Mini Run GE-100 (Bioer technology CO, LTD) y una solución tampón de corrida TBE $0,5\text{ X}$ [89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA] a pH 8. En cada celda del gel se adicionaron $3\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de ADN resuspendida y $3\text{ }\mu\text{L}$ del colorante de corrida [azul naranja 6 X y glicerol (G190A), Promega]; previamente mezclados. En la celda de un carril externo se colocó una mezcla del colorante de corrida y el marcador de peso molecular de 1 kb de ADN (Promega) en una proporción de $2:1\text{ v/v}$; respectivamente.

La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio a una concentración de $0,0015\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Méndez *et al.*, 2010) y las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (UV/White Ligth transmilluminator, UVP, Cambridge, RU) para estimar la integridad del ADN extraído por la intensidad y definición de la banda, así como el barrido o arrastre de la misma en los geles de agarosa.

4.2.2. Amplificación del ADN de zábila utilizando PCR-RAPD y PCR-ISSR

Todas las PCR (RAPD y ISSR) se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura (ependorf®) a un volumen final de reacción de 25 µL. Las concentraciones utilizadas de la solución tampón green GoTaq® flexi buffer (M891A, Promega), DNTPs (U1515, Promega), GoTaq® flexi ADN polimerasa (M829A, Promega), MgCl₂ (A351B, Promega), para cada uno de los iniciadores fueron previamente optimizadas (Albany, 2014) y se especifican en el cuadro 7, al igual que las concentraciones de ADN de zábila estandarizadas en el estudio.

Cuadro 7. Componentes y cantidad en la reacción de 25 µL para la amplificación del ADN de zábila en la PCR.

Iniciador	Componentes y cantidad (µL) en la reacción de PCR					
	Tampón 5X	MgCl ₂ 25 mM	DNTPs 10 mM	Iniciador 10 µM	GoTaq® 5 u/µL	ADN ng/Rx
RAPD						
OPC-01	5	3	0,5	2,5	0,125	5
OPC-02	5	3	0,5	2,5	0,125	7
OPC-19	5	3	0,5	2,5	0,125	2,5
OPC-20	5	3	0,5	2,5	0,125	10
OPA-07	5	3	0,5	2,5	0,125	10
OPA-09	5	3	0,5	2,5	0,125	2,5
OPAE-01	5	2	0,25	0,5	0,125	10
OPAE-10	5	2	0,25	0,5	0,125	10
OPAE-19	5	2	0,25	0,5	0,125	3
OPL-07	5	2	0,25	0,5	0,125	10
OPR-18	5	2	0,25	0,5	0,125	10
ISSR						
ISSR-E	5	3	0,5	1	0,125	2,5
ISSR-F	5	3	0,5	1	0,1	5

De un total de 27 RAPD y 3 ISSR evaluados con anterioridad (Albany, 2014) se seleccionaron 11 RAPD y 2 ISSR que lograron amplificar el ADN de zábila con los programas para el funcionamiento del termociclador previamente determinados y que se describen en el cuadro 8.

Cuadro 8. Descripción de los iniciadores RAPD y ISSR con sus respectivas temperatura de hibridación (Th) y programa de funcionamiento en la PCR para la amplificación del ADN de zábila.

Descripción de los iniciadores				Programa en la PCR					
Iniciador	Secuencia de 5' a 3'	Th _c °C	Th °C	D _I	D _c	H _c	E _c	E _f	N _c
				Tiempo minutos (') segundos (")					
RAPD									
OPC-01	TTCGAGCCAG	32	32	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPC-02	GTGAGGCGTC	34	34	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPC-19	GTTGCCAGCC	34	34	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPC-20	ACTTCGCCAC	32	32	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPA-07	GAAACGGGTG	32	36	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPA-09	GGGTAACGCC	34	34	5'	1'	50"	1'	7'	40
OPAE-01	TGAGGGCCGT	34	36	3'	1'	1'	2'	4'	45
OPAE-10	CTGAAGCGCA	32	36	3'	1'	1'	2'	4'	45
OPAE-19	GACAGTCCCT	32	36	3'	1'	1'	2'	4'	45
OPL-07	AGGCGGGAAC	34	36	3'	1'	1'	2'	4'	45
OPR-18	CCCGTTGCCT	34	36	3'	1'	1'	2'	4'	45
ISSR									
ISSR-E	(GA) ₆ GG	44	44	5'	30"	30"	1'	4'	35
ISSR-F	(GA) ₆ CC	44	44	5'	30"	30"	1'	4'	35

Th_c: Temperatura de hibridación teórica calculada. D_I: Desnaturalización inicial. D_c: Desnaturalización en cada ciclo. H_c: Hibridación en cada ciclo. E_c: Extensión en cada ciclo. E_f: Extensión final. N_c: Número de ciclos.

4.2.2.1. Visualización de los productos amplificados del ADN de zábila en la PCR-RAPD y PCR-ISSR

Se colocaron 10 µL de los productos de la PCR-RAPD y PCR-ISSR en cada orificio del gel de 1,5 % de agarosa dentro de la cámara de electroforesis (Mini Run GE-100, Bioer technology CO, LTD) y cubierto con la solución tampón de corrida TBE 0,5 X (descrita en el apartado 2.1.1). En el orificio del extremo derecho del gel se colocó una mezcla de marcadores de pesos moleculares de 1 kb y/o de 100 pb de ADN (Promega) en proporción 1:1 v/v según el iniciador utilizado.

La electroforesis se inició a 100 voltios durante los primeros 10 min y luego se disminuyó a 50 voltios hasta finalizar la corrida electroforética, el tiempo promedio de la electroforesis fue de 60 min. Una vez finalizada la electroforesis se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio [$0,0015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Méndez y *et al.*, 2010)] durante 2 min, seguido del lavado del gel con agua destilada durante 10 min.

Los productos de la amplificación fueron visualizados en el transiluminador (UV/White Light transilluminator, UVP, Cambridge, RU) y la imagen del gel fue digitalizada y almacenada en el ordenador para su posterior análisis.

4.2.2.2. Registro y análisis de los productos amplificados del ADN de zábila

Se registraron todos los segmentos amplificados de ADN zábila en la PCR-RAPD y PCR-ISSR (bandas), que fueron visualizados en las imágenes digitalizadas de los geles de agarosa.

Se determinó el patrón de bandeo para cada vitroplanta (V_1 a la V_{14}) e hijuelo (H) según el número de bandas y peso molecular de cada banda. El número de bandas se determinó contabilizando la cantidad de bandas visualizadas en una misma muestra y el peso molecular de cada banda fue estimado a través de una ecuación de regresión lineal en el programa Excel (Microsoft Office Professional Plus, 2010), obtenida por la distancia recorrida de cada banda del marcador molecular y su peso molecular.

Se determinó el número de bandas monomórficas y polimórficas según el patrón de bandeo para cada uno de los marcadores moleculares generados entre las vitroplantas (V_1 - V_{14}) e hijuelo de zábila. Se definieron como bandas monomórficas, aquellas bandas que se encontraron presentes en todas las muestras y polimórficas cuando en al menos una de las muestras se registró la ausencia de la banda.

El porcentaje de bandas polimórficas (% BP) se calculó dividiendo el número de bandas polimórficas, entre el número de bandas totales por iniciador o conjunto de iniciadores, por cien. Además se calculó el nivel de polimorfismo, dividiendo el número total de bandas polimórficas obtenidas para el conjunto de plantas (14 vitroplantas y el hijuelo) entre el número total de bandas generadas por cien.

La presencia o ausencia de bandas se usó para la construcción de una matriz binaria (1: presencia y 0: ausencia) del conjunto de marcadores moleculares utilizando una hoja de cálculo en el programa Excel (Microsoft Office Professional Plus, 2010).

En el análisis estadístico de los marcadores moleculares, se utilizó la matriz binaria de presencia-ausencia de bandas para obtener el coeficiente de Jaccard y generar la matriz de similitud genética y el

dendrograma jerárquico por el método UPGMA (***U**nweighted **P**air **G**roup **M**ethod with **A**rithmetic **M**ean*) con el programa estadístico PAST 3.05 (Hammer *et al.*, 2001).

5. RESULTADOS Y DICUSIÓN

5.1. Propagación *in vitro* de zábila

Los principales parámetros técnicos y biológicos de la multiplicación *in vitro* de zábila en los RITA[®] con retardante de crecimiento en el medio de cultivo fueron determinados con los resultados obtenidos en los cinco experimentos de la primera etapa de esta investigación, que a continuación se presentan y discuten:

5.1.1. Comparación del ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) como retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de zábila

La incorporación de los retardantes de crecimiento ANC y PBZ, a una concentración de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el MBM líquido en agitación continua, afectaron todas las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila cultivados *in vitro* a un nivel de significación de $p < 0,01$. La adición de cualquiera de los dos RC al medio de cultivo líquido estimuló la formación de conglomerados de brotes pequeños y compactos en la base del brote (Fig. 12 a y b), observándose que el ANC fue capaz de inducir la formación de conglomerados en más de la mitad de los brotes cultivados y la cantidad de éstos resultó dos veces mayor (0,73) que la cantidad de conglomerados de brotes obtenidos con PBZ (0,33) (cuadro 9). Los brotes desarrollados en los medios de cultivo sin RC crecieron de forma aislada y con mayor altura, por lo que no fueron considerados como conglomerados de brotes (Fig. 12 c y d).

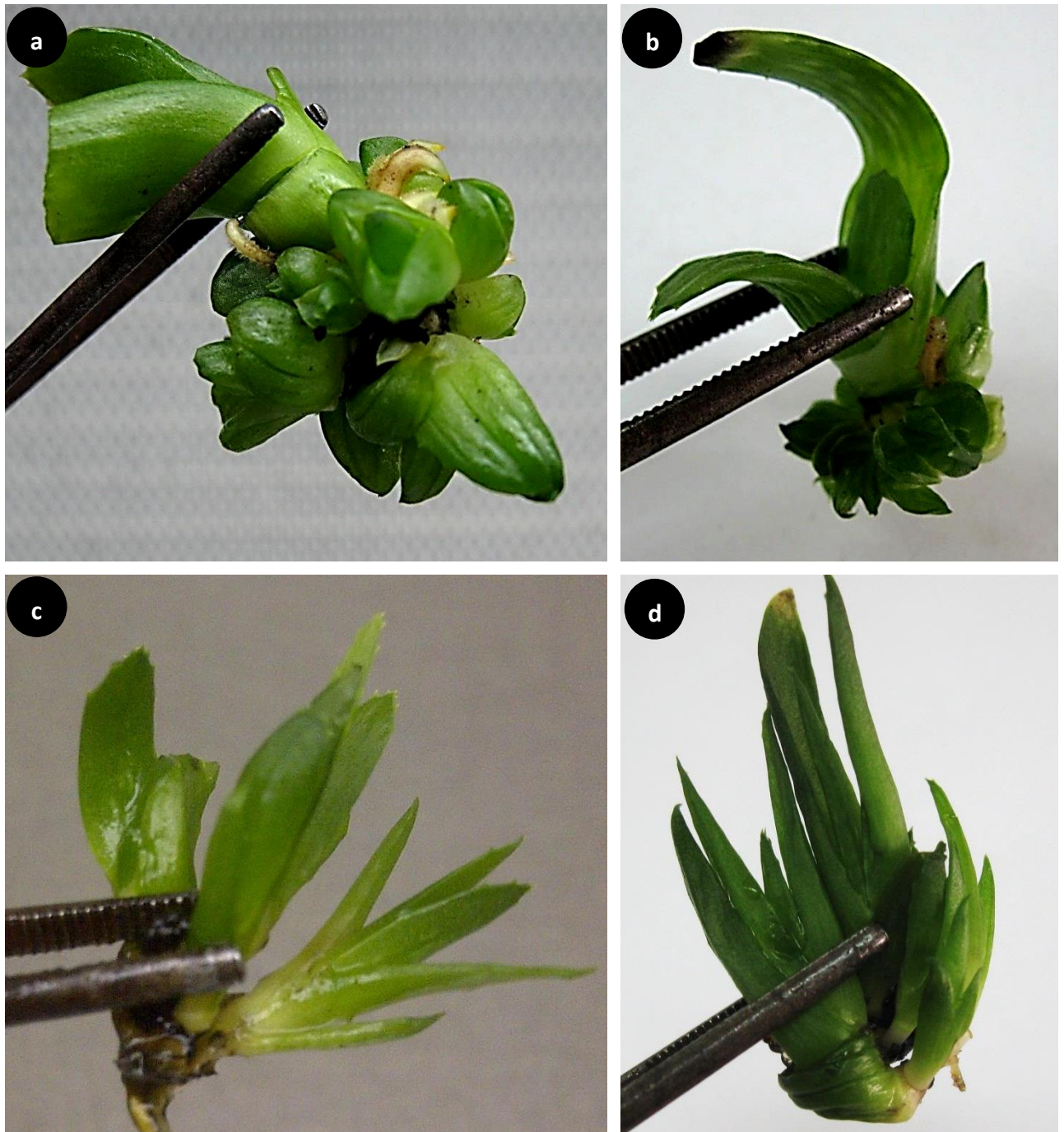


Figura 12. Brotes de zábila (*A. barbadensis*) cultivados y conglomerados de brotes nuevos obtenidos con y sin retardantes de crecimiento (RC) en el medio básico de multiplicación (MBM). (a) Con $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ancimidol en MBM líquido en agitación. (b) Con $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de paclobutrazol en MBM líquido en agitación. (c) Sin RC en el MBM líquido en agitación. (d) Sin RC en MBM gelificado.

Cuadro 9. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación *in vitro* con retardantes de crecimiento (RC) paclobutrazol (PBZ) y ancimidol (ANC) a una concentración de 2,5 mg·L⁻¹ en el medio básico de multiplicación líquido en agitación y gelificado.

Medio básico de multiplicación (MBM)	Formación de conglomerado de brotes	Número de brotes	Longitud del brote (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
MBM líquido con 2,5 mg·L ⁻¹ de PBZ	0,33 ^b	2,40 ^b	25,75 ^b	0,89 ^a	0,045 ^a
MBM líquido con 2,5 mg·L ⁻¹ de ANC	0,73 ^a	4,13 ^a	26,50 ^b	0,94 ^a	0,045 ^a
MBM líquido sin RC	0,00 ^c	1,93 ^b	33,83 ^a	0,97 ^a	0,047 ^a
MBM gelificado sin RC	0,00 ^c	1,90 ^b	32,59 ^a	0,51 ^b	0,030 ^b
MG	0,26	2,59	29,67	0,83	0,042
CV (%)	17,22	21,00	20,60	23,96	19,32

Valores seguidos de letras distintas dentro de la misma columna difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

El mismo comportamiento de la variable anterior se observó para el número de brotes con la adición de los RC en los medios de cultivo, destacándose que la mayor cantidad de brotes se originó en aquellos medios que contenían ANC (4,13 brotes) seguidos de los que contenían PBZ (2,40) y los tratamientos sin RC resultaron con el número de brotes más bajo y sin diferencias estadísticas entre ellos (cuadro 9). Por otro lado la longitud del brote fue superior en los medios de cultivo sin RC, cuando se compararon con los brotes que crecieron en presencia de ANC y PBZ, sin diferencias significativas entre estos RC (cuadro 9).

La respuesta morfológica en los brotes cultivados de zábila con los RC fue la disminución de la longitud del brote, aumento del grosor y desarrollo de hojas nuevas, pequeñas y plegadas, mientras que los nuevos brotes formados eran de menor tamaño y compactos, con hojas escasamente desarrolladas, conformando la estructura morfológica que fue denominada conglomerado (Fig. 8), muy posiblemente asociada al

efecto inhibitorio de los RC sobre la biosíntesis de giberelinas (GAs), tal como han señalado Bello *et al.* (2010) y Thakur *et al.* (2006). Según Redemacher (2000), las GAs son las hormonas que regulan el crecimiento en altura en las plantas. El efecto inhibitorio del ANC fue demostrado por Chen y Ziv (2004) al cuantificar la cantidad de GAs en extractos de hojas de los brotes de *Narcissus* cultivados *in vitro* sin y con ANC durante 4 semanas, obteniendo niveles hasta 20 veces menores de GAs en los extractos de hojas de los brotes cultivados con 2,5 mg·mL⁻¹ de ANC.

Esta respuesta morfológica también es descrita por Te-chato *et al.* (2009), quienes indicaron que los cambios que induce el PBZ en el crecimiento de los brotes de *Dendrobium*, están asociados a una disminución en la altura de planta y de las hojas, siendo éstas más gruesas y los tallos de mayor diámetro. Efectos similares de reducción del tamaño de los brotes *in vitro* fueron también observados cuando se utilizó PBZ en dos cultivares de banano (Prata-Anã y FHIA 01) (De Souza *et al.*, 2010) y en los brotes de *Populus tremula* (Žiauca y Kuusiené, 2010).

Thakur *et al.* (2006) señalaron que tanto el ANC como el PBZ ocasionaron un acortamiento y engrosamiento de las plántulas *in vitro* de *Lilium* al bloquear los pasos en la ruta biosintética de las GAs que estimulan la elongación celular, al igual que Albany *et al.* (2005^a) en brotes *in vitro* de banano cv. Gran enano, quienes destacaron que los clusters de brotes se caracterizaron por ser compactos, pequeños, con hojas plegadas y de pseudotallo engrosado, sólo en los medios que contenían ANC y PBZ.

Este mismo efecto inhibitorio de los RC sobre las GAs pudiera estar relacionado directamente con el incremento del número de brotes *in vitro* de zábila obtenidos con ANC y PBZ; acentuado por la interacción

sinérgica entre estos RC y la citoquinina (BAP), utilizada en los medios de cultivo de multiplicación *in vitro*, que ha sido señalada por otros autores en otras especies (Maki *et al.*, 2005; Tefera y Wannakrairoj, 2006; Thakur *et al.*, 2006; Gaba *et al.*, 1996). En esta línea, Velcheva *et al.* (2005) lograron regenerar brotes *in vitro* mediante la inducción de callos de la base de la inflorescencia de *Aloe arborescens*, utilizando diferentes combinaciones de BAP y ANC.

El efecto sinérgico entre las citoquininas y los retardantes de crecimiento ha sido reportado en otras especies propagadas *in vitro*. Tal es el caso de Maki *et al.* (2005) quienes puntualizaron que el uso de ANC en presencia de BAP desvió la elongación de la lámina foliar hacia la formación de nuevos brotes de *Hosta*, obteniendo un mayor número de brotes. Tefera y Wannakrairoj (2006) observaron el mismo efecto sinérgico sobre la proliferación de brotes *in vitro* de *Aframomum corrori*, pero al combinar PBZ con BAP o TDZ (Tiadizuron); Thakur *et al.* (2006) en *Lilium* con BAP y ANC o PBZ, y Gaba *et al.* (1996) en *Cucumis melo* con ANC y bajos niveles de BA.

Un aspecto interesante observado en los brotes de zábila que crecieron en los medios de cultivo que contenían ANC o PBZ, fue el aumento de la tonalidad del color verde, también señalado en la literatura para otras especies. Al respecto Te-chato *et al.* (2009) observaron un verde más oscuro en las plantas *in vitro* de *Dendrobium* tratadas con PBZ y De Souza *et al.* (2010) hacen referencia a que las plantas tratadas con PBZ generalmente tienen hojas de color verde más intenso, lo que sugiere un mayor contenido de clorofila; esto podría tener dos posibles causas, la primera que las plantas tratadas y no tratadas tienen el mismo número de células, pero debido a que las células de las plantas tratadas son más pequeñas, la clorofila se encuentra más concentrada; y la segunda, es que se incrementa la

cantidad de clorofila, ya que al inhibir la síntesis de GAs, algunos metabolitos intermedios (terpenoides) de esa ruta, metabólica son precursores de la cadena lateral de fitol, que forma parte esencial de la molécula clorofila.

Es indudable que tanto el ANC como el PBZ influyeron en el crecimiento y desarrollo de los brotes de zábila cultivados *in vitro*, reduciendo su tamaño y promoviendo una mayor formación de brotes nuevos, pequeños y compactos. La reducción de la longitud de los brotes cultivados y el tipo de crecimiento de los nuevos brotes en forma de conglomerados en presencia de los RC, representan una ventaja para las manipulaciones *in vitro* en la fase de multiplicación, ya que los cortes que deben realizarse a los brotes nuevos para el siguiente ciclo de multiplicación serían menores y más sencillos, tal como lo señalan Albany *et al.* (2005^a), al referirse a la facilidad en las manipulaciones *in vitro* cuando se utilizan los RC que minimizan el crecimiento excesivo de los brotes de banano en los RITA[®]; además, se aumenta la eficiencia, al disminuir la producción de tejido que será descartado en el siguiente ciclo de multiplicación.

Los resultados obtenidos demuestran que el ANC en comparación con el PBZ, duplica la producción de brotes y la formación de conglomerados de brotes en un sólo ciclo de cultivo (cuadro 9), estas diferencias pudieran estar relacionadas con la capacidad que posee el ANC y PBZ de penetrar en los tejidos o de inhibir la biosíntesis de las GAs. Žiauka y Kuusiené (2010) señalan que el ANC es un compuesto que contiene fracciones heterocíclicas de nitrógeno derivadas de las pirimidinas y el PBZ es un derivado de los triazoles; pero ambos RC inhiben la enzima *ent*-kaureno oxidasa (Rademacher, 2000) en la ruta de síntesis de las GAs (Ross y Castillo, 2009; Khunachak *et al.*, 1987). Además, el ANC no sólo está considerado como un fuerte inhibidor de

las GAs por la interrupción en su síntesis sino también porque puede interferir en la acción directa de estas hormonas (Khunachak *et al.*, 1987) o pueden afectar los niveles de otras fitohormonas (Ospina *et al.*, 2005). Estas pudieran ser las razones por las cuales el ANC estimuló una mayor producción de conglomerados y brotes de zábila que el PBZ.

Basado en los resultados obtenidos para el número de brotes, unido a la ventaja que representa la reducción en la longitud de los brotes cultivados y la formación de conglomerados para facilitar las manipulaciones *in vitro*, es indudable que el uso de ANC permitiría aumentar el número de plantas de zábila propagadas por cultivo de tejidos en menor tiempo y con menor cantidad de brotes iniciales, logrando una mayor eficiencia en el sistema de micropropagación para esta especie.

Las variables peso fresco y peso seco no fueron influenciadas por los RC, pero sí por la condición del medio de cultivo (líquido en agitación o gelificado). Los valores de peso fresco y peso seco fueron superiores en los medios de cultivo líquidos en comparación con los valores obtenidos en los medios gelificados (cuadro 9). En esta línea, Maki *et al.*, (2005) señalaron que el aumento del peso fresco y seco en brotes *in vitro* de *Hosta*, no fue consecuencia directa del efecto del ANC, sino al mayor consumo de sacarosa en medio líquido durante las ocho semanas de cultivo.

Es importante destacar que tanto el peso fresco como el peso seco han sido poca veces considerados como variables de estudio en las últimas investigaciones relacionadas con la multiplicación *in vitro* y RC. Sin embargo, cuando comenzaron las propuestas de los medios líquidos con la incorporación de RC, para la multiplicación *in vitro*, se evaluaron estas variables en *Gladiolus* (Ziv, 1989 y 1990), *Nephrolepis exaltata* (Ziv y Hadar, 1991), *Philodendron* (Ziv y Ariel, 1991), *Solanum*

tuberosum (Ziv y Shemesh, 1996) y en los cultivares de *Musa* Gran Enano y Williams (Ziv *et al.*, 1998), obteniéndose un incremento del peso fresco en todos los casos, con resultados variables en el peso seco.

En los casos anteriores todos los autores asociaron el aumento del peso fresco y seco a la condición de los medios de cultivo líquidos; especialmente, Chen y Ziv (2001) quienes indicaron que el aumento de la biomasa obtenido en brotes cultivados de *Narcissus* fue probablemente debido a una mejor aireación en el medio líquido agitado (70 rpm), sin relacionar esta ganancia de biomasa con la incorporación de ANC (2,5 mg·mL⁻¹) al medio de cultivo; esto explicaría el aumento del peso fresco y seco en esta investigación, ya que todos los brotes desarrollados en los medios de cultivo líquido agitados a 100 rpm, mostraron un aumento en ambas variables, independientemente del uso de los retardantes de crecimiento, ANC o PBZ.

Por todo lo anteriormente discutido se seleccionó el ANC como RC para la fase de multiplicación *in vitro* de zábila.

5.1.2. Determinación de la concentración de ancimidol (ANC) en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila

Las concentraciones evaluadas de ANC afectaron todas las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila cultivados *in vitro* con un nivel de significación de $p < 0,01$. El ANC como retardante de crecimiento en el MBM estimuló la formación de conglomerados de nuevos brotes de zábila en la totalidad de los tratamientos en que fue incluido independientemente de las concentraciones (cuadro 10 y Fig. 13 c y d). Los brotes que fueron cultivados en los medios de cultivo líquido y gelificado donde no se

incluyó el ANC, no formaron conglomerados de brotes y se caracterizaron por desarrollar brotes más delgados y de mayor altura (Fig. 13 a y b).

Cuadro 10. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación *in vitro* con las concentraciones de 0; 1; 2,5 y 5 mg·L⁻¹ de ancimidol (ANC), en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]).

Concentración de ANC en el MBM	Formación de conglomerado de brotes	Número de brotes	Longitud del brote (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
MBM en RITA [®] con 0 mg·L ⁻¹ de ANC	0,00 ^b	5,73 ^b	57,13 ^a	4,35 ^a	0,218 ^b
MBM en RITA [®] con 1 mg·L ⁻¹ de ANC	0,96 ^a	7,93 ^a	22,00 ^c	5,06 ^a	0,251 ^{ab}
MBM en RITA [®] con 2,5 mg·L ⁻¹ de ANC	1,00 ^a	7,57 ^a	19,44 ^{cd}	4,84 ^a	0,223 ^b
MBM en RITA [®] con 5 mg·L ⁻¹ de ANC	1,00 ^a	7,55 ^a	16,60 ^d	5,77 ^a	0,382 ^a
MBM gelificado sin ANC (control)	0,00 ^b	4,33 ^b	40,49 ^b	1,55 ^b	0,093 ^c
MG	0,67	7,02	30,46	4,31	0,233
CV (%)	15,01	21,84	11,12	22,52	26,24

Valores seguidos de letras distintas dentro de la misma columna difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

El número de brotes como variable de producción mostró el mismo comportamiento que la formación de conglomerados. Los tratamientos de los medios de cultivo que tenían ANC indujeron la formación de mayor cantidad de brotes nuevos, independientemente de la concentración utilizada, a diferencia de los medios de cultivo líquido y gelificado, que no incluían el RC, que mostraron la menor cantidad de brotes y sin diferencias estadísticas entre ellos (cuadro 10). La respuesta biológica obtenida de los brotes cultivados de zábila en presencia del ANC en este experimento corrobora los resultados obtenidos en el experimento anterior (cuadro 9).



Figura 13. Brotes de zábila (*A. barbadensis*) cultivados y conglomerados de brotes nuevos obtenidos con y sin ancimidol (ANC) en el medio básico de multiplicación (MBM) gelificado y líquido en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]). (a) Brotes obtenidos en medio gelificado sin ANC. (b) Brotes obtenidos en medio líquido en RITA[®] sin ANC. (c) Conglomerado de brotes obtenidos en medio líquido en RITA[®] con 1 mg·L⁻¹ de ANC. (d) Conglomerado de brotes obtenidos en medio líquido en RITA[®] con 2,5 mg·L⁻¹ de ANC. (e) Conglomerado de brotes obtenidos en medio líquido en RITA[®] con 5 mg·L⁻¹ de ANC.

Ziv (2005) y Maki *et al.* (2005) señalaron que todas las concentraciones de ANC evaluadas produjeron conglomerados, de brotes de banano en sistemas de inmersión temporal y de brotes de *Hosta* medios de cultivo líquido agitado, respectivamente; en ambas especies, se incrementó el número de brotes a medida que aumentaron la concentración de ANC, tendencia que no fue observada en esta investigación (cuadro 10). Contrariamente Ross y Castillo (2009) no mejoraron el número de brotes al utilizar concentraciones de 0,1; 0,25 y 0,5 mg·L⁻¹ de ANC en dos variedades de *Vaccinium corymbosum* en SIT y aireación permanente; indicando que estas concentraciones quizás resultaron demasiado bajas como para promover la formación de conglomerados de brotes, posiblemente debido a los niveles endógenos de las fitohormonas los cuales difieren en gran medida entre las diferentes especies. Rademacher (2000) señala que las concentraciones de RC pueden influir de manera diferente en diferentes especies de plantas.

Te-chato *et al.* (2009) hacen énfasis en que las diferencias en la respuesta de los brotes a las concentraciones de los RC incorporados en los medios de cultivo, dependen de la especie con la cual se trabaja y del estado fisiológico del explante de partida, ya que podrían marcar la diferencia en el equilibrio endógeno de las fitohormonas. Por lo tanto, el estado fisiológico de los brotes de zábila cultivados *in vitro* con los reguladores de crecimiento, ANC y BAP, en balance con las fitohormonas endógenas, pudieran ser los determinantes en la formación de conglomerados con mayor cantidad de brotes nuevos observados en esta investigación.

El efecto inhibitorio del ANC sobre las GAs señalado por otros autores (Žiauka y Kuusiené, 2010; Thakur *et al.*, 2006; Gaba *et al.*, 1996) y lo anteriormente expuesto referente al balance hormonal,

puede explicar el comportamiento de la longitud del brote para todos los tratamientos de este experimento; ya que los brotes cultivados en los medios de cultivo que incluyeron el ANC mostraron variaciones apreciables entre las diferentes concentraciones de ANC (cuadro 10), respondiendo ello, quizás a las diferencias logradas entre el equilibrio o balance entre las concentraciones endógenas de las hormonas y las concentraciones exógenas de los reguladores de crecimiento incluidos en los medios de cultivo (ANC y BAP) para su evaluación. Como era de esperar, todos los brotes cultivados en los medios de cultivo con ANC resultaron de menor longitud que los brotes crecidos en los medios de cultivo que no tenían el RC, bien sea en estado líquido en los RITA[®] o en el medio gelificado (cuadro 10). En esta línea, Maki *et al.*, (2005), señalan que todas las concentraciones de ANC evaluadas produjeron brotes de *Hosta in vitro* más pequeños, con hojas más pequeñas y gruesas en comparación a los brotes que crecieron en los medios sin ANC; por su parte, Ziv (2005) indicó que las concentraciones de 1; 2,5 y 5 mg·L⁻¹ de ANC en los biorreactores, disminuyeron la elongación y la expansión foliar de los brotes de banano. Sarkar *et al.* (2001) trabajando con medios de cultivo gelificados para la conservación *in vitro* de brotes de patata observaron una disminución gradual en la altura del microtallo con las concentraciones crecientes de ANC.

Los resultados de esta investigación al igual que los obtenidos por los autores antes señalados ponen de manifiesto que el ANC en los medios de cultivo causa un efecto directo en la disminución de la altura de los brotes cultivados *in vitro*; pero que otros elementos del medio de cultivo o la condición de éstos pueden variar la respuesta de la longitud de los brotes en presencia o no del ANC; tal es el caso de Sarkar *et al.* (2001) con la concentración de sacarosa y de esta investigación con el empleo de los RITA[®] en comparación con sistemas de cultivo en medio sólido.

La longitud de los brotes cultivados en los RITA[®] sin el ANC, fue mayor que la observada en medio gelificado o en líquido en los RITA[®] suplementado con ANC. Esta respuesta pudiera estar directamente relacionada con las condiciones que ofrecen los RITA[®] como son: facilidad para absorber los nutrientes, aireación del medio y renovación de la atmosfera gaseosa, que se origina con cada inmersión y que favorecen el crecimiento de los brotes. Esta afirmación ha sido mencionada por Ziv (2005), quien señala que los SIT o biorreactores tienen varias ventajas en comparación con cultivos basados en el uso de agar, ya que proporciona un mejor contacto del con el medio de cultivo, aporta un suministro óptimo de nutrientes y reguladores de crecimiento, así como mejora la aireación, circulación y absorción del medio de cultivo. De Feria *et al.* (2003) también describen las ventajas de los SIT resaltando que el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes causa en éstos una estimulación en la toma de nutrientes, ya que la mayoría del tiempo los explantes están cubiertos por una fina película de medio de cultivo lo que impide la desecación, por lo tanto, hay poca resistencia a la difusión de los gases y en consecuencia una mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante y la atmósfera. Por todas las ventajas antes mencionadas los RITA[®] se han convertido en uno de los SIT más utilizados en la micropropagación de especies de interés comercial (Georgiev *et al.*, 2014). Las ventajas que ofrecen los RITA[®], especialmente en el crecimiento longitudinal de los brotes de zábila *in vitro* han sido demostradas con anterioridad por Vilchez *et al.* (2007) y Albany *et al.* (2015).

El incremento en la longitud de los brotes *in vitro* en los RITA[®] u otros tipos de sistemas de inmersión temporal ha sido señalado en otras especies, entre ellas, *Psidium guajava* (De Feria *et al.*, 2003), *Eucalyptus* (Alister *et al.*, 2005), *Dioscorea alata* (Salazar y Hoyos,

2007) y *Xanthosoma sagittifoli* (Vilchez *et al.*, 2011). Por su parte, Ross y Castillo (2009), en *Vaccinium corymbosum*, lograron una longitud de los brotes hasta dos veces mayor en los RITA[®], que cuando usaron un sistema de inmersión y aireación permanente, a diferentes concentraciones de ANC, lo que demuestra una vez más las ventajas de los RITA[®] para promover mayor crecimiento longitudinal de los brotes en ausencia de ANC y a su vez, se confirma la capacidad del ANC para inhibir la síntesis de GAs, ocasionando una disminución en el crecimiento longitudinal de los brotes.

La variable peso fresco mostró un comportamiento similar al experimento anterior; y su respuesta igualmente se relacionó con la condición del medio de cultivo, pero en este caso, con las ventajas que ofrecen los RITA[®] se incrementó en, al menos, un 35 % del peso fresco con respecto al medio gelificado; a su vez, se puso de manifiesto que las concentraciones del ANC no afectaron esta variable (cuadro 10).

Los valores de peso seco a diferencia de los valores de peso fresco mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos que incluyeron el ANC en los RITA[®], pero igualmente los mayores valores fueron obtenidos en todos los tratamientos en los que se emplearon los RITA[®], siendo éstos superiores a los valores de peso seco obtenidos en el medio gelificado sin ANC (cuadro 10). En los trabajos realizados por Salazar y Hoyos (2007) en *Dioscorea alata*, González *et al.* (2011) en *Eucalyptus globulus* y Chakrabarty *et al.* (2007) en el cultivar "M9 EMLA" de manzana, se evidenció el incremento del peso fresco y seco obtenidos en diferentes SIT incluyendo los RITA[®].

Es evidente que los valores de peso fresco y peso seco están principalmente influenciados por las condiciones que brindan los RITA[®], que favorecen la asimilación de los nutrientes del medio de cultivo por parte de los brotes. Estas condiciones de los RITA[®] que ofrecen

ventajas para el crecimiento y desarrollo de los brotes *in vitro* han sido reportadas desde la innovación de los SIT por Alvard *et al.* (1993) y posteriormente corroboradas por Etienne y Berthouly (2002) y De Feria (2003). En esta línea, Takayama y Akita (2005) recopilaron información de varios cultivos micropropagados (*Fragaria*, *Lilium*, *Gladiolus*, *Spathiphyllum*, *Colocasia* y *Solanum*) en diferentes SIT, en los cuales se muestran las ventajas que ofrecen estos sistemas para el crecimiento *in vitro*, en comparación con los cultivos en medios gelificados.

En esta investigación, los valores de peso seco fueron afectados por las diferentes concentraciones del retardante de crecimiento (ANC) incorporado a los medios de cultivo, posiblemente debido a una mayor concentración de los nutrientes en células más pequeñas, producto de la poca elongación de las mismas por el efecto inhibitorio de los RC sobre la biosíntesis de las GAs, tal y como señala Te-chato *et al.* (2009), en la micropropagación de *Dendrobium* con el retardante de crecimiento PBZ.

Una vez analizados los resultados obtenidos en esta investigación, en conjunto con los resultados e indicios señalados por otros autores en investigaciones relacionadas con el cultivo de tejidos utilizando los SIT, es oportuno confirmar que el empleo de los RITA[®] con cualquiera de las concentraciones de ANC en los medios de cultivo, estimularon la formación de conglomerados con mayor número de brotes, mayor peso fresco y seco, con una disminución de la longitud del brote cultivado, que favorecen la multiplicación *in vitro* de zábila. Se ha seleccionado la concentración más baja de ANC ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ya que ésta permite un ahorro en los costos de producción del medio de cultivo, aumentando así la eficiencia del proceso y minimizando el riesgo de inducir cambios genéticos por efecto de las altas concentraciones de los reguladores de

crecimiento, que puedan alterar en mayor cuantía el balance hormonal endógeno de los tejidos y con ello vulnerar los procesos metabólicos.

5.1.3. Evaluación del tiempo y frecuencia de inmersión en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila con ANC

Los efectos del tiempo, la frecuencia de inmersión y la combinación de ambos en los RITA[®] con ANC fueron altamente significativos ($p < 0,01$) para las variables, longitud del brote, peso fresco y peso seco. La variable número de brotes sólo resultó afectada por el tiempo de inmersión ($p < 0,01$).

Cuando se empleó el menor tiempo de inmersión en los RITA[®] (1 min) se produjo el mayor número de brotes, el mayor peso fresco y peso seco, independientemente de las frecuencias, siendo el número de brotes la variable determinante en la fase de multiplicación. Sin embargo, para la variable altura del brote todas las combinaciones de tiempo y frecuencia de inmersión, mostraron valores altos con la excepción de la combinación de 2 min y 2 veces·día⁻¹ (cuadro 11).

Estos resultados son consistentes con las investigaciones sobre multiplicación *in vitro* de zábila en los RITA[®], realizadas por Vilchez *et al.* (2007) y Albany *et al.* (2015), quienes obtienen los mejores resultados con los menores tiempos de inmersión (1 min), y frecuencias de 3 veces·día⁻¹ (Vilchez *et al.*, 2007) y de 3 y 4 veces·día⁻¹ (Albany *et al.*, 2015). Etienne y Berthouly (2002) señalan que el tiempo y la frecuencia de inmersión son los factores críticos para la alta eficiencia biológica en los SIT.

Cuadro 11. Valores medios de las variables de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación *in vitro* con 1 mg·L⁻¹ de ancimidol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) programados con diferentes tiempos y frecuencias de inmersión.

Programa de Inmersión	Número de brotes	Longitud del brote (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
1 min 4 veces·día ⁻¹	11,11 ^a	17,29 ^a	5,31 ^a	0,240 ^a
2 min 4 veces·día ⁻¹	8,63 ^b	18,06 ^a	4,09 ^b	0,202 ^b
1 min 2 veces·día ⁻¹	10,33 ^{ab}	17,59 ^a	5,51 ^a	0,249 ^a
2 min 2 veces·día ⁻¹	9,70 ^{ab}	13,62 ^b	2,89 ^c	0,139 ^c
MG	9,94	16,64	4,45	0,207
CV (%)	14,23	12,30	10,60	7,01

Valores seguidos de letras distintas dentro de la misma columna difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

Pérez *et al.* (1998) indicaron que los tiempos y las frecuencias de inmersión han demostrado ser eficientes cuando son bastante espaciados, es decir bajas frecuencias y poco tiempo, lo que en esta investigación coincide con la combinación de 1 min y 2 veces·día⁻¹ (cuadro 11).

La alta eficiencia biológica de los SIT está determinada por la mejor combinación del tiempo y la frecuencia de inmersión, ya que es lo que gobierna el consumo de nutrientes (Berthouly y Etienne, 2005), así como la renovación de la atmósfera dentro del recipiente, aumentando el suministro de oxígeno y eliminando la acumulación de gases nocivos en el recipiente de cultivo, lo que favorece el crecimiento de los tejidos (Etienne y Berthouly, 2002).

Sin duda las ventajas de los RITA[®] para incrementar la producción *in vitro* de zábila ha sido demostrada en este experimento; pero es

importante señalar que en todas las combinaciones de tiempo y frecuencia de inmersión en los RITA[®], el medio de cultivo contenía 1 mg·L⁻¹ de ANC y 1 mg·L⁻¹ de BAP, y se observó una vez más el efecto inhibitorio del ANC sobre las GAs, al inducir la formación de conglomerados de brotes nuevos en todos los RITA[®], independientemente de la combinación de tiempo y frecuencia de inmersión evaluada (Fig. 14).

El efecto sinérgico entre el ANC y la BAP nuevamente indujo una mayor producción de brotes en este experimento superando la decena de brotes nuevos en los RITA[®], siendo esta cifra muy superior a los valores obtenidos por Vilchez *et al.* (2007) y Albany *et al.* (2015), que no superaron las 3 unidades de brotes nuevos cuando utilizaron sólo la BAP como regulador de crecimiento en los RITA[®] o las 3-5 unidades en otros sistemas de cultivo basados en medios líquidos con diferentes citoquininas (Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna, 2004).

5.1.4. Efecto de la cantidad de brotes en los RITA[®] para la multiplicación *in vitro* de zábila con ANC

La cantidad inicial de brotes cultivados en los RITA[®], en la multiplicación de zábila con ANC, afectó significativamente ($p < 0,01$) a todas las variables de producción final, a excepción de la variable peso fresco.

Cuando se colocaron 10 brotes en cada RITA[®] se observó un incremento en el conjunto de variables evaluadas, resaltando el número de brotes nuevos por ser la variable de mayor interés para la multiplicación *in vitro*, la cual superó en 1,94; 2,04 y 1,33 veces, el número de brotes con respecto a los valores obtenidos con 6, 8 y 12 brotes cultivados en los RITA[®], respectivamente (cuadro 12).

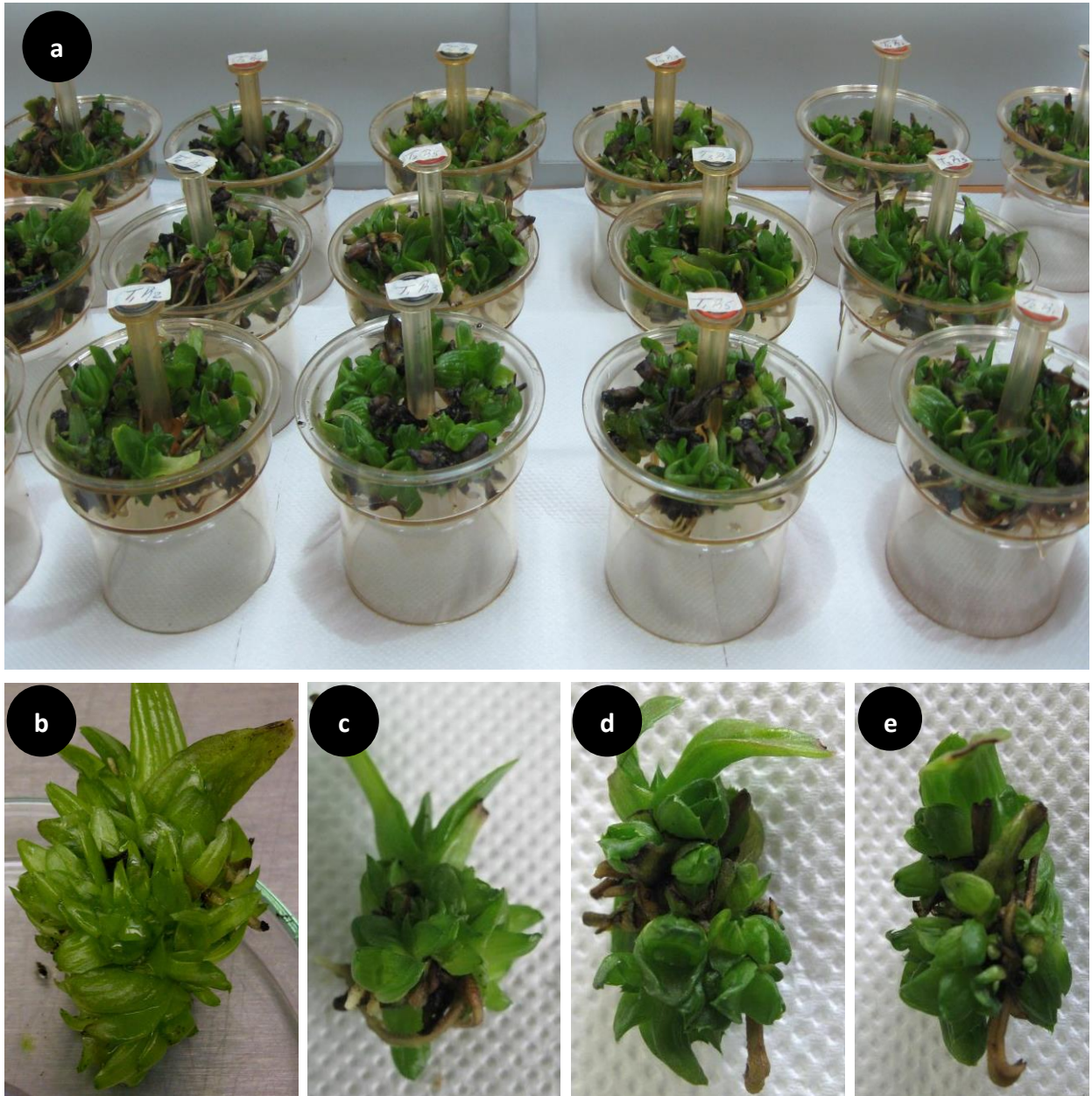


Figura 14. Brotes de zábila (*A. barbadensis*) obtenidos de la fase de multiplicación *in vitro* en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) con ancimídol (ANC) y 4 programas de inmersión temporal (tiempo y frecuencia). (a) Vista global de la parte interna de los RITA[®] con los brotes producidos en cada sistema. (b) Conglomerado de brotes obtenidos con 1 min de inmersión y 4 veces·día⁻¹. (c) Con 2 min de inmersión y 4 veces·día⁻¹. (d) Con 1 min de inmersión y 2 veces·día⁻¹. (e) Con de 2 min de inmersión y 2 veces·día⁻¹.

Cuadro 12. Valores medios de las variables de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación *in vitro* con 6, 8, 10 y 12 brotes cultivados en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) que contenía 1 mg·L⁻¹ de ancimidol (ANC) en 250 mL de medio de cultivo.

Cantidad de brotes en los RITA [®]	Número de brotes	Longitud del brote (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
6	4,60 ^c	16,06 ^b	3,37 ^a	0,161 ^b
8	4,38 ^c	16,04 ^b	3,84 ^a	0,173 ^{ab}
10	8,92 ^a	18,49 ^a	4,07 ^a	0,217 ^a
12	6,67 ^b	18,67 ^a	3,59 ^a	0,111 ^b
MG	6,44	17,60	3,73	0,163
CV (%)	17,45	6,03	10,27	14,87

Valores seguidos de letras distintas dentro de la misma columna difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de *Tukey* ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

Al analizar los resultados, se observó que cuando el número de brotes iniciales era superior o inferior a 10, el número de brotes desarrollados resultó inferior. Esta respuesta pudiera estar relacionada con un posible equilibrio requerido entre el volumen del medio disponible y cada brote cultivado, ya que a cada RITA[®] se le agregaron 250 mL de medio, generando una relación de 41,66; 31,25; 25,00 y 20,83 mL·brote⁻¹ para 6, 8, 10 y 12 brotes, respectivamente; parece claro que 25,00 mL·brote⁻¹ fue la relación que favoreció la multiplicación *in vitro* de zábila. Estos resultados se ajustan a lo señalado por Lorenzo *et al.* (1998) quienes recomendaron una relación entre 5 y 50 mL·brote⁻¹ cuando se cultivaron 10 brotes en los SIT para obtener una buena proliferación en *Saccharum* sp. Berthouly y Etienne (2005) señalan que es muy importante optimizar el volumen de medio de cultivo para cada explante en los RITA[®], indicando que volúmenes altos

podrían ser menos eficientes, dado que la secreción de moléculas químicas por parte de los explantes estimulan la proliferación de brotes, y éstas se encontrarían más diluidas cuando se usa un mayor volumen de medio de cultivo.

Lo anteriormente expuesto por Berthouly y Etienne (2005), pudiera ser una de las causas por las cuales se observaron en esta investigación una menor proliferación de brotes *in vitro* de zábila en los RITA[®] que contenían las relaciones más alta de volumen de medio de cultivo por brote sembrado (41,66 y 31,25 mL·brote⁻¹ para 6 y 8 brotes; respectivamente). La otra posible causa, pudiera ser la mayor turbulencia que reciben los brotes con cada inmersión cuando hay menor número de ellos colocados en los RITA[®] que favorecería el necrosamiento en la zona de los brotes (Fig. 15), donde se realizan la mayoría de los cortes durante las manipulaciones *in vitro* antes del cultivo en los RITA[®] y una vez necrosado el tejido se dificulta la absorción de los nutrientes y la proliferación de nuevos brotes.

Etienne y Berthouly (2002), destacan que la cantidad de brotes es un factor determinante en los proto colos de micropropagación, pero ha sido poco investigado en los SIT. Hasta el momento, en la multiplicación *in vitro* de zábila este factor no se ha estudiado en ningún sistema de cultivo. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los señalados por Salazar y Hoyos (2007), cuando evaluaron 5, 10 y 15 brotes por RITA[®] en la multiplicación *in vitro* de *Dioscorea alata*, obteniendo el mayor número de brotes nuevos al utilizar 10 brotes por RITA[®].

De Feria *et al.* (2003) señalan que la disponibilidad de nutrientes, es un factor importante al evaluar la cantidad de brotes inoculados en los envases de cultivo; estos autores determinaron que 40 explantes inoculados en los RITA[®] para iniciar la multiplicación *in vitro* de *Psidium*

guajava con una relación medio de cultivo por explante de 5 mL, fue una cantidad adecuada, mientras que 20 explantes inoculados con una relación de 10 mL por explante, generó una mayor disponibilidad de nutrientes y con ello una mayor tasa de multiplicación.

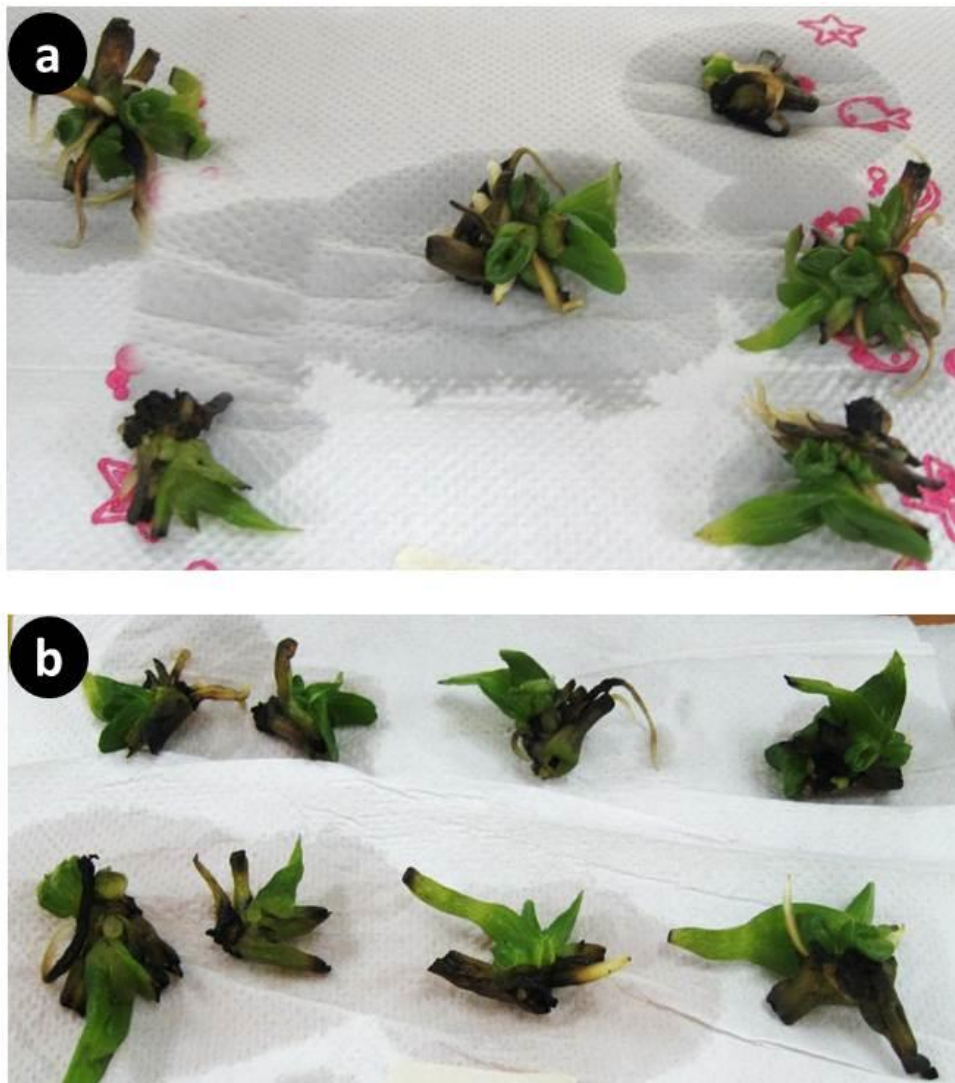


Figura 15. Necrosamiento basal de los brotes de zábila (*A. barbadensis*) en los tratamientos con menor número de brotes sembrados en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) con ancimidol (ANC) en la fase de multiplicación. (a) Seis brotes. (b) Ocho brotes.

Orellana (1998^a), señala que una baja densidad de brotes ocasionaría pérdida de espacio y de medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes, mientras que una alta densidad propiciaría un crecimiento limitado de los brotes e insuficiente proliferación de los mismos; este autor concluye que es necesaria la evaluación de la cantidad de brotes a inocular en los recipientes de cultivo, para aumentar la eficiencia de los sistemas de propagación *in vitro*.

En esta investigación se determinó que la cantidad de 10 brotes inoculados es la más adecuada para utilizar los RITA[®] en la micropropagación de zábila.

5.1.5. Estudio comparativo de variables morfológicas y de producción antes y después de la fase de enraizamiento utilizando brotes de zábila multiplicados con y sin ANC en los RITA[®]

Los brotes de zábila que fueron multiplicados en los RITA[®] sin y con 1 mg·L⁻¹ de ANC, mostraron diferencias estadísticas a un nivel de significación de $p < 0,01$, al inicio de la fase de enraizamiento, para todas las variables morfológicas, excepto para el número de hojas, alcanzando una media de 4,31 hojas (cuadro 13). Al finalizar la fase de enraizamiento, la procedencia de los brotes (con y sin ANC) no afectó a ninguna de las variables evaluadas.

Cuando se compararon los valores medios de las variables morfológicas de los brotes de zábila al inicio de la fase de enraizamiento, se observó que los brotes que fueron multiplicados con ANC mostraron los valores más bajos para la longitud del brote y de la hoja, y los valores más altos para el diámetro del brote, ancho de la

hoja y grosor de la hoja (cuadro 13), mientras que al finalizar el periodo de enraizamiento, todos los valores de las variables estudiadas resultaron similares, independientemente de la procedencia de los brotes (cuadro 14).

Cuadro 13. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila provenientes de la multiplicación *in vitro* sin y con 1 mg·L⁻¹ de ANC en los RITA[®], al inicio de la fase de enraizamiento.

Procedencia del brote para el enraizamiento	Número de hojas	Longitud del brote (mm)	Diámetro del brote (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)	Grosor de la hoja (mm)
Multiplicados en RITA [®] con ANC	4,48 ^a	12,92 ^b	8,21 ^a	9,62 ^b	4,01 ^a	1,56 ^a
Multiplicados en RITA [®] sin ANC	4,13 ^a	18,58 ^a	4,54 ^b	14,01 ^a	3,49 ^b	1,23 ^b
MG	4,31	15,75	6,37	11,81	3,75	1,39
CV (%)	20,85	16,57	26,77	19,65	21,29	26,89

Valores seguidos de letras distintas dentro de la misma columna difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 14. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila provenientes de la multiplicación *in vitro* sin y con 1 mg·L⁻¹ de ANC en los RITA[®], al final de la fase de enraizamiento.

Procedencia del brote para el enraizamiento	Número de hojas	Longitud del brote (mm)	Diámetro del brote (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)	Grosor de la hoja (mm)	Número de raíces
Multiplicados en RITA [®] con ANC	6,56 ^a	50,95 ^a	11,73 ^a	41,71 ^a	6,02 ^a	2,33 ^a	4,28 ^a
Multiplicados en RITA [®] sin ANC	6,12 ^a	47,99 ^a	10,60 ^a	39,32 ^a	6,11 ^a	2,20 ^a	3,97 ^a
MG	6,34	49,47	11,16	40,51	6,06	2,27	4,13
CV	16,72	26,63	24,99	27,78	15,49	26,31	17,74

Valores seguidos de letras iguales dentro de la misma columna no difieren estadísticamente con la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$). MG: Media general. CV: Coeficiente de variación.

Los brotes al inicio de la fase de enraizamiento provenientes de la multiplicación con ANC fueron pequeños y gruesos (Fig. 16 a, c y e) con hojas anchas, cortas y gruesas, por el efecto inhibitorio del ANC sobre la biosíntesis de las GAs o sobre la acción directa de éstas, en los brotes de zábila durante la fase de multiplicación. Estos brotes a medida que transcurría el tiempo de enraizamiento en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Fig. 17 a, b, c y d), aminoraron las diferencias con los brotes enraizados provenientes de la multiplicación sin ANC (Fig. 17 e, f, g y h) hasta que al final de la evaluación (35 días) mostraron una apariencia similar (Fig. 17 i y j).

Estos resultados indican que, a pesar de que el ANC modificó la morfología de los brotes de zábila durante la multiplicación, éstos crecieron con normalidad en el medio de enraizamiento, lo que permite deducir que no hubo efecto residual del ANC sobre los brotes enraizados *in vitro* de zábila.

Es importante recalcar que los retardantes de crecimiento (ANC y PBZ) estudiados en esta investigación, no han sido utilizados anteriormente para la micropropagación *in vitro* de zábila, y en consecuencia, tampoco se ha evaluado su posible efecto residual. Sin embargo, otros investigadores han evaluado el efecto residual de algunos retardantes del crecimiento en la micropropagación y conservación *in vitro* de otros cultivos. Así, Albany *et al.* (2005^b) señalaron que todos los brotes de banano multiplicados en SIT con ANC, PBZ y sin éstos RC, al final del enraizamiento en medios sin reguladores de crecimiento, mostraron un comportamiento similar para todas las variables morfológicas, a excepción del diámetro del pseudotallo (dp) que fue mayor en los brotes provenientes de sistemas de multiplicación con RC, posteriormente, en la fase de aclimatización, los valores de dp fueron similares en todas las vitroplantas, aunque la

altura de éstas fue ligeramente inferior en aquellas multiplicadas con ANC. Estos investigadores finalmente determinaron que no hubo efecto residual de los RC después de la aclimatización.

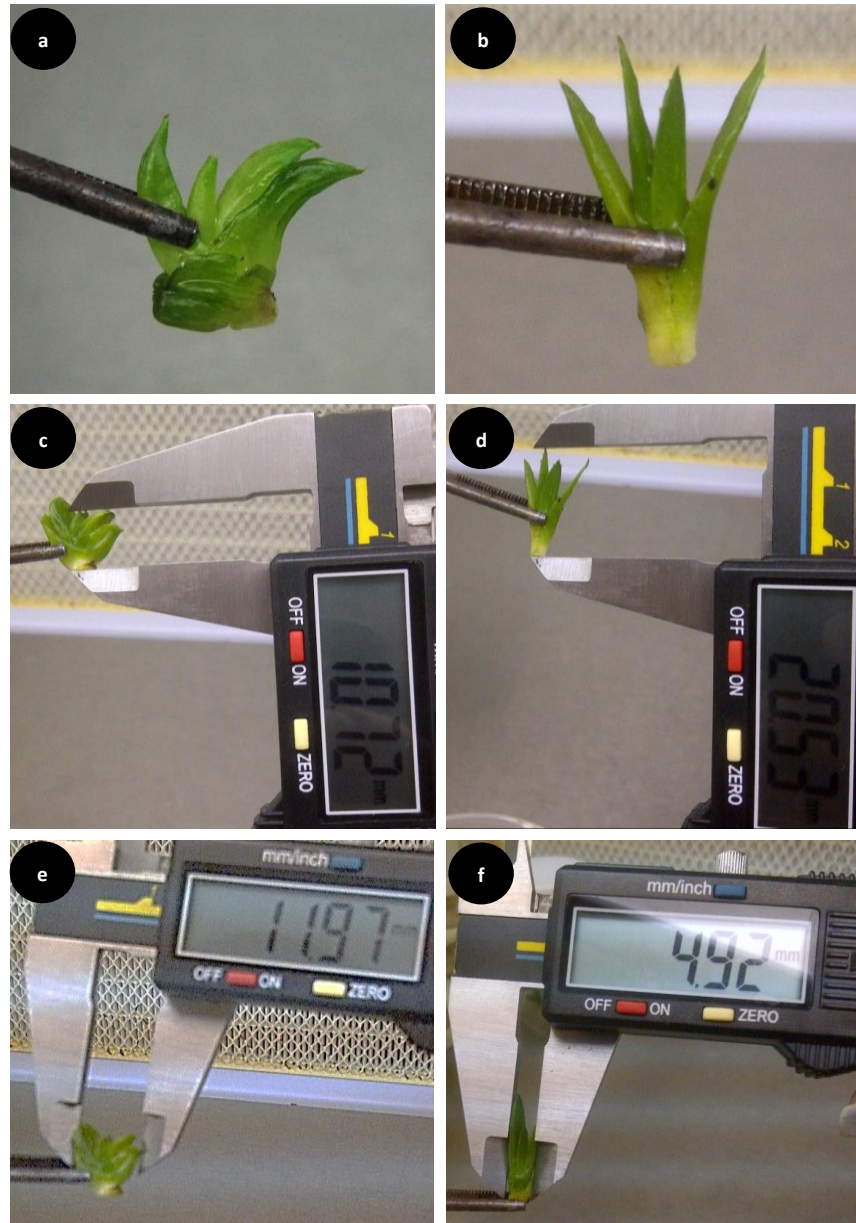


Figura 16. Brotes de zábila (*A. barbadensis*) *in vitro* provenientes de la multiplicación sin y con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ancimídol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA[®]) para iniciar la fase de enraizamiento *in vitro*. (a) Número de hojas, (c) longitud del brote y (e) diámetro del brote *in vitro* proveniente de la multiplicación en RITA[®] con ANC. (b) Número de hojas, (d) longitud del brote (f) y diámetro del brote *in vitro* proveniente de la multiplicación en RITA[®] sin ANC.



Figura 17. Brotes de zábila (*A. barbadensis*) en diferentes momentos de la fase de enraizamiento in vitro, provenientes de la multiplicación en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®). Brote(s) multiplicados con ANC (a) al inicio (b) a los 7 días (c) a los 15 días y (d) a los 35 días de enraizamiento. Brote(s) multiplicados sin ANC (e) al inicio (f) a los 7 días (g) a los 15 días y (h) a los 35 días de enraizamiento. (i) Longitud del brote enraizado proveniente de la multiplicación con ANC y (j) sin ANC a los 35 días de enraizamiento.

Sarkar *et al.* (2001) observaron que el efecto inhibitor del ancimidol en la reducción del crecimiento para la conservación *in vitro* de *Solanum tuberosum* resultó transitorio, y no persistió después de 180 días de cultivo; sin embargo, se mantuvo durante el período de conservación (16 meses). De Souza *et al.* (2010) también demostraron que no hubo efecto residual del PBZ, cuando éste fue utilizado con el propósito de evitar el crecimiento de las plantas de *Musa* sp. (Prata-Anã y FHIA 01) antes de la multiplicación *in vitro* de estos cultivares. Por otra parte, Bello *et al.* (2010), establecieron un protocolo eficiente de alta frecuencia de multiplicación de brotes de *Capsicum* utilizando PBZ y TDZ, indicando que obtuvieron plantas normales después de aplicar GAs en los medios de cultivo en los SIT para alargar los brotes.

Albany *et al.* (2005^b) señalan que fue posible restablecer la longitud del pseudotallo y de las hojas nuevas que habían reducido su tamaño por efecto del ANC y PBZ, sólo con excluir los retardantes de crecimiento en el medio de cultivo y sin la necesidad de aplicar GAs al medio, a diferencia de otros casos como *Capsicum* (Bello *et al.*, 2010), *Gladiolus* (Ziv, 1990) y *Saccharum* (Lorenzo *et al.*, 1998) donde utilizaron estas fitohormonas para facilitar la elongación de los brotes durante el enraizamiento y obtener plantas con un tamaño adecuado para la aclimatación.

En esta investigación se observó la emisión de las raíces durante la primera semana en medio libre de reguladores de crecimiento en todos los brotes de zábila (Fig. 17 b y f). Esta capacidad de formar raíces adventicias en medios libres de reguladores de crecimiento ha sido señalada con anterioridad por Albany *et al.* (2015), Aggarwal y Barna (2004), y Matos *et al.* (2000). El equilibrio hormonal que favorece la emisión de raíces en brotes de zábila muestra que no hubo efecto

residual de ningún regulador de crecimiento utilizado en la fase de multiplicación.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta fase de enraizamiento *in vitro* de zábila permiten afirmar que el ANC puede ser utilizado a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en los medios de cultivo para la multiplicación en los RITA[®], con el propósito de incrementar el número de brotes *in vitro*, sin efecto residual en la fase de enraizamiento.

5.2. Análisis molecular para determinar la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila

En la segunda etapa de la investigación se analizaron los productos amplificados obtenidos de la PCR-RAPD y PCR-ISSR para determinar la estabilidad genética de las 14 vitroplantas de zábila (V_1 a V_{14}) aclimatadas, provenientes del proceso de multiplicación *in vitro* con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANC en los RITA[®] y el hijuelo (H) obtenido por el método de propagación convencional. Las 15 plantas de zábila se consideraron materiales parentales para su caracterización molecular y posterior análisis genético, ya que éstas se originaron de la misma planta madre (I24-L) por métodos asexuales.

5.2.1. Extracción del ADN: Concentración, pureza e integridad del ADN de zábila

El método de extracción de ADN utilizado permitió obtener valores entre 270 y $350 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ADN del tejido foliar de las 15 plantas de zábila, con un valor promedio de $1,82$ de pureza. Estos valores fueron corroborados con la electroforesis en gel de $0,8 \%$ de agarosa (Fig. 18), observándose que todas las bandas resultaron ser de alto peso

molecular, definidas, de apreciable intensidad y sin barrido, lo que corresponde a un ADN genómico íntegro y de buena calidad. Características deseables, según Castillo *et al.* (2004) y Sambrook y Russel (2001), para los análisis moleculares, son que los valores de pureza estén comprendidos entre 1,5 y 1,8. Además se cumplió con lo establecido por Gryson (2010), quien indica que la determinación de la concentración y calidad del ADN extraído es precisa y correcta cuando las mediciones espectrofotométricas son corroboradas con electroforesis en geles de agarosa.

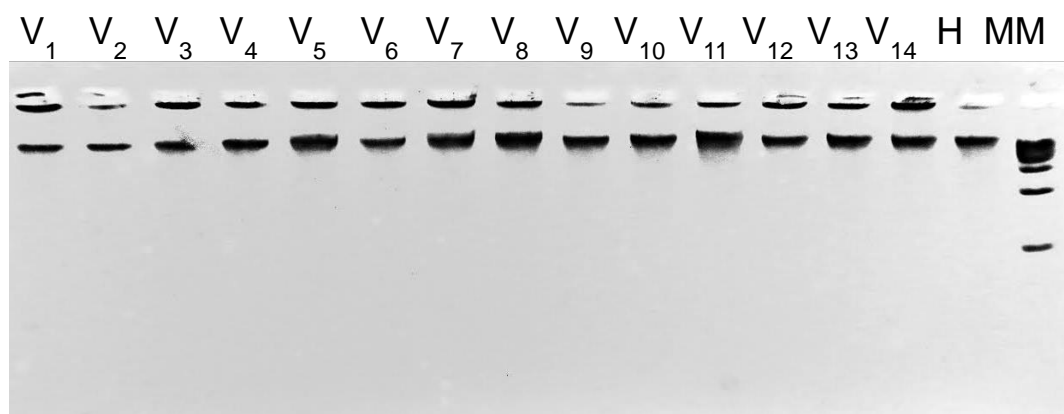


Figura 18. Electroforesis de ADN genómico extraído de las vitroplantas e hijuelo de zábila. Del carril 1 al carril 14 contiene las muestras del ADN genómico de las vitroplantas (V_1 - V_{14}). El carril 15 contiene la muestra del ADN genómico del hijuelo (H). El carril 16 contiene el marcador de peso molecular (MM) de 1 kb de ADN (Promega).

5.2.2. Caracterización de los patrones de bandeo de los productos de la PCR-RAPD y PCR-ISSR

De las 13 secuencias de iniciadores (11 RAPD y 2 ISSR) que fueron seleccionados para el estudio, se logró amplificar el ADN de las 15 plantas de zábila con 7 de los iniciadores evaluados (5 RAPD y 2 ISSR) que produjeron un total de 73 segmentos de ADN amplificados y

visibles (bandas registrables), que fueron utilizados para la caracterización molecular (cuadro 15) y el análisis genético.

Las PCR-RAPD permitieron obtener 44 bandas monomórficas y 11 bandas polimórficas (20 % de polimorfismo) para un total de 55 bandas que mostraron un peso molecular que osciló entre 305 y 3159 pb. Con los iniciadores RAPD se logró amplificar un promedio de 11 bandas por iniciador (entre 9 y 13 bandas) (cuadro 15).

Cuadro 15. Número y rango de pesos moleculares de segmentos de ADN amplificados (bandas) en la PCR-RAPD y PCR-ISSR de las vitroplantas (V₁-V₁₄) e hijuelo (H) de zábila.

Iniciador	Número de bandas			Porcentaje de Polimorfismo	Rango de peso molecular de las bandas (pb)
	Totales	Monomórficas	Polimórficas		
RAPD					
OPAE-01	12	11	1	8,33	305-3159
OPAE-10	10	7	3	30,00	594-1593
OPAE-19	9	4	5	55,55	537-2847
OPL-07	11	11	0	0,00	338-1431
OPR-18	13	11	2	15,38	498-1695
Sub total	55	44	11	20,00	
ISSR					
ISSR-E	8	8	0	0,00	456-1074
ISSR-F	10	9	1	10,00	447-1201
Subtotal	18	17	1	5,55	
Total	73	61	12	16,44	

De todas las amplificaciones de ADN realizadas en la PCR-RAPD (cuadro 15), el OPL-07 fue el único iniciador que generó patrones con bandas totalmente monomórficas entre el conjunto de vitroplantas e hijuelo de zábila, con un total de 11 bandas en un rango de pesos

moleculares entre 338 a 1431 pb, obteniéndose con este iniciador la mayor uniformidad genética, ya que que no se detectó polimorfismo entre los materiales parentales evaluados, como indican Sathyanarayana *et al.* (2008) y Mukandama *et al.* (2004).

Este iniciador, OPL-07, también generó sólo bandas monomórficas en la estandarización y optimización de las técnicas moleculares para *A. barbadensis* (Albany, 2014), y en el estudio de estabilidad e inestabilidad genética de plantas de zábila propagadas por cultivo de tejidos (Rathore *et al.*, 2011), siendo diferente el número de bandas y el peso molecular de las mismas; posiblemente, debido a la subjetividad para el registro de las bandas, una vez realizada la electroforesis de los productos de la PCR (Rathore *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2010; Sathyanarayana *et al.*, 2008).

Para el conjunto de vitroplantas e hijuelo de zábila, la PCR-OPAE-19 amplificó 5 bandas polimórficas de un total de 9 bandas (cuadro 15), representando el más alto porcentaje de polimorfismo (55,55 %) entre el grupo de iniciadores utilizados. Por su parte, Albany (2014), sólo obtuvo patrones de bandeo monomórficos (8 bandas) de pesos moleculares entre 324 y 1217 pb. Toothman (1999) utilizó el OPAE-19 junto con otros iniciadores de la misma serie para identificar el ADN de 3 especies de *Aloe* (*A. barbadensis*, *A. Arborescins* y *A. capensis*) en extractos industriales. A pesar de que en la patente, Toothman (1999) no discriminó entre fragmentos monomórficos y polimórficos, indicó que amplificaron 4 bandas con pesos moleculares de 450, 700, 800 y 1000 pb, lo que permite establecer diferencias con los resultados de esta investigación en cuanto al número de bandas (9 bandas) y rango de pesos moleculares (537-2847 pb).

En la PCR los iniciadores OPAE-01, OPAE-10 y OPR-18 amplificaron entre 10 y 13 fragmentos del ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila

con un bajo número de bandas polimórficas (entre 1 y 3 bandas), generando un 8,33; 30,00 y 15,38 % de polimorfismo para el OPAE-01, OPAE-10 y OPR-18; respectivamente (cuadro 15). Estos resultados contrastan de los obtenidos por Albany (2014) en la optimización de la PCR con los iniciadores OPAE-01, OPAE-10 y OPR-18 para el ADN de *A. barbadensis* en crecimiento *in vitro* y el hijuelo parental, en la cual obtiene sólo patrones monomórficos de 9 bandas con el OPR-18, de 5 bandas con el OPAE-01 y el OPAE-10. Sin embargo, cuando se compararon los rangos de pesos moleculares obtenidos por Albany (2014) de 344-1122 pb (OPAE-01), 458-1463 pb (OPR-18) y 689-1409 pb (OPAE-10), se observó que son muy similares a los obtenidos en esta investigación (cuadro 15).

El iniciador OPR-18 también fue utilizado por Rathore *et al.* (2011) para evaluar dos grupos de 15 plantas de zábila, provenientes de dos sistemas de regeneración *in vitro* (axilar y adventicia-indirecta) y señalan que amplificaron patrones monomórficos para ambos grupos de plantas, destacando que con el ADN de las plantas provenientes de la regeneración indirecta obtienen 10 bandas de un rango de peso molecular entre 410-2784 pb, observándose diferencias claras con esta investigación.

Toothman (1999) utilizó la serie de iniciadores OPAE, entre ellos el OPAE-01, OPAE-10, OPAE-11 y OPAE-19, que fueron adecuados para estudios de PCR en extractos industriales de aloe, siendo posible distinguir entre las especies con el OPAE-11 y sólo el OPAE-19 permitió identificar ADN de *Aloe*, asumiendo polimorfismo para el primero y monomorfismo para el segundo iniciador.

Si bien es cierto que los estudios de caracterización de los productos de la PCR-RAPD permiten valorar el potencial y uso de los RAPD en la estabilidad genética de las plantas de zábila generadas por

cultivo *in vitro*, es de mayor relevancia distinguir diferencias en el patrón de bandeo en el conjunto de vitroplantas e hijuelo para cada iniciador (RAPD), y posteriormente para el análisis genético, considerar el conjunto de marcadores moleculares generados de todas las PCR para determinar la uniformidad genética entre las plantas de zábila generadas por cultivo *in vitro* y el material de origen (planta madre) o parental (hijuelo).

Al respecto, el OPAE-19, fue el marcador molecular que permitió distinguir el mayor número de vitroplantas de las 14 analizadas, 8 de éstas (V₁, V₃, V₆, V₇, V₉, V₁₁, V₁₂ y V₁₃) resultaron diferentes al resto de las vitroplantas y al hijuelo (H), ya que no amplificaron algunas de las 5 bandas polimórficas detectadas, mientras que 6 vitroplantas (V₂, V₄, V₅, V₈, V₁₀, y V₁₄) mostraron el mismo patrón de bandeo del hijuelo.

En la electroforesis y electroforegrama de los productos de la amplificación del ADN de las 15 plantas de zábila en la PCR-OPAE-01 (Fig. 19) se observó que sólo 4 vitroplantas (V₁, V₈, V₁₁ y V₁₂) no amplificaron 1 (633 pb) de los 12 fragmentos de ADN, mientras que el resto de las vitroplantas evaluadas mostraron el mismo patrón de bandeo al hijuelo.

Los productos amplificados del ADN de las 15 plantas de zábila por la PCR-OPAE-10 fueron detectados en su respectiva electroforesis y electroforegrama (Fig. 20), develándose que las 10 bandas obtenidas estaban presentes en 13 vitroplantas y el hijuelo de zábila. Para este iniciador, sólo la V₈ resultó diferente al grupo de plantas evaluadas al carecer de 3 bandas (1018, 894 y 777 pb) de un total de 10.

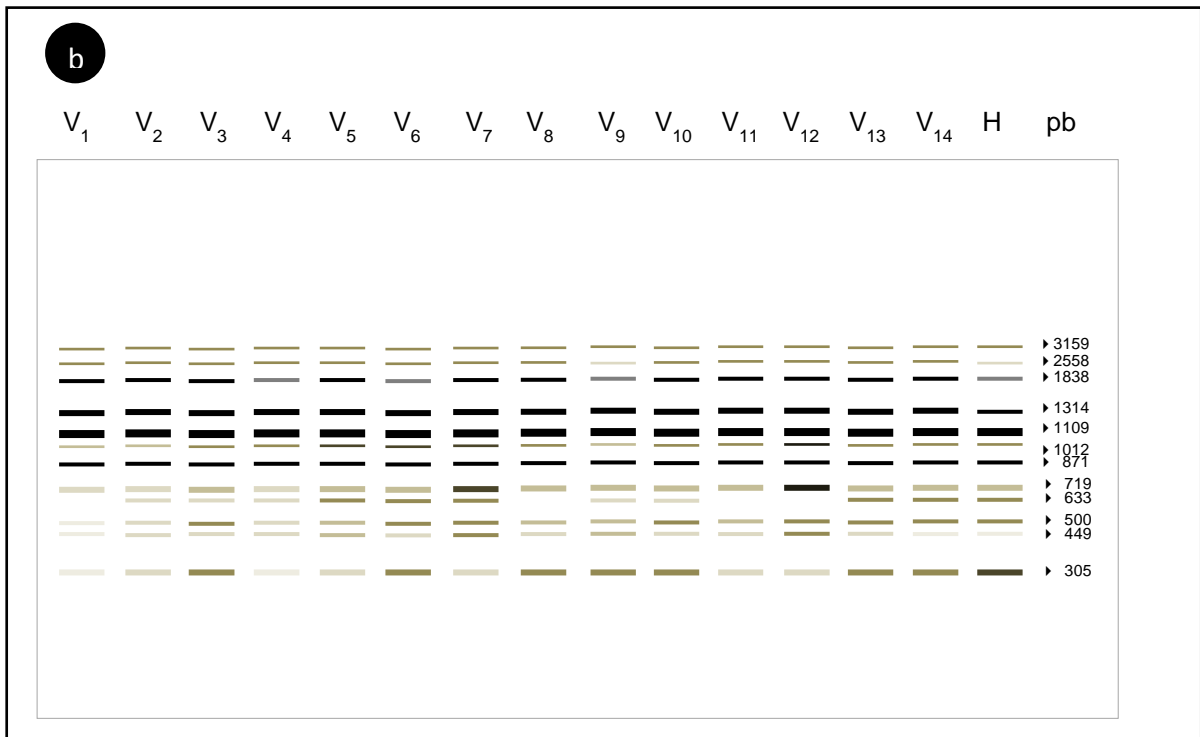
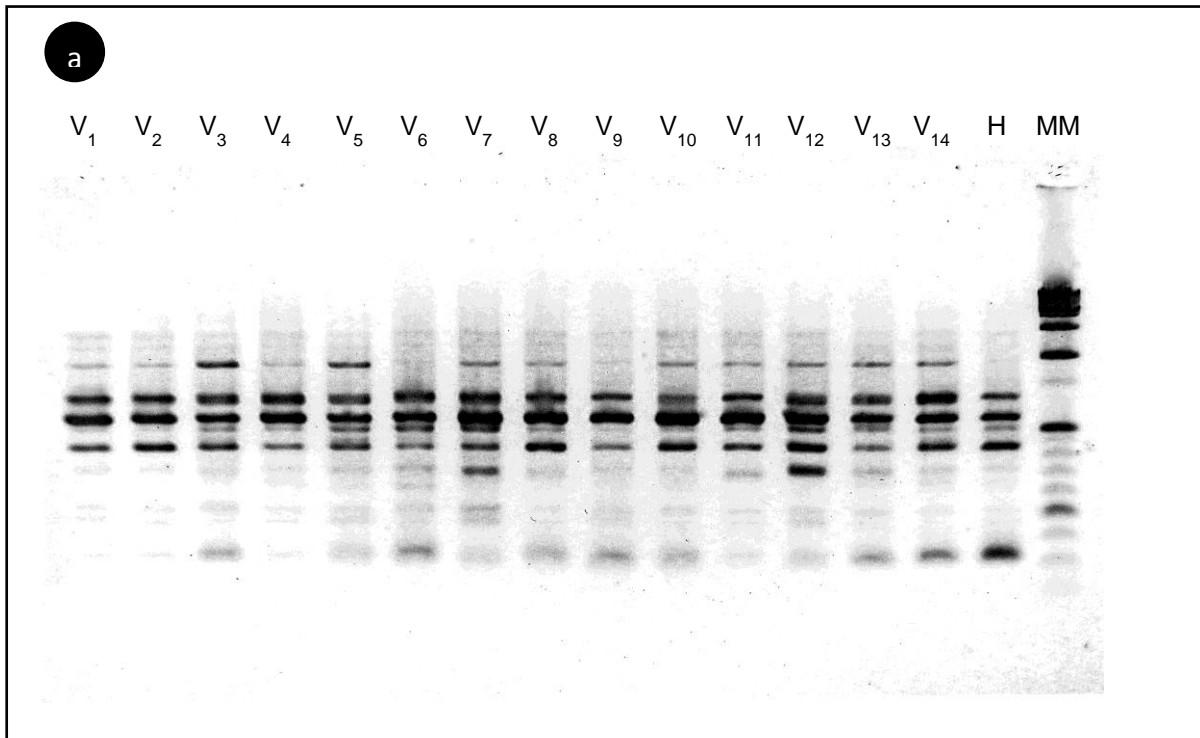


Figura 19. Productos de la PCR-OPAE-01 de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila. (a) Patrón electroforético y (b) diagrama. Vitroplantas (V₁ a la V₁₄) e hijuelo (H). MM: marcador de peso molecular de 1 kb de ADN (Promega). pb: pares de bases de las bandas.

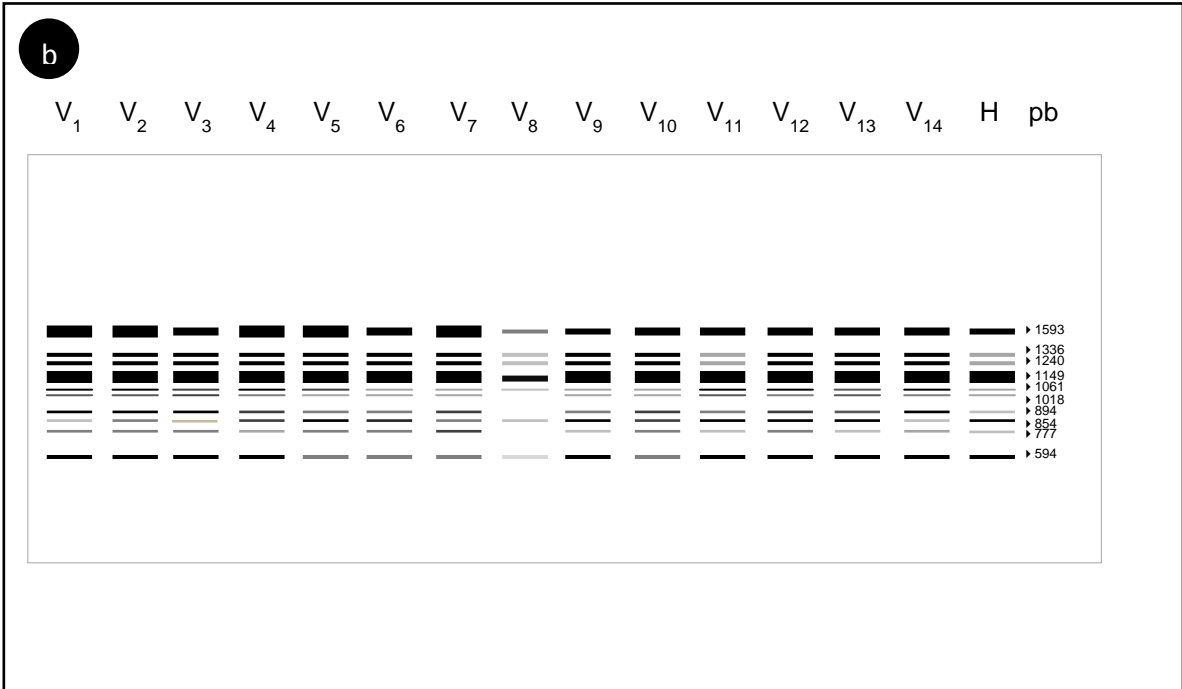
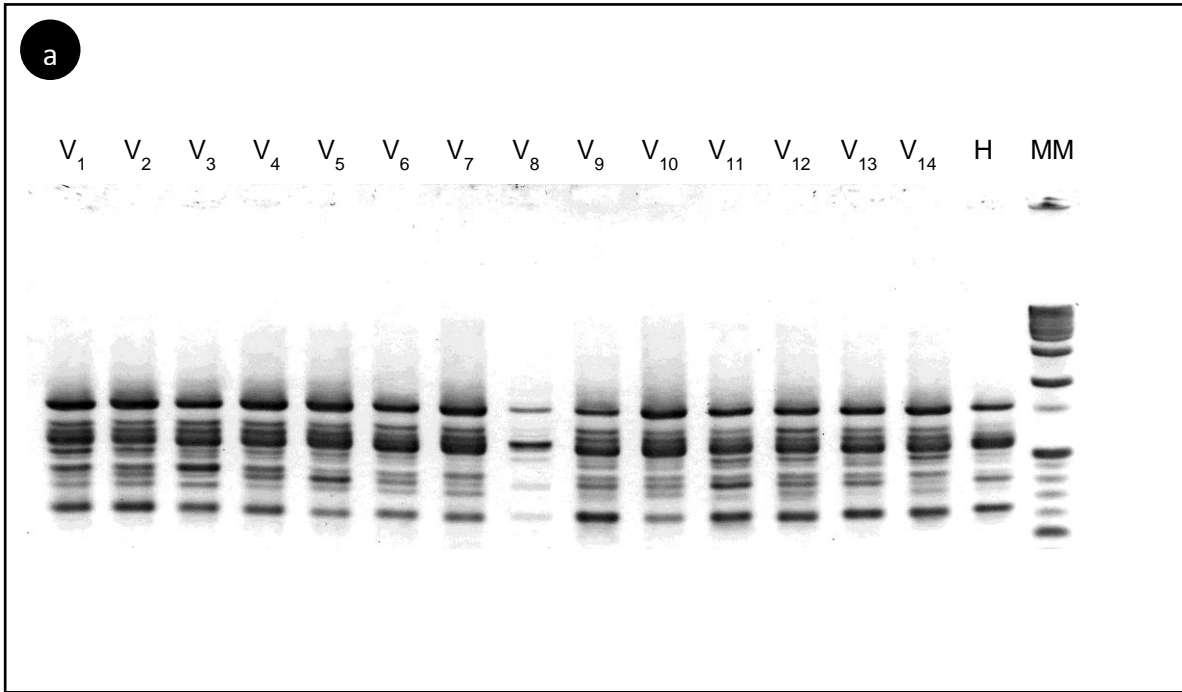


Figura 20. Productos de la PCR-OPAE-10 de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila. (a) Patrón electroforético y (b) diagrama. Vitroplantas (V_1 a la V_{14}) e hijuelo (H). MM: mezcla de marcador de peso molecular de 1 kb y 100 pb de ADN (Promega). pb: pares de bases de las bandas.

En la caracterización de los productos de la PCR-ISSR (cuadro 15) se observó un total de 18 fragmentos de ADN amplificados con un rango de pesos moleculares entre 447 y 1201 pb, con un porcentaje de polimorfismo de 5,55 %. El número de bandas obtenidas fue de 8 con el iniciador ISSR-E y de 10 con el ISSR-F; sólo este último iniciador generó polimorfismo entre el grupo de las vitroplantas e hijuelo de zábila, con una sola banda (1201 pb) ausente en la vitroplanta 7 (Fig. 21). El resto de la vitroplantas resultaron con patrones de bandeo idénticos al hijuelo parental de zábila para ambos ISSR.

El iniciador ISSR-E también fue monomórfico para ADN de zábila según lo señalado por Albany (2014) y Rathore *et al.* (2011) con un rango de peso molecular de las bandas muy similar, pero el número de bandas fue diferente al obtenido en esta investigación.

Rathore *et al.* (2011) y Albany (2014) utilizaron el iniciador ISSR-F obteniendo patrones totalmente monomórficos en zábila; estos resultados fueron diferentes a los obtenidos en esta investigación sólo por la ausencia de una banda en la vitroplanta 7 (Fig. 21), lo que determinó un nivel de polimorfismo del 10 % para el iniciador ISSR-F (cuadro 15).

5.2.3. Determinación de la estabilidad genética de las vitroplantas de zábila con RADP e ISSR

Para el análisis genético de las vitroplantas de zábila obtenidas del proceso de multiplicación en los sistemas de inmersión temporal (RITA[®]) con retardantes de crecimiento (ANC), se consideraron todos los perfiles genéticos generados con los iniciadores RAPD e ISSR en las 14 vitroplantas e hijuelo de zábila.

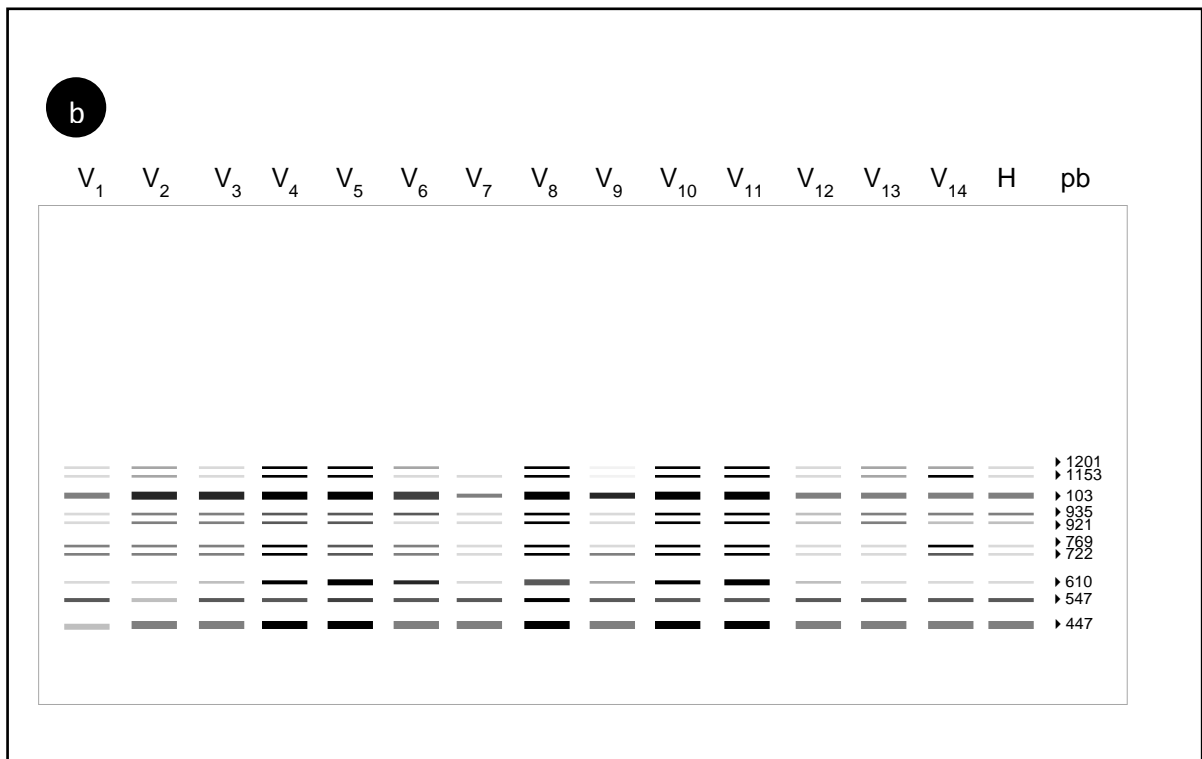
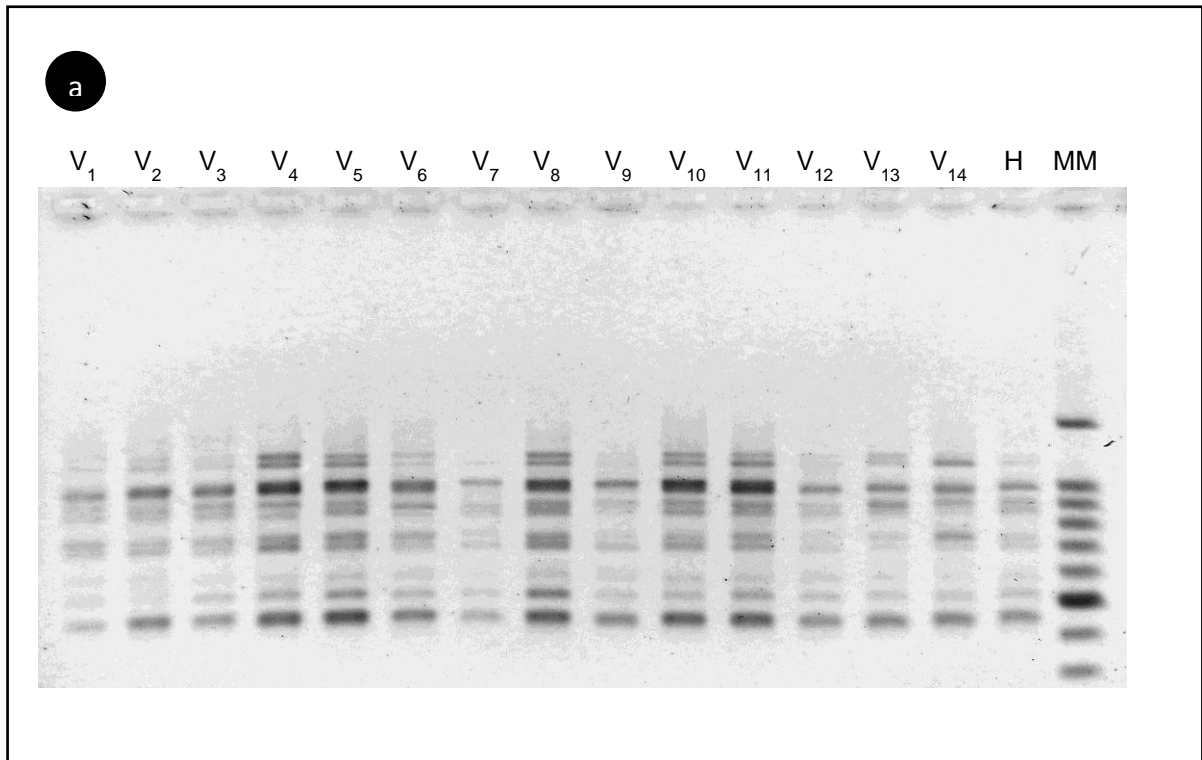


Figura 21. Productos de la PCR-ISSR-F de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila. (a) Patrón electroforético y (b) diagrama. Vitroplantas (V₁ a la V₁₄) e hijuelo (H). MM: marcador de peso molecular de 100 pb de ADN (Promega). pb: pares de bases de las bandas.

Los iniciadores RAPD y ISSR generaron un total de 73 fragmentos amplificados de ADN (305 a 3159 pb), con un 16,4 % de polimorfismo y un promedio de bandas de 10,4 por iniciador en las 15 plantas de zábila (cuadro 15).

Los 73 fragmentos amplificados del ADN de las plantas de zábila fueron utilizados para generar la matriz de similitud genética entre pares de plantas en base al coeficiente de Jaccard y el dendograma jerárquico que agrupó las plantas según la similitud genética. El ADN extraído del hijuelo de zábila logró amplificar todas las bandas (73), por lo que resultó apropiado para evaluar la estabilidad genética de las 14 vitroplantas.

La matriz reveló que los valores de similitud genética entre los pares de las plantas evaluadas (vitroplantas e hijuelo) osciló entre 0,92 y 1,00 (cuadro 16). Los pares de H/V₂, H/V₄, H/V₁₀, H/V₁₄ mostraron un coeficiente de similitud de 1,00, resultando genéticamente idénticas y estables al obtener el mismo perfil genético del hijuelo (73 bandas).

Igualmente, en la matriz de similitud se observó que el par V₃/V₁₃ alcanzó un coeficiente de similitud de 1,00 resultando genéticamente iguales tales vitroplantas, pero a diferencia de las anteriores, estas vitroplantas amplificaron 72 de las 73 bandas registradas. La ausencia del mismo fragmento de ADN en la V₃ y V₁₃ originó la misma variación en sus perfiles genéticos, resultando genéticamente idénticas entre ellas, pero no estables con respecto al material parental (hijuelo).

Contrariamente, la matriz de similitud develó ciertas diferencias genéticas entre el resto de las vitroplantas e hijuelo, destacándose el menor coeficiente de similitud de 0,92 para los pares de las vitroplantas: V₁/V₈; V₇/V₉ y V₈/V₁₁ (cuadro 16).

Cuadro 16. Matriz de similitud genética en base al coeficiente de Jaccard generada de los marcadores moleculares RAPD e ISSR para los pares de vitroplantas (V₁-V₁₄) e hijuelo (H) de zábila.

	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀	V ₁₁	V ₁₂	V ₁₃	V ₁₄	H
V ₁	1,00														
V ₂	0,96	1,00													
V ₃	0,97	0,99	1,00												
V ₄	0,96	1,00	0,99	1,00											
V ₅	0,95	0,99	0,97	0,99	1,00										
V ₆	0,93	0,97	0,96	0,97	0,96	1,00									
V ₇	0,93	0,97	0,96	0,97	0,96	0,95	1,00								
V ₈	0,92	0,96	0,95	0,96	0,95	0,93	0,93	1,00							
V ₉	0,96	0,95	0,93	0,95	0,93	0,97	0,92	0,90	1,00						
V ₁₀	0,96	1,00	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,96	0,95	1,00					
V ₁₁	0,97	0,96	0,97	0,96	0,95	0,96	0,93	0,92	0,96	0,96	1,00				
V ₁₂	0,96	0,97	0,96	0,97	0,96	0,95	0,95	0,93	0,94	0,97	0,96	1,00			
V ₁₃	0,97	0,99	1,00	0,99	0,97	0,96	0,96	0,95	0,93	0,99	0,97	0,96	1,00		
V ₁₄	0,96	1,00	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,96	0,95	1,00	0,96	0,97	0,99	1,00	
H	0,96	1,00	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,96	0,95	1,00	0,96	0,97	0,99	1,00	1,00

En general, todos los valores de similitud genética entre los pares de plantas obtenidos de los perfiles de RAPD e ISSR pueden considerarse relativamente altos; aquellos coeficientes de similitud que resultaron entre 0,92 y 0,99, ponen de manifiesto cierta variabilidad genética en el grupo de vitroplantas. Sin embargo, se observaron valores mayores de similitud genética (0,95 a 1,00) entre cada vitroplanta con respecto al hijuelo, por lo que puede considerarse cierta estabilidad genética entre estos materiales parentales.

Antes de esta investigación, sólo Rathore *et al.* (2011) habían evaluado la estabilidad genética en plantas de *A. barbadensis* obtenidas por cultivo de tejidos, en base a los perfiles genéticos de la combinación de RAPD e ISSR. Estos autores demostraron que las 15 plantas regeneradas mediante la proliferación de yemas axilares (protocolo 1), resultaron con perfiles de ADN idénticos a la planta madre, determinando una alta estabilidad genética en el grupo de plantas obtenidas del protocolo 1. Sin embargo, las 15 plantas obtenidas mediante organogénesis indirecta (callos de la base de la inflorescencia: protocolo 2) mostraron coeficientes de similitud genética que variaron desde 0,93 hasta 1,00, por lo que calificaron a este grupo de plantas como inestables genéticamente. Del mismo modo Alizadeh y Singh (2009) en *Vitis* spp. recomiendan el método de micropropagación mediante segmentos nodales porque las plantas obtenidas por este método y su respectiva planta madre mostraron el máximo valor de similitud de Jaccard (1,00) y conformaron un solo grupo.

Liu y Yang (2012^b) también consiguieron coeficientes de similitud genética entre 0,92 y 1,00 con los datos de 93 bandas obtenidas con 16 ISSR en 31 plantas en *Psidium guajava* micropropagadas y la planta madre, enfatizando que tal similitud reveló un polimorfismo muy bajo. Iguales valores de similitud genética (0,92 a 1,00) fueron reportados por estos mismos investigadores (Liu y Yang, 2012^a) pero en el análisis de 70 bandas obtenidas con 11 ISSR en 15 brotes de *Lilium orientalis* micropropagadas y su planta madre, considerando que el método de regeneración *in vitro* resultó seguro para la multiplicación de esta especie.

Contrariamente, Mamdouh *et al.* (2014) calificaron de variantes somaclonales a un grupo de plantas de 3 cultivares (Waffir F1, Beith Alpha y Fares) de *Cucumis sativus* regeneradas de callos embriogénicos, ya que la similitud genética osciló entre 0,33 y 0,75. Los coeficientes fueron calculados en base a 34 fragmentos amplificados del ADN del grupo de plantas de *C. sativus* y la planta madre con 5 ISSR.

En el dendograma jerárquico (Fig. 22) se observaron agrupaciones de todas las vitroplantas con el hijuelo, exceptuando la vitroplanta 8 que quedó aislada del grupo anterior y se unió a él con el coeficiente más bajo de similitud (0,94). Dentro del grupo, sin tomar en cuenta la vitroplanta 8, se observaron 3 subgrupos a un nivel de similitud genética de 0,96. Dos de ellos formado por sólo dos vitroplantas cada uno, el primero conformado por V₁ y V₁₁ y el segundo por V₆ y V₉. En el tercer subgrupo se ubicó el resto de las vitroplantas y el hijuelo, destacándose con el mayor valor de similitud genética (coeficiente de Jaccard de 1,00) dos sub-subgrupos, el primero conformado por 4 vitroplantas (V₂, V₄, V₁₀ y V₁₄) y el hijuelo, que resultaron ser idénticos, tipificándose como estables genéticamente. El segundo sub-subgrupo formado por 2 vitroplantas (V₃ y V₁₃) que resultaron ser genéticamente iguales entre ellas (coeficiente de 1,00), pero no son clones idénticos al hijuelo. Las vitroplantas V₅, V₇, y V₁₂ se unieron a los dos sub-subgrupos mencionados con menores niveles de similitud genética (Fig. 22).

Coeficiente de similitud de Jaccard

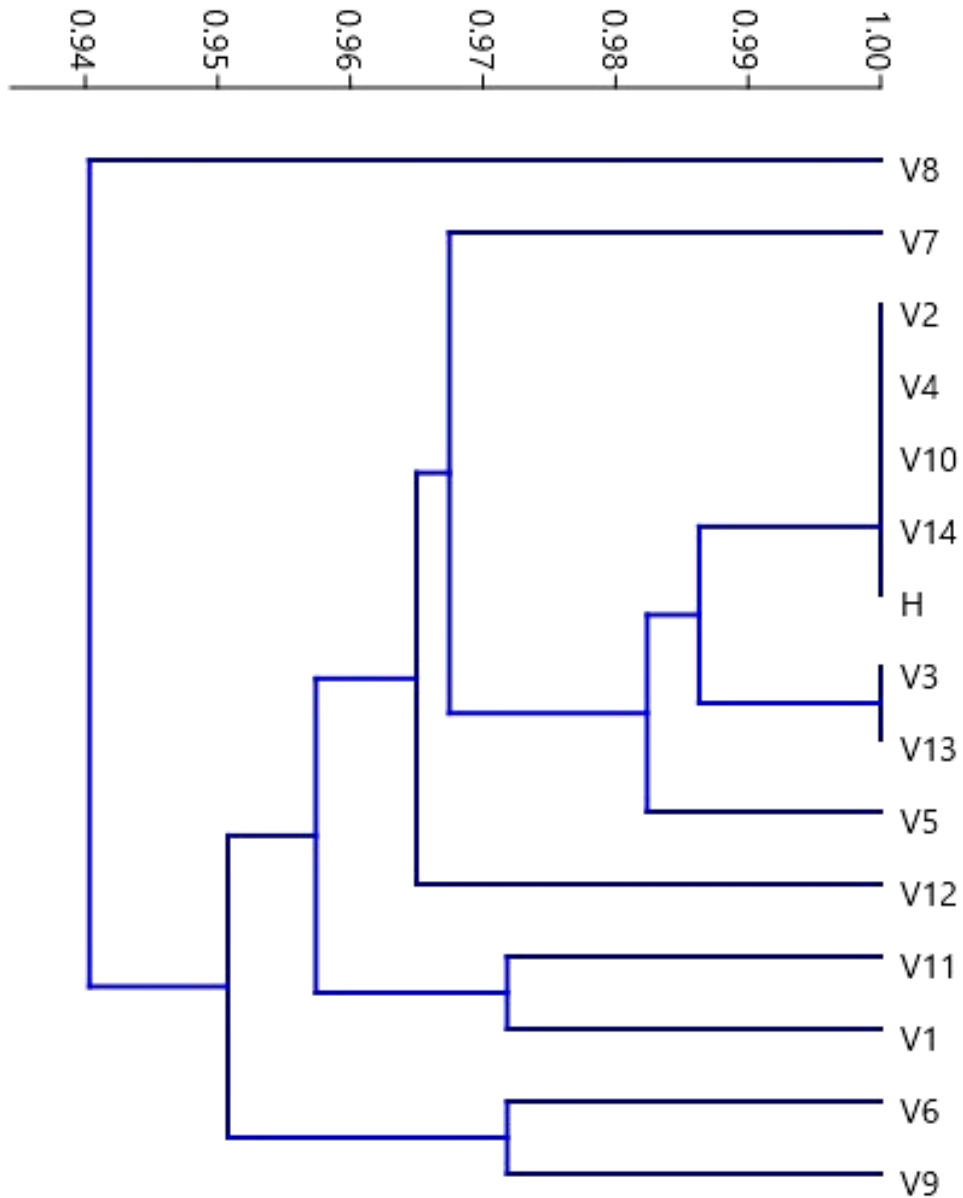


Figura 22. Dendrograma jerárquico de las vitroplantas (V_1 a V_{14}) e hijuelo (H) de zábila, obtenido por el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando los coeficientes de similitud de Jaccard generados por los perfiles genéticos de los productos de la amplificación del ADN de zábila con OPAE-01, OPAE-10, OPAE-19, OPL-07, OPR-18, ISSR-E e ISSR-F.

El sistema de micropropagación basado en la multiplicación *in vitro* en los sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] con retardantes de crecimiento (ANC) utilizado en esta investigación no causó cambios genéticos detectables en las vitroplantas 2, 4, 10 y 14 al compararlo con el hijuelo de zábila cuando se analizaron los patrones de bandeo obtenidos por 5 RAPD y 2 ISSR. No obstante, si bien es cierto que los análisis genéticos demostraron que 4 vitroplantas resultaron genéticamente estables; un grupo de 10 vitroplantas mostraron perfiles genéticos diferentes al hijuelo (8 %); observándose un bajo nivel de polimorfismo (2,05 %) entre todas las vitroplantas y el hijuelo. Estos resultados probablemente están relacionados con el sistema de regeneración organogénico inducido en los RITA[®] al utilizar ANC y BAP, dos reguladores de crecimiento que ejercen un efecto sobre la dominancia apical e inducen la formación de brotes a partir de yemas axilares y/o adventicias. La presencia de vitroplantas generadas a partir de brotes provenientes de yemas adventicias, pudiera ser, una de las posibles causas de la variabilidad entre el grupo de las 10 vitroplantas, que mostraron perfiles genéticos diferentes al hijuelo. Sin embargo, estas diferencias no necesariamente tendrían que estar relacionadas con cambios en el fenotipo de las vitroplantas de zábila, que pudieran conducir a modificaciones en las características agronómicas que afecten las propiedades biológicas de los productos comerciales que se extraen de esta especie.

En esta línea, Fourre *et al.* (1997) han resaltado que las plantas regeneradas por procesos *in vitro* pueden no ser exactamente iguales al genotipo de la planta madre, pero esto no indica que las plantas obtenidas sean diferentes en su fenotipo. Así, Devarumah *et al.* (2002), con plantas micropropagadas de *Camellia* sp., encontraron que sólo dos plantas presentaron estabilidad genética, pero no hubo diferencias significativas en cuanto a las características comerciales de *Camellia* sp.

Por otra parte, De Lima *et al.* (2006) advierten que para asegurar que un proceso de micropropagación sea estable genéticamente es necesario la utilización de un gran número de iniciadores en una mayor cantidad de plantas, dado que al utilizar 9 iniciadores RAPD en 11 plantas *in vitro* de *S. capitata* y la planta madre, obtuvieron sólo fragmentos monomórficos y concluyen que no es posible asegurar la estabilidad genética sino indicios de la misma. Para Lakshmanan *et al.* (2007) el número de RAPD (30), de ISSR (5) y de plántulas (11) fue suficiente para confirmar que el uso de marcadores moleculares permiten establecer la fidelidad genética en plantas micropropagadas, por largo tiempo, del cultivar Nanjanagudu Rasabale (NR) de banano (*Musa* AAB).

A pesar de que en esta investigación el número de marcadores moleculares reproducibles pudiera ser considerado bajo (5 RAPD y 2 ISSR), éstos generaron un número promedio de bandas por iniciador alto (10,4); por lo tanto, el grado de polimorfismo resultó bajo (2,05 %), permitiendo afirmar que el método de propagación *in vitro* con retardantes de crecimiento (ANC) en los RITA[®] generó vitroplantas de zábila con cierta estabilidad genética.

Varios investigadores han utilizado ampliamente las técnicas de marcadores moleculares de tipo RAPD para evaluar las variaciones genéticas en plantas generadas por las técnicas *in vitro* (Sathyanarayana *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 1998); en las especies *Vitex trifolia* (Ahmad *et al.*, 2013), *Viola patrinii* (Chalageri y Babu, 2012), *Cuphea procumbens* (Fatima *et al.*, 2012) y *Sapindus trifoliatus* (Asthana *et al.*, 2011) entre las más recientes; y con el mismo propósito los marcadores moleculares del tipo ISSR en *Cucumis sativus* (Mamdouh *et al.*, 2014), *Lilium orientalis* (Liu y Yang, 2012^a), *Psidium*

guajava (Liu y Yang, 2012^b), *Malus × domestica* (Pathak y Dhawan, 2012) y *Rauvolfia serpentina* (Saravanan *et al.*, 2011).

Sin embargo, Rathore *et al.* (2011) señalan que el uso de una sólo técnica de amplificación no garantiza la identidad genética de las plantas generadas por cultivo de tejidos; por lo tanto, el uso de más de una técnica de amplificación de ADN resulta ventajosa. En esta línea, Saha *et al.* (2014) señalan que los perfiles genéticos derivados de los RAPD e ISSR son utilizados con frecuencia en plantas cultivadas y medicinales, para establecer la similitud genética o diferencias entre las plantas propagadas *in vitro*, no sólo porque representan técnicas sencillas y rápidas de realizar, sino porque también requieren de pequeñas cantidades de ADN, sin ninguna información previa sobre el genoma.

En los últimos 5 años, varios estudios han evaluado con éxito la estabilidad genética en plantas generadas mediante cultivo de tejidos, basándose en los perfiles genéticos obtenidos con RADP e ISSR en conjunto, aunque con resultados variables; así en *Ocimum basilicum* (Saha *et al.*, 2014), *Viola pilosa* (Soni y Kaur, 2014), *Rauvolfia tetraphylla* (Faisal *et al.*, 2012), *Withania Somnifera* (Nayak *et al.*, 2012), *Gerbera jamesonii* (Bhatia *et al.*, 2011), *Kaempferia galanga* (Mohanty *et al.*, 2011), *Alpinia galanga* (Parida *et al.*, 2011) ambos iniciadores no detectaron polimorfismo, demostrándose con ello un 100 % de similitud genética entre las plantas propagadas y el material de origen (planta madre); mientras que en *Ceropegia santapauli* (Chavan *et al.*, 2014) y *Bacopa monnieri* (Muthiah *et al.*, 2013), los RAPD no detectaron polimorfismo entre las plantas obtenidas del cultivo *in vitro* y la planta madre, los ISSR si permitieron establecer diferencias.

Para el caso específico de *A. barbadensis*, los resultados de esta investigación y los obtenidos por Rathore *et al.* (2011) demostraron que los perfiles genéticos derivados de los RAPD e ISSR permitieron corroborar que los sistemas y métodos empleados para la regeneración *in vitro* influyen en la estabilidad genética de las plantas de zábila micropropagadas; por lo tanto, los estudios moleculares para determinar el grado de estabilidad o inestabilidad genética entre las plantas obtenidas son necesarios para validar las metodologías de propagación *in vitro*, especialmente cuando éstas se quieran establecer como métodos de propagación comercial, de tal manera que se pueda garantizar la fidelidad genética de las plantas obtenidas con respecto al material de origen. En esta línea, Saha *et al.* (2014) afirmaron que la aplicación de cualquier protocolo de micropropagación es severamente obstaculizado por la incidencia de variantes somaclonales, que suelen afectar la explotación comercial de las plantas micropropagadas, y un chequeo riguroso de la similitud genética de la progenie se convierte en un aspecto obligatorio de calidad antes de asumir un método de micropropagación con fines comerciales. Ahora bien, más que evaluar la estabilidad genética de las plantas micropropagadas e identificar variantes somaclonales, adquiere mayor importancia el hecho de detectar cambios en los perfiles genéticos que estén relacionados con las características agronómicas que pudieran afectar las propiedades biológicas de los productos comerciales que se extraen de la zábila, para garantizar la eficiencia del método de propagación *in vitro*. Por lo tanto, nuevos estudios deben apuntar a la identificación de secuencias genéticas relacionadas con las propiedades de los productos comerciales que se extraen de esta planta, con el fin de diseñar marcadores moleculares específicos que permitan detectar los cambios relevantes, en cantidad o calidad, de estos productos.

6. CONCLUSIONES

1. La determinación de los principales parámetros técnicos y biológicos de los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]) y el uso del ancimidol como retardante de crecimiento en el medio de cultivo líquido incrementaron la eficiencia de la multiplicación *in vitro* de zábila.

2. Ambos retardantes de crecimiento, ancimidol y paclobutrazol, influyeron en el crecimiento y desarrollo de los brotes de zábila cultivados *in vitro* reduciendo la longitud de los brotes y promoviendo la formación de conglomerados de brotes; siendo esto una ventaja para el manejo en la fase de multiplicación *in vitro*. El ancimidol resultó ser el retardante de crecimiento más adecuado, ya que aumentó la producción de brotes y duplicó la formación de conglomerados, contribuyendo al incremento de la eficiencia de la multiplicación *in vitro* de zábila.

3. La menor concentración ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de ancimidol ensayada en los medios de cultivo líquido en los RITA[®] incrementó la eficiencia de la multiplicación *in vitro* de zábila. El crecimiento longitudinal de los brotes disminuyó a medida que aumentó la concentración de este retardante en los RITA[®], mientras que el número de brotes y la formación de conglomerado de brotes fueron superiores sólo cuando se adicionó el ANC en los medios de cultivo independientemente de las concentraciones utilizadas.

4. El tiempo de inmersión en los RITA[®] resultó ser el parámetro técnico determinante para obtener un incremento considerable en el número de brotes en la multiplicación *in vitro* de zábila usando ancimidol en los medios de cultivo. Poco tiempo y baja frecuencia de

inmersión favorecieron la respuesta biológica del cultivo, con una muy probable reducción de los costos operativos de estos sistemas.

5. La relación de 25 mL de medio de cultivo por cada brote de zábila cultivado en los RITA[®] favoreció el crecimiento y desarrollo de los brotes en la fase de multiplicación *in vitro* con ancimidol. El equilibrio entre el número de brotes inoculados y el volumen de medio de cultivo en los RITA[®], garantiza la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo y crecimiento del cultivo y permite un uso eficiente de los recipientes.

6. Los cambios morfológicos en los brotes de zábila *in vitro* inducidos por el uso de ancimidol en los RITA[®] durante la fase de multiplicación *in vitro* resultaron transitorios, y a medida que transcurrió el tiempo de enraizamiento *in vitro* en medios exentos de reguladores de crecimiento, los brotes de zábila retomaron su crecimiento habitual.

7. Los análisis moleculares basados en la PCR-RAPD y PCR-ISSR permitieron determinar la estabilidad genética de las vitroplantas. Se detectó total similitud en un 29 % de las vitroplantas con respecto al hijuelo y a pesar de que el 71 % de las vitroplantas mostraron diferencias con respecto al material parental, se mantuvieron altos valores de coeficiente de similitud (95 %) y muy bajo nivel de polimorfismo (2,05 %), lo que permite deducir que la multiplicación *in vitro* de zábila con ancimidol en los RITA[®] aún sigue siendo un alternativa para la propagación masiva de esta especie; así, estas diferencias no necesariamente tendrían que estar relacionadas con cambios en el fenotipo de las vitroplantas de zábila, que afecten las propiedades biológicas de los productos comerciales que se extraen de esta especie.

7. RECOMENDACIONES

1. Determinar el número de subcultivos con ancimidol en los medios de cultivo líquido en sistemas de inmersión temporal para evitar los efectos de habituación, variación somaclonal y/o desórdenes fisiológicos, manteniendo la eficiencia en la mutiplicación *in vitro* de zábila.

2. Evaluar concentraciones menores a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ancimidol en los medios de cultivo en la multiplicación *in vitro* de brotes de zábila en los RITA[®], que permitan reducir los costos de los medios de cultivo así como la posible variación somaclonal de las plantas de zábila.

3. Realizar estudios histológicos para determinar el origen de los brotes de zábila multiplicados con ancimidol en los RITA[®], a fin de detectar posibles variantes somaclonales provenientes de la regeneración de yemas adventicias.

4. Evaluar sistemas de inmersión temporal de mayor capacidad para el escalado de la micropropagación de zábila.

5. Ampliar el número de marcadores moleculares para los estudios de estabilidad genética, valorando especialmente aquellos relacionados con los metabolitos primarios y secundarios de interés comercial que se extraen de la zábila, así como también los relacionados con caracteres morfológicos, de crecimiento y de producción.

8. ÍNDICE DE REFERENCIAS

- Adelberg J. (2004). The new generation bioreactors, PGR's and plant organ development. En: Proceedings Plant Growth Regulator Society of America. Carolina del Sur, Estados Unidos de América pp. 28-29.
- Aggarwal D., K. Barna (2004). Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. Journal Plant Biochemistry and Biotechnology 13: 77-79.
- Ahloowalia B., V. Savangikar (2004). Plant tissue culture. En: Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA). Austria. pp. 41-45.
- Ahmad N., S. Javed, M. Khan, M. Anis (2013). Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Vitex trifolia*: an important medicinal plant. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2493-2500.
- Ahmed M., F. Hussain (2013). Chemical composition and biochemical activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) leaves. International Journal of Chemical and Biochemical Sciences 3: 29-33.
- Aitken J., C. Jones (1987). Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 185-196.
- Aitken J., H. Davies (1988). Development of a semi-automated micropropagation system. En: Symposium on High Technology in Protected Cultivation. Acta Horticulturae 230: 81-88.
- Albany N. (2001). Efectos de los retardantes de crecimiento en la micropropagación de bananas en medios de cultivos líquidos en agitador orbital y sistema de inmersión temporal. Tesis de Maestría. Universidad Central de la Marta de Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba. 80 pp.
- Albany N. (2014). Estandarización y optimización de técnicas moleculares para *Aloe barbadensis* Mill. Trabajo de ascenso a la

categoría de Profesor Titular. Universidad del Zulia, República Bolivariana de Venezuela. 141 pp.

Albany N., E. Jiménez, J. Vilchez, L. García, M. De Fera, N. Pérez, Z. Sarría, B. Pérez y J. Clavero (2005^a). Use of growth retardants for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 213-224.

Albany N., J. Vilchez, L. Garcia, E. Jiménez (2005^b). Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa* AAA) after *in vitro* multiplication with growth retardants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 357–361.

Albany N., J. Vilchez, S. León, M. Molina, A. Nava, L. Martínez, M. Molina (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) Revista Colombiana de Biotecnología 17: 24-31.

Albany N., J. Vilchez, S. León, M. Molina, P. Chacín (2006). Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 23: 213-222.

Alchanatis V., K. Peleg, M. Ziv (1994). Morphological control and mensuration of potato plants from tissue cultures for automated micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 331-338.

Alister B., J. Finnie, M. Watt, F. Blakeway (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 425-442.

Alizadeh M., S. Singh (2009). Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. Iranian Journal of Biotechnology 7: 37-44.

Alvard D., F. Cote, C. Teisson (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary

immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60.

Añez B., J. Vásquez (2005). Efecto de la densidad de población sobre el crecimiento y rendimiento de la sábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 22: 1-12.

Araujo P., J. Duarte, C. Neckel, C. Ianssen, A. Oltramari, R. Dos Pasos, E. Tiepo, D. Bach, M. Maraschin (2002). Micropropagação de babosa (*Aloe vera-Liliaceae*). *Biotecnologia Ciência y Desenvolvimento* 25: 54-57.

Asthana P., V. Jaiswal, U. Jaiswal (2011). Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1821-1829.

Badar Z., S. Khan, K. Saifullah, S. Musharraf, M. Choudhary (2013). *In vitro* and biotransformational studies of *Aloe barbadensis* Mill. *Pakistan Journal of Botany* 46: 679-685.

Bairu M., A. Aremu, J. Van Standen (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.

Bairu M., M. Kane (2011). Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regulation* 63: 101-103.

Baksha R., M. Akhter, R. Khatun, J. Liton (2005). Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill. through *in vitro* culture of shoot tip explants. *Plant Tissue Culture & Biotechnonology* 15: 121-126.

Bello J., A. Canto, E. Balam, E. Gómez, M., L. Robert, L. Iglesias, N. Santana (2010). Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of Habanero Pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by temporary immersion. *HortScience* 45: 1093-1098.

Berthouly M., H. Etienne (2005). Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. *En: Liquid*

culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 165-195.

Bhatia R., K. Singh, T. Sharma, T. Jhang (2011). Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 131-135.

Bozzi A., C. Perrin, S. Austin, F. Arce (2006). Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. *Food Chemistry* 103: 22-30.

Campestrini L., S. Kuhnen, P. Lemos, D. Bach, P. Dias, M. Maraschin (2006). Cloning protocol of *Aloe vera* as a study-case for "Tailor-Made" biotechnology to small farmers. *Journal of Technology Management Innovation* 1: 76-79.

Canevaro S. (2004). *Aloe Vera*. Primera Edición. Madrid, España. Editorial Tikal. 93 p.

Cardarelli M., M. Cardona, G. Colla (2014). Influence of ozone treatments on *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* in continuous immersion bioreactor. *Industrial Crops and Products* 55: 194-201.

Carpano S., M. Castro, E. Spegazzini (2009). Caracterización morfoanatómica comparativa entre *Aloe vera* (L.) Burm. F., *Aloe arborescens* Mill., *Aloe saponaria* Haw. y *Aloe ciliaris* Haw. (Aloeaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19: 269-275.

Chakrabarty D., Y. Dewir, E. Hahn, S. Datta, K. Paek (2007). The dynamics of nutrient utilization and growth of Apple rootstock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation* 51: 11-19.

Chalageri G., U. Babu (2012). *In vitro* plant regeneration via petiole callus of *Viola patrinii* and genetic fidelity assessment using RAPD markers. *Turkish Journal of Botany* 36: 358-368.

Chaney W., S. Bai (2004). Evidence of growth stimulation by low concentration of gibberellin synthesis inhibitors. *Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America* 31: 44-54.

- Chavan J., N. Gaikwad, S. Umdale, P. Kshirsagar, K. Bhat, S. Yadav (2014). Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis, molecular profiling, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Ceropegia santapau*. *Plant Growth Regulation* 72: 1-15.
- Chen J., M. Ziv (2001). The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. *Plant Cell Reports* 20: 22-27.
- Chen J., M. Ziv (2004). Ancymidol-enhanced hyperhydric malformation in relation to gibberellin and oxidative stress in liquid-cultured *Narcissus* leaves. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 40: 613-616.
- CIRAD (**C**entre de coopération **I**nternationale en **R**echerche **A**gronomique pour le **D**éveloppement) (2015). RITA[®]: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado, Funcionamiento. Montpellier, Francia. Disponible en: <http://www.vitropic.fr/rita>. Consultado el 07 de febrero de 2015.
- Colmenares M., C. Giménez (2003). Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 20: 468-477.
- Damiano C., A. Gentile, S. La Starza, A. Frattarelli, S. Monticelli (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae* 616: 359-364.
- Daneshvar M., N. Moallemi, N. Zadeh (2013). The effects of different media on shoot proliferation from the shoot tip of *Aloe vera* L. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 8: 93-97.
- De Fera M., M. Chávez, E. Quiala, E. Jiménez (2003). Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 3: 149-154.
- De Lima N., M. Oropeza, A. Pérez, I. Trujillo (2006). Análisis de la estabilidad genética de plantas de *Stylosanthes capitata* Vog.,

regeneradas "*in vitro*" utilizando marcadores RAPDs. *Agronomía Tropical* 56: 663-675.

De Souza D., D. De Siqueira, P. Cecon, D. Dos Santos (2010). Micropropagación das bananeiras Prata-Anã e FHIA 01 a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32: 561-570.

Devarumah R., S. Nandy, V. Rani, S. Marimuthu, N. Muraleedharan, S. Raina (2002). RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (china type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reports* 21: 166-173.

Díaz A., L. Ávila (2002). Sondeo del mercado mundial de sábila (*Aloe vera*). Bogotá, Colombia. Editado por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 21 p.

Domínguez R., I. Arzate, J. Chamona, J. Welti, J. Alvarado, G. Calderón, V. Garibay, G. Gutiérrez (2012). El gel de *Aloe vera*: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11: 23-43.

Doyle J., J. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Espinosa L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Quinta Parte: Las herramientas moleculares. En: *Ecología molecular*. Eguiarte L., V. Souza, X. Aguirre (Eds.). Primera edición. México D.F., México. Editado por el Instituto Nacional de Ecología. pp. 517-540. ISBN: 978-968-817-839-3.

Etienne H., M. Berthouly (2002). Temporary immersion systems in the plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231.

Faisal M., A. Alatar, N. Ahmad, M. Anis, A. Hegazy (2012). An efficient and reproducible method for *in vitro* clonal multiplication of

Rauvolfia tetraphylla L. and evaluation of genetic stability using DNA-based markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168: 1739-1752.

Fatima N., N. Ahmad, M. Anis (2012). *In vitro* propagation of *Cuphea procumbens* Orteg. and evaluation of genetic fidelity in plantlets using RAPD markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21: 51-59.

Fourre K., L. Berger, P. Niquet, I. Andre (1997). Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenic, cytogenic, and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159-169.

Franco V., J. Véliz, L. de Astudillo (2012). Ecofisiología de *Aloe vera* (L.) Burm. f. en Guayacán, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *Interciencia* 37: 444-450.

Fuentes A., J. Véliz, J. Buiza (2006). Efecto de la deficiencia de macronutrientes en el desarrollo vegetativo de *Aloe vera*. *Interciencia* 31: 116-122.

Gaba V., C. Elman, A. Watad, D. Gray (1996). Ancymidol hastens in vitro bud development in melon. *HortScience* 31: 1223-1224.

Gangopadhyay G., S. Das, S. Mitra, R. Poddar, B. Modak, K. Mukherjee (2002). Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 301-310.

Gantait S., N. Mandal, S. Bhattacharyya, P. Kanti (2010). Determination of genetic integrity in long-term micropropagated plantlets of *Allium ampeloprasum* L. using ISSR markers. *Biotechnology* 9: 218-223.

George E. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1: The Technology*. Segunda Edición. Great Britain, Exegetics Ltd. 574 p.

Georgiev V., A. Schumann, A. Pavlov, T. Bley (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14: 607-621.

- Giménez C., M. Colmenares (2004). Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 21: 1-7.
- González R., D. Ríos, F. Avilés, M. Sánchez (2011). Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. Bosque 32: 147-154.
- Goto S., R. Thakur, K. Ishii (1998). Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. Plant Cell Reports 18: 193-197.
- Grace O., R. Klopper (2014). Nomenclatura revisada para aloe. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Vigésima primera reunión del Comité de Flora Veracruz (México), 2-8 de mayo. 4 p.
- Gryson N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396: 2003-2022.
- Guillot D., E. Laguna, J. Rosselló (2008). La familia Aloaceae en la flora alóctona valenciana. Monografías de la revista Bouteloua. Número 6. Valencia, España. Editorial Flora Montibérica.org. 58 p.
- Guillot D., P. Van Der Merr (2005). Nuevos datos de las familias Agavaceae y Aloaceae en la costa mediterránea de la Península Ibérica. Flora Montiberica 30: 3-8.
- Guo B., M. Gao, C. Liu (2007). *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. Plant Cell Reports 26: 261-265.
- Hamman J. (2008). Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. molecules 13: 1599-1616.
- Hammer O., D. Harper, P. Ryan (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 1-9.

- Harris R., E. Manson (1983). Two machines from *in vitro* propagation of plant in liquid media. Canadian Journal of Plant Science 63: 311-316.
- Hashem D., B. Kaviani (2008). Rapid micro-propagation of *Aloe vera* L. via shoot multiplication. African Journal of Biotechnology 7: 1899-1902.
- Hashem D., B. Kaviani (2010). *In vitro* proliferation of an important medicinal plant Aloe: A method for rapid production. Australian Journal of Crop Science 4: 216-222.
- Hosseini R. y M. Parsa (2007). Micropropagation of *Aloe vera* L. grown in South Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 113-1137.
- Ilezuk A., T. Winkelmann, S. Richartz, M. Witomska, M. Serek (2005). *In vitro* propagation of *Hippeastrum x chmielli* Chm. – influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 339-346.
- Internacional Aloe Science Council (2009). Consejo Internacional de ciencia de la sábila. Organización no gubernamental. Disponible en: <http://www.iasc.org/index.html>. Consultado el 23 de febrero de 2015.
- Jeong B., K. Fuiwara, T. Koszai (1995). Environmental control and photoautrophic micropropagation. Horticultural Reviews 17: 125-171.
- Jiménez E. (1998). Cultivo de apices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.). Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 45-56.
- Jiménez E. (2005). Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 197-212.

- Jiménez E., M. de Feria (1998). Empleo de biorreactores para la propagación masiva. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.) Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 207-224.
- Jiménez E., N. Pérez, M. de Feria, R. Barbón, A. Capote, M. Chávez, E. Quijada, J. Pérez (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23.
- Khunachak A., C. Chin, T. Le, T. Gianfagna (1987). Promotion of asparagus shoot and root growth by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 97-110.
- Krishnapuram S., N. Pandey (2011). Method for *in vitro* mass culture of *Aloe vera*. Patente de invención, Número 7,892,831. Washington, Distrito de Columbia, USA. Registro US007892831B2.
- Lakshmanan V., S. Reddampalli, B. Neelwarne (2007). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 106-113.
- Lee Y., H. Park, S. Park, J. Baek, T. Yang (2013). Optimal protocol for mass propagation of *Aloe vera*. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 16: 285-290.
- Liao Z., M. Chen, F. Tan, X. Sun, K. Tang (2004). Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 83-86.
- Liu X., G. Yang (2012^a). Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48: 172-179.
- Liu X., G. Yang (2012^b). Assessment of clonal fidelity of micro-propagated guava (*Psidium guajava*) plants by ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science* 6: 291-295.

- Lorenzo J., B. González, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa, C. Borroto (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 197-200.
- Lugo Z., D. Tua, M. Naveda (2005). El cultivo de la zábila en Venezuela y costos de producción para acíbar. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias en Venezuela. CENIAP. Número 9. ISSN: 1690-4117. Maracay, Aragua. Disponible en: http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n7/arti/lugo_z/arti/lugo_z.htm. Consultado el 29 de octubre de 2014.*
- Lugo Z., H. Piña, A. Fernandez (2010). Indicadores básicos del desarrollo de la zábila (*Aloe vera* L.) en el estado Falcón para el año 2009. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias en Venezuela. CENIAP. Número 7. ISSN: 1856-9951. Maracay, Aragua. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/lugo_z/arti/lugo_z.htm. Consultado el 29 de marzo de 2015.*
- Maki S., M. Delgado, J. Adelberg (2005). Time course study of Ancymidol for micropropagation of *Hosta* in a liquid culture system. *HortScience* 40: 764-766.
- Mamdouh D., H. Marghany, E. Ewais (2014). Assessment of somaclonal variation of calli and regenerated plants of three cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars using molecular markers. *Report and Opinion* 6: 8-19.
- Matos A. (2007). Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila). *Ciencia* 15: 319-330.
- Matos A., J. Molina, D. Acosta (2000). Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia* 8: 280-284.
- McCown B. (2003). Biotechnology in horticulture: 100 years of application. *HortScience* 38: 1026-1030.

- Medina A., C. Ramis, D. Rodríguez (2010). Variabilidad genética del germoplasma de algunas especies de los géneros *Carica* y *Vasconcellea* (*Caricaceae*) con el uso de marcadores RAPD. Revista de la Facultad de Agronomía (UCV) 36: 116-124.
- Méndez C., A. Faría, F. Osorio, A. Nava (2010). Evaluation of DNA extraction methods from dried and frozen tomato leaves for detecting begomoviruses by PCR. *Interciencia* 35: 823-827.
- Meneses N., M. Oloriz (1998). Aplicaciones de la biología molecular en la mejora genética de plantas. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Pérez J. (Ed.). Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 355-366.
- Meneses S., M. García, E. Alvarez, G. Abad, E. Estrada (2000). Efecto del paclobutrazol en la proliferación de brotes y la resistencia al marchitamiento en vitroplantas de ñame cultivadas en medio líquido. *Biotecnología Vegetal* 1:27-32.
- Meyer H., J. Van Staden (1991). Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 167-171.
- Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (2007). Plan Integral de desarrollo agrícola 2007-2008. Disponible en línea en: <http://www.inia.gov.ve/downloads/documentos/pida07-08.pdf>. Consultado el 22 de febrero de 2009.
- Moghaddasi S., S. Kumar (2011). *Aloe vera* their chemicals composition and applications: A review. *International Journal of Biological & Medical Research* 2: 466-471.
- Mohanty S., R. Parida, S. Singh, R. Joshi, E. Subudhi, S. Nayak (2011). Biochemical and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown *Kaempferia galanga*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 39-46.
- Molero T., L. Bermúdez (2013). Tasa de propagación de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. f. del occidente de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 30: 392-409.

- Molero T., M. Narváez, D. Quintero, M. Correa (2013). Producción de gel y acíbar en plantaciones de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) en el Occidente de Venezuela. *Bioagro* 25: 71-76.
- Molsaghi M., A. Moieni, D. Kahrizi (2014). Efficient protocol for rapid *Aloe vera* micropropagation. *Pharmaceutical Biology* 52: 735-739.
- Mukandama J., B. Peteira, M. González (2004). Empleo de marcadores RAPD para el análisis de la variabilidad genética en genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales* 25: 63-66.
- Mukherjee A., B. RoyChowdhury (2008). The *in vitro* propagation of *Aloe vera* sp. *Techno India Group Research Journal* 1: 116-119.
- Murashige T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige T., F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Muthiah J., K. Shunmugiah, R. Manikandan (2013). Genetic fidelity assessment of encapsulated *in vitro* tissues of *Bacopa monnieri* after 6 months of storage by using ISSR and RAPD markers. *Turkish Journal of Botany* 37: 1008-1017.
- Narsih, S. Kumalaningsih, Wignyanto, S. Wijana (2012). Identification of aloin and saponin and chemical composition of volatile constituents from *Aloe vera* (L.) Peel. *Journal of Agriculture and Food Technology* 2: 79-84.
- Natali L., I. Castorena, A. Cavallini (1990). *In vitro* culture of *Aloe barbadiensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 71-74.
- Nayak S., S. Kumar, K. Satapathy, A. Moharana, B. Behera, D. Barik, L. Acharya, P. Mohapatra, P. Jena, S. Naik (2012). *In vitro* plant regeneration from cotyledonary nodes of *Withania somnifera* (L.)

Dunal and assessment of clonal fidelity using RAPD and ISSR markers. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 195-203.

Ning G., X. Fan, W. Huang, M Bao, J. Zhang (2007). Micropropagation of six *Prunus mume* cultivars through axillary shoot proliferation, and ISSR analysis of cloned plants. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica* 49: 25-31.

Opatrná J., P. Novák, Z. Opatrný (1997). Paclobutrazol stimulates bud regeneration in *Solanum tuberosum* L. primary explant cultures. *Biologia Plantarum* 39: 151-158.

Orellana P. (1998^a). Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.). Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 151-178.

Orellana P. (1998^b). Introducción a la propagación masiva. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.) Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 125-133.

Orona, F., V. Pecina, M. Rocha, M. Cadena, O. Martínez, I. Almeyda (2006). Caracterización molecular de genotipos comerciales y élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México. *Agricultura Técnica en México* 32: 171-180.

Ospina O., F. Espejo, C. Rojas (2005). Estructura tridimensional del α -ciclopropil - (p-metoxifenil) - 5 - pirimidinmetanol (ancimidol) utilizando el método de resonancia magnética nuclear. *Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia* 10: 19-26.

Palombi M., C. Damiano (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* 20: 1061-1066.

Panwar B., R. Singh, V. Dwivedi, A. Kumar, P. Kumari (2013). Genetic diversity among Indian Aloe accessions based on RAPD analysis. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 3: 326-333.

- Parida R., S. Mohanty, S. Nayak (2011). Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* propagated greater galangal (*Alpinia galanga* L.) using DNA based markers. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 1: 123-133.
- Pathak, H., V. Dhawan (2012). ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 48: 137-143.
- Pérez J., E. Jiménez, D. Agramonte (1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez J. (Ed.). Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. pp. 179-190.
- Pérez J., N. Albany, J. Vilchez, S. León, M. Molina (2010). Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 27: 447-459.
- Piña H. (2005). Perfil preliminar del mercado de zábila (*Aloe barbadiensis* Mill.) en el estado Falcón, Venezuela. Bioagro 17: 85-92.
- Piña H., R. Azócar, Z. Lugo, C. Romero (2005). Tipología de la producción primaria de zábila (*Aloe barbadensis* L.) en el estado Falcón, Venezuela. Bioagro 17: 25-34.
- Posada L., R. Gómez, M. Reyes, L. Alvares (2003). Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA[®]) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. Biotecnología Vegetal 3: 3-8.
- Preil W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 1-18.
- Quiala E., M. Cañal, M. Meijón, R. Rodríguez, M. Chávez, L. Valledor, R. Barbón (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109: 223-234.

- Rademacher W. (2000). Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology Journal* 51: 501-531.
- Ramachandra C., P. Srinivasa (2008). Processing of *Aloe Vera* Leaf Gel: A Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 502-510.
- Rathore S., J. Chikara, C. Mastan H. Rahman, K. Anand, N. Shekhawat (2011). Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR Markers. *Applied Biochemistry Biotechnology* 165: 1356-1365.
- Rentaría M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. Quinta Parte: Las herramientas moleculares. En: *Ecología molecular*. Eguiarte L., V. Souza, X. Aguirre (Eds.). Editado por el Instituto Nacional de Ecología. México D.F., México. pp. 541-566.
- Ribeiro D., C. Müller, J. Bedin, G. Rocha, R. Barros (2011). Effects of autoclaving on the physiological action of paclobutrazol. *Agricultural Sciences* 2: 191-197.
- Roca W., H. Ramírez (2000). Introducción a la Biotecnología Vegetal. Editado por el Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF), Santo Domingo, República Dominicana 174 p.
- Rodríguez I., H. Barrera (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia, Universidad Autónoma de Nuevo León* 7: 323-335.
- Romano E., A. Miranda (1999). Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência y Desenvolvimento* 9: 40-43.
- Ross S., A. Castillo (2009). Propagación masal de *Vaccinium corymbosum* en biorreactores. *Agrociencia Uruguay* 13: 1-8.
- Saha S., C. Sengupta, P. Ghosh (2014). Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro* propagated *Ocimum basilicum* L. using RAPD and ISSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 17: 281-287.

- Saher S., A. Piqueras, E. Hellin, E. Olmos (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.
- Salazar R., R. Hoyos (2007). Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60: 3907-3921.
- Samantaray S., S. Maiti (2008). Rapid plant generation and assessment of genetic fidelity of *in vitro* raised plants in *Aloe barbadensis* Mill. using RAPD markers *Acta Botanica Gallica* 155: 427-434.
- Sambrook J., D. Russel (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Tercera edición. Editado por: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, Estados Unidos de América.
- Sánchez N., M. Luna, M. Vázquez, L. Sánchez, N. Santana, P. Octavio, L. Iglesias (2012). Optimización de un protocolo del aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18: 123-133.
- Sánchez N., V. Jiménez (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20: 135-151.
- Sandal I., A. Bhattacharya, P. Singh (2001). An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 75-80.
- Saravanan S., R. Sarvesan, M. Vinod (2011). Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauvolfia serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis. *Indian Journal of Science and Technology* 4: 1241-1245.
- Sarkar D., S. Chakrabarti, P. Naik (2001). Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro. *Euphytica* 117: 133-142.
- Sathyanarayana N., P. Vikas, R. Rajesha (2008). *In vitro* clonal propagation of *Mucuna pruriens* var. utilis and its evaluation of

genetic stability through RAPD markers. *African Journal of Biotechnology* 7: 973-980.

Satyahari D. (2005). Cost-effective mass cloning of the plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 127-141.

Savangikar V. (2004). Role of low cost options in tissue culture. En: *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA). Austria. pp. 11-15.

Shuangxia J., M. Ramesh, Z. Huaguo, T. Lili, L. Zhongxu, Z. Yanxin, Z. Xianlong (2008). Detection of somaclonal variation in cotton (*Gossipium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303–1316.

Silva A., I. Trujillo, M. Vidal, V. Pérez (2009). Evaluación de la inducción de variabilidad genética en cambur 'manzano' (*Musa AAB*) a través de marcadores RAPD. *Agronomía Tropical* 59: 413-422.

Sing M., M. Rathore, D. Panwar, J. Rathore, H. Dagla, N. Shekhawat (2009). Micropropagation of selected genotype of *Aloe vera* L. An ancient plant for modern industry. *Journal of Sustainable Forestry* 28: 935-950.

Singh B., R. Yadav, H. Singh, G. Singh, A. Punia (2010). Studies of effect PCR-RAPD conditions for molecular analysis in *Asparagus* (Satawari) and *Aloe vera* medicinal plants. *Australin Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 6570-6574.

Singh S., S. Dalal, R. Singh, A. Dhawan, R. Kalia (2013). Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 49: 572-583.

- Smith E., A. Roberts, J. Mottley, S. Denness (1991). The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil. 4. The effects of eleven growth retardants on wilting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 309-313.
- Soni M., R. Kaur (2014). Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20: 95-101.
- Statistix (2003). Statistix for Windows version 8.0. User's manual. analytical software. Tallahassee, Florida, USA.
- Sugavanam B. (1984). Diastereoisomers and enantiomers of paclobutrazol: their preparation and biological activity. *Pesticide Science* 15: 296-302.
- Takayama S., M. Akita (2005). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 61-78.
- Tamay L., C. Ibarra, C. Velasquillo (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2: 70-78.
- Tanabe M., K. Horiuchi (2006). *Aloe barbadensis* Mill. *ex vitro* autotrophic culture. *Journal for Hawaiian and Pacific Agriculture* 13: 55-59.
- Te-chato S., P. Nujeen, S. Muangporn (2009). Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's *Dendrobium* orchid *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology* 5: 157-165.
- Tefera W., S. Wannakraij (2006). Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen). *African Journal of Biotechnology* 5: 1894-1901.

- Teisson C., D. Alvard, B. Berthouly, F. Cote, J. Escalant, H. Etienne, M. Lartaud (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Horticulturae* 440: 521-526.
- Thakur R., A. Sood, P. Nagar, S. Pandey, R. Sobti, P. Ahuja (2006). Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. *Plant Cell Reports* 25: 382-391.
- Tisserat B., C. Vandercook (1985). Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 107-117.
- Tiwari J., C. Poonam, S. Gupta, J. Gopal, B. Singh, V. Bhardwaj (2013). Analysis of genetic stability of *in vitro* propagated potato microtubers using DNA markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19: 587-595.
- Toothman P. (1999). Method of identifying *Aloe* using PCR. Patente de invención, Número 6,001,572. Univera Pharmaceuticals, Inc., Broomfield, Colorado, USA. Registro US006001572A.
- Ujjwala J. (2007). *In vitro* regeneration of *Aloe barbadensis*. *Biotechnology* 6: 601-603.
- Vega A., N. Ampuero, L. Díaz, R. Lemus (2005). El aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición* 32: 208-214.
- Velcheva M., Z. Faltin, A. Vardi, Y. Eshdat, A. Perl (2005). Regeneration of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83: 297-301.
- Venkatachalam L., R. Sreedhar, N. Bhagyalakshmi (2007). Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 267-274.

- Vilchez J., N. Albany (2014). Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. Revista Colombiana de Biotecnología 16: 96-103.
- Vilchez J., N. Albany, L. Martínez, M. Molina, C. Pirela, M. Molina, C. Álvarez, J. Chirinos (2011). Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Revista Colombiana de Biotecnología 13: 94-102.
- Vilchez J., O. Ferrer, N. Albany (2007). Multiplicación *in vitro* de zabila en sistema de inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 24: 78-82.
- Wang Z., P. Heinemann, P. Walker, C. Heuser (1999). Automated micropropagated sugarcane shoot separation by machine vision. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 42: 247-254.
- Whitehouse A., T. Marks, G. Edwards (2002). Control of hyperhydricity in Eucalyptus axillary shoot cultures grown in liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 245-252.
- Xinqi Ch., M. Gilbert (2000). *Aloe* Linnaeus. Flora de China 24:160-161.
- Zakia S., N. Zahid, M. Yaseen, N. Abbasi, A. Hafiz, N. Mahmood (2013). Standardization of micropropagation techniques for *Aloe vera*: A pharmaceutically important plant. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 26: 1083-1087.
- Žiauka J., S. Kuusienė (2010). Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during *in vitro* culture of aspen (*Populus tremula* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 221-228.
- Ziv M. (1989). Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 101-110.

- Ziv M. (1990). The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured gladiolus plants. *Acta Horticulturae* 280: 207-214.
- Ziv M. (1995). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae* 393: 25-38.
- Ziv M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Hvoslef A., W. Preil (Eds.). Springer. Dordrecht, Holanda. pp. 79-93.
- Ziv M., A. Hadar (1991). Morphogenic pattern of *Neprolepsis exaltata* Bostoniensis in agar-gelled or liquid culture. Implication for mass propagation. *Israel Journal of Botany* 40: 7-16.
- Ziv M., D. Shemesh (1996). Propagation and tuberization of potato bud cluster from bioreactor culture. *In vitro Cell, Developmental Biology Plant* 32: 31-36.
- Ziv M., G. Ronen, M. Raviv (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In vitro Cell, Developmental Biology Plant* 34: 152-158.
- Ziv M., T. Ariel (1991). Bud proliferation and plant regeneration in liquid-cultured philodendron treated with ancymidol and paclobutrazol. *Plant Growth Regulation* 10: 53-57.

9. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios realizados para la evaluación de la estabilidad genética en plantas micropropagadas.	58
Cuadro 2. Tratamientos diseñados para evaluar el efecto de los retardantes de crecimiento (RC) paclobutrazol (PBZ) y ancimidol (ANC), a una concentración de 2,5 mg·L ⁻¹ en el medio de cultivo líquido en agitación continua para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila.	66
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar las concentraciones de ancimidol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA [®]) para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila.	68
Cuadro 4. Descripción de los tratamientos para determinar el tiempo y la frecuencia de inmersión en sistemas de inmersión temporal tipo RITA [®] para la multiplicación <i>in vitro</i> de zábila con 1 mg·L ⁻¹ de ANC.	69
Cuadro 5. Descripción de los tratamientos para evaluar la cantidad de brotes <i>in vitro</i> de zábila sembrados en los RITA [®] para la multiplicación con ANC.	70
Cuadro 6. Descripción de los tratamientos para comparar, en la fase de enraizamiento, brotes multiplicados en los RITA [®] , con y sin Ancimidol (ANC).	71
Cuadro 7. Componentes y cantidad en la reacción de 25 µL para la amplificación del ADN de zábila en la PCR.	81
Cuadro 8. Descripción de los iniciadores RAPD y ISSR con sus respectivas temperatura de hibridación (Th) y programa de funcionamiento en la PCR para la amplificación del ADN de zábila.	82

Cuadro 9. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación <i>in vitro</i> con retardantes de crecimiento (RC) paclobutrazol (PBZ) y ancimidol (ANC) a una concentración de 2,5 mg·L ⁻¹ en el medio básico de multiplicación líquido en agitación y gelificado.....	88
Cuadro 10. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación <i>in vitro</i> con las concentraciones de 0; 1; 2,5 y 5 mg·L ⁻¹ de ancimidol (ANC), en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA [®]).....	94
Cuadro 11. Valores medios de las variables de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación <i>in vitro</i> con 1 mg·L ⁻¹ de ancimidol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA [®]) programados con diferentes tiempos y frecuencias de inmersión.	102
Cuadro 12. Valores medios de las variables de producción de los brotes cultivados de zábila obtenidos en la multiplicación <i>in vitro</i> con 6, 8, 10 y 12 brotes cultivados en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA [®]) que contenía 1 mg·L ⁻¹ de ancimidol (ANC) en 250 mL de medio de cultivo. .	105
Cuadro 13. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila provenientes de la multiplicación <i>in vitro</i> sin y con 1 mg·L ⁻¹ de ANC en los RITA [®] , al inicio de la fase de enraizamiento.	109
Cuadro 14. Valores medios de las variables morfológicas y de producción de los brotes de zábila provenientes de la multiplicación <i>in vitro</i> sin y con 1 mg·L ⁻¹ de ANC en los RITA [®] , al final de la fase de enraizamiento.	109
Cuadro 15. Número y rango de pesos moleculares de segmentos de ADN amplificados (bandas) en la PCR-RAPD y PCR-ISSR de las vitroplantas (V ₁ -V ₁₄) e hijuelo (H) de zábila.	116

Cuadro 16. Matriz de similitud genética en base al coeficiente de Jaccard generada de los marcadores moleculares RAPD e ISSR para los pares de vitroplantas (V₁-V₁₄) e hijuelo (H) de zábila.125

10. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Venezuela con los principales estados productores de zábila.....	28
Figura 2. Diagrama de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal tipo BIT [®] (Georgiev <i>et al.</i> , 2014).....	41
Figura 3. Diagrama de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA [®] (CIRAD, 2015).....	43
Figura 4. Ruta de biosíntesis de las Giberelinas (GAs) (Chaney y Bai, 2004; Rademacher, 2000).....	48
Figura 5. Estructura química del ancimidol (Ospina <i>et al.</i> , 2005).	49
Figura 6. Estructura química del paclobutrazol (Sugavanam, 1984).	50
Figura 7. Cultivos <i>in vitro</i> de brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) del cuarto ciclo de cultivo para iniciar los experimentos de la etapa de propagación <i>in vitro</i>	63
Figura 8. Apariencia del conglomerado o cluster de zábila (<i>A. barbadensis</i>).	67
Figura 9. Variables morfológicas medidas en los brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>).	74
Figura 10. Grupo de plantas de zábila (<i>A. barbadensis</i>) provenientes de la multiplicación <i>in vitro</i> con ancimidol (ANC) seleccionadas para el estudio molecular.	76
Figura 11. Proceso de extracción del tejido foliar de zábila (<i>A. barbadensis</i>).	78
Figura 12. Brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) cultivados y conglomerados de brotes nuevos obtenidos con y sin	

retardantes de crecimiento (RC) en el medio básico de multiplicación (MBM).	87
Figura 13. Brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) cultivados y conglomerados de brotes nuevos obtenidos con y sin ancimidol (ANC) en el medio básico de multiplicación (MBM) gelificado y líquido en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®).....	95
Figura 14. Brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) obtenidos de la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) con ancimidol (ANC) y 4 programas de inmersión temporal (tiempo y frecuencia).....	104
Figura 15. Necrosamiento basal de los brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) en los tratamientos con menor número de brotes sembrados en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) con ancimidol (ANC) en la fase de multiplicación.	107
Figura 16. Brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) <i>in vitro</i> provenientes de la multiplicación sin y con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ancimidol (ANC) en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) para iniciar la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> . (a) Número de hojas, (c) longitud del brote y (e) diámetro del brote <i>in vitro</i> proveniente de la multiplicación en RITA® con ANC. (b) Número de hojas, (d) longitud del brote (f) y diámetro del brote <i>in vitro</i> proveniente de la multiplicación en RITA® sin ANC.	111
Figura 17. Brotes de zábila (<i>A. barbadensis</i>) en diferentes momentos de la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> , provenientes de la multiplicación en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®).....	112
Figura 18. Electroforesis de ADN genómico extraído de las vitroplantas e hijuelo de zábila.	115

Figura 19. Productos de la PCR-OPAE-01 de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila.	120
Figura 20. Productos de la PCR-OPAE-10 de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila.	121
Figura 21. Productos de la PCR-ISSR-F de ADN de las vitroplantas e hijuelo de zábila.....	123
Figura 22. Dendograma jerárquico de las vitroplantas (V_1 a V_{14}) e hijuelo (H) de zábila, obtenido por el método de agrupamiento UPGMA (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>) utilizando los coeficientes de similitud de Jaccard generados por los perfiles genéticos de los productos de la amplificación del ADN de zábila con OPAE-01, OPAE-10, OPAE-19, OPL-07, OPR-18, ISSR-E e ISSR-F.....	128

11. LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C:	Grados Celsius.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ANC:	Ancimidol.
ARNasa:	Enzima ribonucleasa.
BAP:	Bencilaminopurina.
BIT [®] :	Biorreactor de Inmersión Temporal ([®] marca registrada comercialmente).
BP:	Banda (s) polimórfica (s).
CIRAD:	Centre de Coopèration Internationale en Reserche Agronomique pour le Dèveloppement.
CTAB:	Bromuro de cetiltrimetilamonio.
CV:	Coeficiente de variación.
D _C :	Desnaturalización en cada ciclo.
D _I :	Desnaturalización inicial.
DNTPs:	Dinucleotidos trifosfatados.
dp:	Diámetro del pseudotallo.
E _C :	Extensión en cada ciclo.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
E _f :	Extensión final.
Fig:	Figura.
GAs:	Giberelinas.
GoTaq [®] :	Enzima polimerasa ([®] marca registrada comercialmente).
H:	Hijuelo.
H _C :	Hibridación en cada ciclo.
IASC:	Internacional Aloe Science Council.
ISSR:	Secuencias Simples Internas Repetidas.
Kb:	Kilobase.

MB:	Medio de cultivo básico.
MBM:	Medio básico de multiplicación.
MG:	Media general.
MM:	Marcador de peso molecular.
mM:	Milimol (es).
N _C :	Número de ciclos.
pb:	Pares de bases.
PBZ:	Paclobutrazol.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PVP:	Polivinilpirrolidona.
RAPD:	Amplificaciones Aleatorias de ADN Polimórfico.
RC:	Retardantes de Crecimiento.
RITA [®] :	Recipiente de Inmersión Temporal Automatizados ([®] marca registrada comercialmente).
rpm:	Revoluciones por minuto.
SIT:	Sistemas de Inmersión Temporal.
TDZ:	Tiadizuron.
Th:	Temperatura de hibridación.
Th _c :	Temperatura de hibridación teórica calculada.
Tris-HCl:	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano.
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean.
UV:	Ultra violeta.
v/v:	Volumen sobre volumen.
V:	Vitroplanta (s).