

INDICE GENERAL

i Dedicatoria	
ii Agradecimientos	
iii Índice general	
iv Índice de cuadros	
v Índice de figuras	
vi Índice de abreviaciones	
vii Resumen	
	Pag.
1. INTRODUCCION.....	1
 2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Morfogénesis.....	3
2.1.1. Historia.....	4
2.1.2. Organogénesis.....	4
2.1.3. Embriogénesis somática.....	7
2.1.4. Uso de las inflorescencias inmaduras en el cultivo <i>in vitro</i>	9
2.1.5. El Ácido 2,4-Diclorofenoxyacético (2,4-D) en el cultivo de tejidos vegetales.....	10
2.1.6. El ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) en el cultivo de tejidos vegetales.....	12
2.1.7. Sacarosa como fuente de carbono.....	14
2.2. <i>Aloe barbadensis</i> Mill. (Sábila).....	15
2.2.1. Generalidades.....	17
2.2.2. Extractos y principios activos.....	17
2.2.3. Usos de la sábila.....	19
2.3. <i>Aloe barbadensis</i> Mill. Cultivo <i>in vitro</i>	20
2.4. <i>Aloe barbadensis</i> Mill. Estudios citológicos y citogenéticos.....	22
2.4.1. Estudios cariotípicos.....	23
2.4.2. Estudios citológicos <i>In situ</i>	24
2.4.3. Estudios citológicos <i>In vitro</i>	25
 3. MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1. Cultivo <i>in vitro</i>	27
3.1.1. Material biológico.....	27
3.1.2. Protocolo de esterilización.....	27
3.1.3. Pretratamiento del material biológico.....	27
3.1.4. Siembra del Material.....	28
3.1.5. Condiciones de cultivo.....	29

3.2. Diseño de los experimentos.....	30
3.2.1. Experimento I.....	30
3.2.2. Experimento II.....	31
3.3. Aclimatación de las plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	32
3.4. Estudio cromosómico.....	32
3.4.1. Material biológico.....	32
3.4.2. Pretratamiento y fijación.....	32
3.4.3. Hidrólisis, digestión y tinción.....	32
3.4.4. Preparaciones temporales y toma de microfotografías.....	32
3.4.5. Análisis de los cromosomas.....	33
3.5. Histología.....	33
3.5.1. Material biológico y fijación.....	33
3.5.2. Inclusión en resina y cortes en el microtomo.....	34
3.5.3. Tinción y toma de microfotografías.....	34
3.6. Análisis estadístico.....	34
3.6.1. Longitud de las inflorescencias.....	34
3.6.2. Parámetros cromosómicos.....	37
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. Selección del explante.....	39
4.1.1. Estudio del desarrollo de la inflorescencia.....	39
4.1.2. Criterio de selección del explante.....	42
4.2. Experimento I. Efecto del 2,4-D y Picloram en inflorescencias nimaduras.....	42
4.3. Experimento II. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y sacarosa sobre las diferentes regiones de la inflorescencia.....	45
4.4. La obtención de regenerantes en inflorescencias de sábila.....	48
4.4.1. Análisis estadístico de las longitudes de inflorescencias de sábila usadas.....	51
4.5. Estudio histo-citológico de los explantes usados para la inducción del cultivo <i>in vitro</i>	52
4.5.1. Base de la inflorescencia.....	52
4.5.2. Rgión media de la inflorescencia.....	53
4.5.3. Región apical de la inflorescencia.....	54
4.5.4. Estudio histo-citológico y el cultivo <i>in vitro</i>	54
4.6. Análisis citogenético.....	62
 5. CONCLUSIONES.....	73
 6. Bibliografía.....	74

RESUMEN

Se obtuvo regeneración de plántulas a partir de explantes tomados de inflorescencias inmaduras (1.5 - 2.0 cm) de *Aloe barbadensis* Mill. (sábila), cultivadas en un medio MS modificado. Se estudió la respuesta de algunos factores que podrían ser claves en la obtención de regenerantes, como estado de desarrollo del explante (dentro del mismo tejido), 2,4-D (6 concentraciones de 0.0-115.84 µM). En todos los tratamientos donde se obtuvieron regenerantes, éstos procedieron de la región media y media superior de la inflorescencia, este fenómeno fue dependiente de la concentración de sacarosa y 2,4-D. Con 3% de sacarosa respondieron 4 tratamientos (2 con 0.11 y 2 con 0.45 µM de 2,4-D). En 6% de sacarosa únicamente se encontró respuesta en 2 tratamientos (ambos con 1.81 µM de 2,4-D). De los 6 tratamientos la condición de sacarosa al 6% y 1.81 µM de 2,4-D fue la mejor. Los regenerantes fueron capaces de formar raíces al transferirse a un medio MS modificado con 3% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento.

Se realizó un estudio histo-citológico de los explantes y material cultivado *in vitro* para conocer las condiciones de los tejidos, así como observar los eventos del proceso de inducción y establecer las posibles causas de la baja frecuencia de regeneración y falta de repetibilidad del fenómeno. Los explantes previos a la inducción del cultivo presentan una disposición de tejidos típico de monocotiledóneas, el desarrollo y diferenciación es gradual en la inflorescencia, los botones florales de la base son los más desarrollados y los del ápice los menos diferenciados. La zona que responde a la formación de regenerantes, se compone de primordios florales con un grado de desarrollo incipiente, con alta actividad mitótica, citoplasma denso, núcleo grande y baja relación citoplasma-núcleo. Después de 15 días de inducción se detiene la actividad mitótica en la zona de los primordios florales, permaneciendo quiescentes durante el resto del cultivo. Las células parenquimatosas y altamente diferenciadas crecen de forma desproporcionada originando un callo translúcido, friable, suave y no morfogenético que cubre las zonas meristemáticas.

Se analizó estadísticamente el cariotipo de algunas de las plantas regeneradas mostrando un complemento cromosómico normal ($2n = 2x = 14$) con 8 pares de cromosomas largos subterminales y 6 pares de cromosomas cortos submedianos en todas las células, observándose la existencia de satélites en los brazos largos de dos pares de cromosomas largos (L1 y L4). Existe una variabilidad propia de la especie, que se modifica ligeramente en el cultivo *in vitro*, (principalmente el cromosoma L2). La variación se refleja en la relación de brazos y longitud de cromatina total; las modificaciones se deben a cambios mínimos de la longitud de los brazos, ésta variación se encuentra dentro de los niveles de variación de los controles. La única variación drástica observada fue la formación de regiones de tejido con células tetraploidies en una planta del tratamiento IOO2.