

**EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Aloe vera*, *Kalanchoe pinnata*, *Zea mays*,
Gerbera jamesonii Y DEL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO OxG (*Elaeis oleífera* x
Elaeis guineensis) y COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE REGULADORES DE
CRECIMIENTO VEGETAL DE TIPO AUXÍNICO Y CITOQUINÍNICO EN EL CULTIVO
in vitro DE *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Violeta africana)**

JENNIFER RODRÍGUEZ COBO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director

NEFTALÍ MESA LÓPEZ

Magíster en Dirección Universitaria

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

IBAGUÉ - TOLIMA

2014



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Aloe vera*, *Kalanchoe pinnata*, *Zea mays*, *Gerbera jamesonii* Y DEL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO O_xG (*Elaeis Oleifera* x *Elaeis guineensis*) COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL DE TIPO AUXÍNICO Y CITOQUINÍNICO EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Violeta africana)

AUTORES: Jennifer Rodríguez Cobo (070100582009)

DIRECTOR: Nefthalí Mesa López

JURADOS: Alba Lucía Villa Triana
Diana Marcela Beltrán

CALIFICACIÓN: 4.2

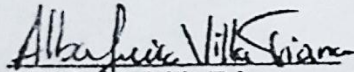
APROBADO

REPROBADO

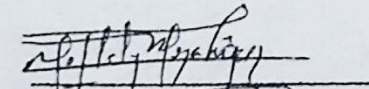
OBSERVACIONES:

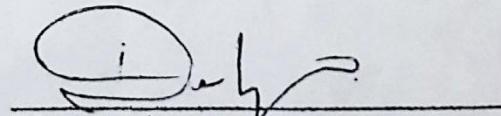
Se sugiere cambio del nombre del material vegetal empleado como se indica en las gotas. Es importante que se verifiquen las correcciones en el documento luchas por los jurados.

FIRMAS


Alba Lucía Villa Triana


Diana Marcela Beltrán


Director del trabajo


Director del programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 27 de Febrero de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Neftalí Mesa, quien me brindo soporte y apoyo incondicional desde el principio hasta al final abriéndome la puerta del Laboratorio de Protección de Plantas y al Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal (GEBIUT).

A la profesora Gisou Díaz por su tiempo y paciencia en los análisis estadísticos.

A Diana Carvajal por su interés, ejemplo de agilidad, disciplina y orden.

A Gianina Rozo y Paola Bonilla por su asesoría.

A mis padres por su apoyo total siempre.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. OBJETIVOS.....	12
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 GENERALIDADES DE <i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl. (Violeta africana)	13
2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl.	13
2.1.2 Distribución y hábitat.	13
2.1.3 Descripción morfológica de la especie.	13
2.2 CULTIVO <i>in vitro</i>	14
2.2.1 Reguladores de crecimiento vegetal.	14
2.2.1.1 Auxinas.	15
2.2.1.2 Citoquininas.....	15
2.2.1.3 Giberelinas.	16
2.2.1.4 Ácido abscísico.	16
2.2.1.5 Etileno.	17
2.3 ESPECIES CON POTENCIAL DE REGULADOR DE CRECIMIENTO VEGETAL .	17
2.3.1 <i>Aloe vera</i> (Sábila).....	17
2.3.2 <i>Zea Mays</i> (Maíz).	18

2.3.3 Híbrido <i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i> (Palma de Aceite).....	18
2.3.4 <i>Gerbera jamesonii</i> (Margarita africana).....	19
2.3.5 <i>Kalanchoe pinnata</i> (Hoja del Aire).....	19
2.4 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	19
3. METODOLOGÍA.....	24
3.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DEL GEL DE <i>Aloe vera</i> “SÁBILA” ...	26
3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Kalanchoe pinnata</i> Y <i>Gerbera jamesonii</i>	26
3.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ENDOSPERMO DE <i>Zea mays</i> L. “Maíz” ...	28
3.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ENDOSPERMO DE HÍBRIDO <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i> “PALMA DE ACEITE”	28
3.5 VARIABLES EVALUADAS.....	30
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOQUINÍNICO	32
4.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO AUXÍNICO	39
5. CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos	244
Tabla 2. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo citoquinínico para la variable número de brotes a los 20, 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	33
Tabla 3. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo citoquinínico para la variable número de hojas a los 20, 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	345
Tabla 4. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable número de raíces a los 20, 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	40
Tabla 5. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable Altura (cm) a los 20, 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	42
Tabla 6. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable Producción de callo a los 20, 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	477

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Gerbera jamesonii</i> (izquierda) y <i>Kalanchoe pinnata</i> (derecha) ...	277
Figura 2. Limpieza de hojas jóvenes de <i>Gerbera jamesonii</i>	277
Figura 3. Cotiledón, epicótilo e hipocotilo extraídas de semillas de <i>Zea mays</i>	288
Figura 4. Almendras o endospermo extraído del cuesco o endocarpio del híbrido <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>	299
Figura 5. Macerado de las almendras del híbrido <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>	30
Figura 6. Respuesta generada en tratamiento T1 y T2 del extracto de <i>Aloe vera</i>	34
Figura 7. Número de brotes por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 2...34	
Figura 8. Número de hojas por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 3....36	
Figura 9. Respuesta generada por T6, extracto <i>Kalanchoe pinnata</i>	37
Figura 10. Respuesta generada por T17 del extracto <i>Zea mays</i>	38
Figura 11. Número de raíces por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 4.41	
Figura 12. Altura (cm) por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 5.....	43
Figura 13. Respuesta generada por T9 del extracto <i>Gerbera jamesonii</i>	44
Figura 14. Bacteria presente en segmentos nodales de <i>Violeta africana</i> en tratamientos T15 y T16 del extracto del híbrido <i>E. oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>	45
Figura 15. Oxidación en los tratamientos T11 y T12 del extracto <i>Gerbera jamesonii</i>	46
Figura 16. Porcentaje de presencia de callo en los tratamientos a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 6.....	48

RESUMEN

El cultivo *in vitro* se ha posicionado recientemente como una herramienta biotecnológica útil en la solución de problemas presentes en la reproducción y desarrollo de plantas, pero su uso es limitado por el alto costo de instalaciones, equipos y reactivos necesarios para realizar la siembra en condiciones de asepsia y estimular de manera apropiada el desarrollo de las plantas con el uso de reguladores de crecimiento vegetal. Como una estrategia conducente a aumentar la implementación del cultivo *in vitro* y ponerlo al alcance de agricultores, hasta ahora reducido a pequeños círculos científicos, se utilizaron fuentes de reguladores de crecimiento vegetales presentes de forma natural en las plantas buscando la fácil extracción y bajo costo económico, con un efecto similar a los ofrecidos comercialmente como sintéticos. Para esto se seleccionaron especies reportadas por los contenidos de reguladores de crecimiento como: *Aloe vera* (Extracto de gel de hoja), *Kalanchoe pinnata* (Extracto de hoja), *Zea mays* (Extracto de cotiledón, epicótilo e hipocótilo), Híbrido interespecífico *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* (extracto de endospermo) y *Gerbera jamesonii* (Extracto de hoja). Los extractos obtenidos se aplicaron por inmersión de 10 y 30 minutos a los segmentos nodales de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Violeta africana) y al medio MS (Murashige y Skoog), a una concentración del 10% y 20%. Esta última fue utilizada dado que su protocolo de micropropagación está estandarizado en el Laboratorio de Protección de plantas de la Universidad del Tolima. Los tratamientos con mayor efecto de regulador de crecimiento tipo auxínico y citoquinínico fue *Aloe vera* aplicado por inmersión 10 min y 30 min y *Zea mays* aplicado por inmersión de 10 min. *Kalanchoe pinnata* aplicado por inmersión de 30 min fue el mejor como regulador de crecimiento citoquinínico y *Gerbera jamesonii* aplicado por inmersión de 10 min fue el mejor como regulador de crecimiento auxínico.

Palabras clave: Cultivo *in vitro* vegetal, extractos vegetales, reguladores de crecimiento vegetal, auxinas, citoquininas.

ABSTRACT

In vitro cultivation of plants has been positioning like a helpful biotechnological tool in the solution of problems in the reproduction and development of plants, but its use is limited because of the high cost of the facilities, equipment and reagents needed to do planting in asepsis conditions and stimulating in an appropriated way the plants development with the use of the vegetal growth regulators. Like a strategy focused to increase the implementation of *in vitro* cultivation and put it accessible to farmers, so far limited to some scientific circles, sources of plant regulators naturally present in plants were used looking for easy removal and low economic cost, similar to the effect created synthetically. For their content of growth regulators namely species were selected *Aloe vera* (leaf gel extract), *Kalanchoe pinnata* (Leaf Extract), *Zea mays* (Excerpt from cotyledon, epicotyl and hypocotyl) and *Gerbera jamesonii* (Leaf extract) and hybrid *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* (endosperm). All extracts obtained were applied by dipping at 10 and 30 minutes to nodal segments of *Saintpaulia ionantha* (African violet) and MS medium at a concentration of 10% and 20%. This plant was used because of its micropropagation protocol is standardized in the Lab. The greatest effect of growth regulator like auxínico and cytokinin type were *Aloe vera* applied by dipping 10min and 30 min and *Zea mays* applied by dipping 10 min. *Kalanchoe pinnata* applied by dipping 30 min was the best as a cytokinin growth regulator and *Gerbera jamesonii* applied by dipping 10 min was the best as auxinic growth regulator.

Key words: *In vitro* cultivation, growth regulators, extracts of plants, auxinic, cytokinin

INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* vegetal comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca, 1991). Un aspecto importante en la manipulación que se realiza para inducir la formación de plántulas en un cultivo *in vitro*, es la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal, ya que de ellos dependerá la inducción morfogénica de los explantes y su posterior desarrollo hasta lograr la multiplicación de la especie en estudio. Hay una gran variedad de compuestos que actúan como reguladores de crecimiento, en su mayoría son sintéticos y de alto costo. La cantidad requerida de estos compuestos sintéticos necesarios en el desarrollo de un proyecto de investigación es mínima, pero no pueden ser comprados en pequeñas cantidades sino se debe adquirir el contenido total distribuido por empresas especializadas, en su mayoría importados, aumentando considerablemente su costo y afectando a personas que manejan pequeños proyectos en el área de cultivo *in vitro*. Los reguladores de crecimiento vegetal se sintetizan en la planta a partir de precursores presentes de forma natural, localizados sobre todo en semillas, ápices caulinares y radicales; por lo que se podría inducir la producción de reguladores utilizando los precursores o aplicando éstos a partir de extractos obtenidos directamente de plantas con altos contenidos hormonales. De esta forma se estaría colocando al alcance de los investigadores que tengan proyectos pequeños estos compuestos, haciendo más asequible la investigación en esta área de la biotecnología.

Por lo anterior se hace necesario buscar alternativas naturales, teniendo en cuenta que algunas plantas los producen en cantidades suficientes. En donde los reguladores de crecimiento producidos en una planta pueden actuar en igual forma sobre cualquier otra especie. Teniendo en cuenta que no toda la cantidad de reguladores de crecimiento de una planta está presente en forma activa sino solamente una pequeña cantidad, la parte libre; el resto queda fijo o aparece en forma de precursores (Müller, 1964). Es por esto que se deben seleccionar las plantas que presenten precursores

para inducir a partir de éstos, la producción de reguladores de crecimiento vegetal directamente en la planta con lo que se estaría reemplazando la aplicación exógena de estos compuestos.

Por tanto este trabajo busca demostrar el efecto de regulador de crecimiento tipo auxínico y citoquinínico de los extractos obtenidos de *Aloe vera* (Extracto de gel de hoja), *Kalanchoe pinnata* (Extracto de hoja), *Zea mays* (Extracto de cotiledón, epicótilo e hipocótilo), *Gerbera jamesonii* (Extracto de hoja) e Híbrido interespecífico *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* (Extracto de endospermo) aplicadas directamente al medio de cultivo y como suplemento aplicado al medio, mediante técnicas de cultivo aséptico de explantes de *Saintpaulia ionantha* (Violeta Africana), con miras a generar un efecto igual o similar al de un regulador comercial, permitiendo de esta forma reducir los costos de producción en el cultivo *in vitro*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los extractos de *Aloe vera*, *Kalanchoe pinnata*, *Zea mays*, *Gerbera jamesonii* y del Híbrido Interespecífico OxG (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) como alternativas naturales de reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico y citoquinínico en el cultivo in vitro de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Violeta africana)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la disolución óptima por extracto para lograr el efecto como regulador de crecimiento vegetal
- Determinar el efecto auxínico o citoquinínico de cada extracto
- Establecer la incidencia del método de aplicación del extracto en la efectividad como regulador de crecimiento

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Violeta africana)

2.1.1 Clasificación taxonómica de *Saintpaulia ionantha* Wendl. Familia: *Gesneriaceae*, Subfamilia: *Cyrtandroideae*, Tribu: *Didymocarpeae*, Género: *Saintpaulia* J.C. Wendl., Especie: *Saintpaulia ionantha* Wendl. Tomado de Darbyshire (2006).

2.1.2 Distribución y hábitat. El género *Saintpaulia* (*Gesneriaceae*, subfamilia *Cyrtandroideae*) es endémica de África del Este. Sin duda el género más conocido de los miles de taxones endémicos de las Montañas del Arco Oriental, y sus principales fortalezas son las montañas orientales Usambara y nuguru (Briggs, 2009). La taxonomía específica del género *Saintpaulia* es controversial debido a que fueron reconocidas más de 20 especies, pero un estudio del 2006, ha reducido el número a seis. *Saintpaulia ionantha* más conocida como violeta africana se describe así en honor de su descubridor, el Comisionado de Tanga, el Barón Walter von Saint Paul Illaire quien recolectó esta planta pequeña con flores por primera vez en el Oriente de Usambara en 1892. Especies de *Saintpaulia* fueron las primeras introducidas en el cultivo de Europa ese mismo año por el barón Walter von Saint Paul, y dentro de unos años se convirtió en una popular planta de interiores, y ahora son la base de una gran industria hortícola (Robey, 1988).

2.1.3 Descripción morfológica de la especie. Es una planta de tallo corto, las hojas son suculentas, redondeadas y muy pubescentes de color verde oscuro. De las axilas de las hojas crecen inflorescencias con numerosas flores de colores diversos, siendo en tonalidades de azul y violeta las más comunes, aunque también existen blancas y rosadas (Rojas-Rodríguez et al., 2006). La corola de color violeta y hojas cordadas se asemejan en cierta medida las verdaderas violetas y de ahí el nombre común "Violeta Africana".

En sección transversal del pecíolo está compuesto por células parenquimatosas a través del cual las huellas de las hojas se extienden en forma de una media luna con la punta dirigida hacia la superficie adaxial del pecíolo. Las células del xilema son de paredes gruesas muy abundantes y se encuentran siempre en el margen interior de la media luna y hacia el lado superior del pecíolo. El floema no está muy altamente diferenciado, compuesto por algunas células grandes parenquimatosas y otras células más pequeñas difíciles de identificar (Naylor & Johnson, 1937). Esta especie se reproduce vegetativamente por hojas. Se emplea como planta de interior en macetas.

2.2 CULTIVO *in vitro*

El cultivo *in vitro* vegetal consiste en un conjunto de técnicas que ponen al alcance muchas posibilidades y ventajas en la conservación y multiplicación de plantas de interés agrícola, forestal y/o ornamental. En este grupo de técnicas se incluye la metodología de micropropagación mediante el cual un explante se cultiva, bajo condiciones de asepsia, en medio enriquecido con componentes de composición química definida y se incuba bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski & Roca, 1991). Por otro lado el campo de aplicación de la propagación de plantas *in vitro* es bastante amplio ya que permite obtener desde estudios básicos de fisiología, genética y bioquímica, conservación de plantas hasta obtención de plantas libres de patógenos, de forma rápida y en mayor número. Una planta se puede propagar *in vitro* por medio de una parte extraída del vegetal como una célula, protoplasto, un tejido o un órgano.

2.2.1 Reguladores de crecimiento vegetal. Haberlandt, científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas (Castillo, 2004). Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la

década del '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales llamadas más precisamente Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos que regulan el desarrollo de la planta en sus distintos estados vegetativos, tales como enraizamiento, brotación, floración, fructificación y senescencia. Los RCV más ampliamente utilizados y reconocidos son auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Pero en las últimas décadas se han descubierto y aplicado nuevos reguladores como las poliaminas, brasinoesteroides y ácido salicílico entre otras. En las últimas décadas se han descubierto y aplicado nuevos reguladores como las poliaminas, brasinoesteroides y ácido salicílico entre otras, pero los RCV más ampliamente utilizados y reconocidos son auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

2.2.1.1 Auxinas. Las auxinas muestran un efecto promotor en la formación de raíces y en el crecimiento de frutos. La auxina se produce en las hojas jóvenes y según parece, las semillas en desarrollo son una fuente de auxina (Raven et al., 1992). Por su parte las auxinas sintéticas se han utilizado ampliamente para el control de las malas hierbas en suelos agrícolas, como el 2,4-D y sus derivados químicos, pero se sabe que el futuro uso de tales productos dependerá de varios factores, incluyendo su efectividad en relación al costo y su peligro real o potencial para la salud. En cuanto a la acción fisiológica de la auxina, ésta aumenta la plasticidad de la pared celular (Jordán & Casaretto, 2006).

2.2.1.2 Citoquininas. En la naturaleza existen varias sustancias con actividad citoquinínica que se producen naturalmente, pero tales sustancias están limitadas en su cantidad y son difíciles de obtener. Además de estas citoquininas naturales, diversos derivados sintéticos de adenina son conocidos como sustancias que tienen ésta actividad, pero su uso práctico está muy limitado en razón de su proceso de obtención ya que tienen escasa solubilidad en agua y la absorción es limitada por la insuficiente diseminación hasta los órganos de la planta.

La acción fisiológica de las citoquininas abarca procesos como el control del crecimiento por división celular en callos y órganos, la inducción a la formación de capullos y flores, la estimulación de la germinación de las semillas, la finalización de la fase de latencia en semillas, órganos de almacenamiento y yemas, el fomento de la formación de retoños y el retraso de los procesos de envejecimiento en plantas.

Cuando las concentraciones de las auxinas y las citoquininas se encuentran en niveles apropiados, controla la diferenciación celular y la masa de las células crece, conservando un cúmulo de células indiferenciadas llamado callo. Si se aumentan los niveles de citoquininas, las yemas del brote se desarrollan a partir del callo; si se aumenta la los niveles de auxina, se forman raíces (Campbell & Reece, 2007).

2.2.1.3 Giberelinas. Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicos. Se encuentran en las plantas en una gran cantidad, la mayoría son biológicamente inactivas (Taiz & Zeiger, 2006). Las GAs están involucradas en varios procesos del desarrollo de las plantas como la inducción del crecimiento en altura, desarrollo de inflorescencias y floración, desarrollo de frutos y germinación de semillas (Jordán & Casaretto, 2006).

2.2.1.4 Ácido abscísico. El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento el cual su producción está directamente relacionada al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas; ayudando a la planta a protegerse contra estos factores estimulando el cierre de los estomas o la producción de proteínas protectoras (Llorente, 2002). El ABA juega un papel importante en el desarrollo de la planta pues induce la síntesis de proteínas y lípidos de almacén en semillas, tolerancia de semillas a la sequía y la inhibición a la germinación y el crecimiento (Jordán & Casaretto, 2006). Este se obtiene de la base del ovario en frutos (Raven et al., 1992).

2.2.1.5 Etileno. Es la única hormona vegetal gaseosa, pequeña y simple que provoca respuestas en cantidades mínimas, transportándose rápidamente en los tejidos por difusión (Jordán & Casaretto, 2006). Entre sus efectos fisiológicos más importantes están la expansión celular, la epinastía, quiebre de la dominancia en semillas, inducción de floración, la maduración de frutos y la aceleración de la senescencia y caída de las hojas (Llorente, 2002).

2.3 ESPECIES CON POTENCIAL DE REGULADOR DE CRECIMIENTO VEGETAL

La estrategia para obtener un producto vegetal con propiedades de regulador de crecimiento para ser utilizado en la propagación *in vitro*, depende de lograr un sistema que permita la selección de material en campo con excelentes condiciones agronómicas y, posteriormente, desarrollar un protocolo de laboratorio para cada una de sus fases para que sean fácilmente reproducibles. En la práctica algunas plantas han sido utilizadas por el campesino para estimular el desarrollo de sus plantas (Chamorro et al., 2007).

Se ha demostrado que la aplicación de extractos provenientes de diferentes plantas como la *Aloe vera* (sábila) y *Zea mays* L. (Maíz) tienen efectos como reguladores de crecimiento sobre otras plantas en su desarrollo. En donde existen diversas formas de aplicar estos extractos, las principales son por inmersión y aspersion, aunque, como alternativa, también se puede aplicar al medio directamente.

2.3.1 *Aloe vera* (Sábila). Es una planta que pertenece a la familia de las liliáceas. Se parece a un pequeño maguey. Es perenne, de rizoma largo. Se propaga por división de las hojas. Y tiene un hábito de crecimiento herbáceo alcanzando su madurez en cuatro años cuando sus hojas son cosechadas (Rodríguez, 2004). El análisis fotoquímico de la sábila refleja que tienen aceites esenciales, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos, glucosa, proteínas y resinas (Aprocsal, 1994). De la sábila se emplean la raíz, el tallo y las hojas. El gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm., ha demostrado su eficacia en la

sustitución de reguladores sintéticos en medios de cultivos para el enraizamiento *in vitro* de plantas medicinales y frutales en condiciones de campo, por lo cual podría utilizarse para estos fines (Pérez-Álvarez et al., 2000).

2.3.2 Zea Mays (Maíz). Es una planta gramínea anual originaria de América. Existen diversas auxinas en plantas de maíz, tales como los Ácidos Indolacético, Ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético, Ácido Indolbutírico, Ácido Naftalenacético y 2,4, 5-Triclorofenoxiacético. De éstas, la principal es el Ácido Indolacético, el cual se encuentra presente en diversas partes de la planta entre las que se mencionan los granos. Así mismo, la Zeatina es también una Citoquinina aislada de granos de maíz. Otras hormonas reportadas en semillas de maíz en desarrollo, en reposo o en germinación han sido el Ácido Abscísico, las Giberelinas y las Citocininas (Bucio, 2002).

2.3.3 Híbrido *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* (Palma de Aceite). Comúnmente llamada palma de aceite, es una especie del género *Elaeis*. Es una planta perenne, alcanzando más de 100 años, pero bajo cultivo sólo llega hasta los 25 años, que es cuando alcanza los 12 m de altura. En estado natural llega a superar los 40 m. Este híbrido presenta hojas más largas que sus progenitores y guarda la disposición de los folíolos, altura y forma y color del fruto de *Elaeis oleífera* (Zambrano, 2004). Los frutos, drupa, se agrupan en una frutescencia, cubiertos con un tejido ceroso llamado exocarpio, una pulpa denominada mesocarpo y una estructura dura y redonda, en cuyo interior se aloja una almendra, denominada endocarpio, que es la que protege el embrión. Los frutos que produce *E. guineensis* son frutos normales, aunque a veces produce frutos blancos caracterizados por no contener ni aceite, ni almendra. En general este híbrido presenta características intermedias entre las dos especies (Bastidas et al., 2007). Konan et al. (2010) lograron conservar embriones somáticos de palma aceitera por al menos 20 años en medio desprovisto de reguladores de crecimiento; lo que sugiere que estos embriones pueden contener una alta cantidad de compuestos promotores de la síntesis de reguladores de crecimiento.

2.3.4 *Gerbera jamesonii* (Margarita africana). Es una planta ornamental de la familia de las *Asteraceae*. Las hojas tienen forma de roseta, son alargadas, de unos 40 cm, y ligeramente hendidas en los bordes; del pecíolo de algunas de ellas evolucionarán los brotes florales, que van a desarrollar unos vástagos o pedúnculos con una inflorescencia terminal en capítulo. Olivella et al. (2001), determinaron y encontraron altos niveles de Ácido abscísico ABA, Ácido indolacético AIA y Zeatina en hojas jóvenes y adultas, de plantas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus, que en hojas maduras.

2.3.5 *Kalanchoe pinnata* (Hoja del Aire). Es una planta popular de la familia *Crassulaceae*, utilizada en la medicina tradicional en muchas regiones cálidas del mundo, y particularmente en América del Sur. Esta es una planta suculenta que se distingue por la profusión de diminutas plántulas que se forman en los márgenes de sus hojas, por lo cual se cree que puedan tener algún efecto de regulador de crecimiento, este rasgo es común entre los miembros de la sección *Bryophyllum* del género *Kalanchoe*. El jugo de sus hojas, al igual que el gel de *Aloe vera*, tiene diversos usos medicinales como antiinflamatorio, antidiabética y antitumoral. Investigaciones fitoquímicas previas de *Kalanchoe pinnata* llevaron al aislamiento de seis compuestos: glut-5(6)-en 3-1, taraxerone, 3 β -friedelanol, β -amyrin-3-acetate, 3, 5, 7, 3', 5' – pentahydroxyflavone y β -sitosterol (Sharker et al., 2012). Se cree que la presencia de estos polifenoles en el extracto de *Kalanchoe pinnata* pueden tener un efecto como brasinoesteroides, ya que estos son polihidroxifenoles. Éstos generan algunos estímulos fisiológicos como la elongación y división celular en segmentos de tallos que promueven el crecimiento, estimulan el gravitropismo y aumentan la resistencia al estrés.

2.4 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Conscientes del impacto que ha tenido el cultivo *in vitro* a nivel mundial, muchos investigadores están realizando estudios que conlleven a facilitar el manejo de esta serie de métodos y técnicas que requiere en este tipo de cultivo, no solo para

ajustarlas, sino para ofrecer alternativas en sus diferentes aplicaciones prácticas como la propagación vegetativa, la producción de plantas libres de virus y patógenos, germinación de semillas en menor tiempo, aplicación de mejoras genéticas entre otros. Su beneficio no se limita solo al conocimiento científico en el área biotecnológica, sino que tiene un gran impacto a nivel comercial, industrial y medicinal.

Como sabemos el cultivo *in vitro* es muy costoso, debido al equipo necesario para realizarlo y el valor de los reactivos y nutrientes para preparar el medio de cultivo en el cual se cultivará un explante asépticamente, el cual debe tener una composición químicamente definida (Roca, 1991). Entre estos compuestos, que varían dependiendo del medio que se quiere preparar, están las fuentes de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, un agente gelificante, reguladores de crecimiento y otros componentes. Los reguladores de crecimiento son los componentes más importantes a la hora de obtener la respuesta que se desea de un explante, pero estos reguladores por lo general tienen una limitante en su uso y es porque son muy costosos debido a que son productos de importación lo cual eleva el valor del producto.

Una parte importante dentro del estudio del cultivo *in vitro*, se encuentra en el ajuste y estandarización de los diversos tipos de medios de cultivo para diferentes especies que se quieren micropropagar. Investigadores como J^o García et al. (2005) sugieren que esto se hace por medio del entendimiento de los requerimientos nutricionales en el cultivo de células y tejidos. También aseguran que se puede utilizar un medio sencillo y luego suplementarlo con diferentes nutrientes, para finalmente conseguir la fórmula que le brinde, a la planta cultivada *in vitro*, la mejor expresión de su capacidad totipotente. Para lo cual las formas como se puede suplir los medios de cultivo es agregando sustancias promotoras del crecimiento, algunas de composición completamente indefinida como: agua de coco, jugos de frutas y hortalizas (plátano y tomate), extractos de levaduras, malta y tubérculos de papa, endospermo líquido de *Zea mays* y Caseína hidrolizada.

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuente de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Por su parte, el gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm., ha demostrado su eficacia en la sustitución de reguladores sintéticos en medios de cultivos para el enraizamiento *in vitro* de plantas medicinales y frutales en condiciones de campo, también, potencialmente por sus características, podría ser utilizado para estos fines. (Rodríguez & Hechevarría, 2006).

Jó García et al. (2005) señalan que se encontraron respuestas fisiológicas en la fase de enraizamiento en la micropropagación del plátano FIAH 18 en la Biofábrica de Pinar del Río, Cuba utilizando diferentes concentraciones de MS adicionando 20 y 40 mL/L del extracto de *Aloe vera*.

Así mismo en un estudio realizado por Rodríguez & Hechevarría (2004) basado en 10 tratamientos que correspondieron a extractos de plantas medicinales tales como *Salixhumboldtiana*, *Calendulaofficinalis*, *Ocimumbasilicum*, *Plecthranthusamboinicus*, *Plantagolanceolata*, *Plantagomajor*, *Matricaria recutita* y Corteza y raíces de *Aloe vera* y un tratamiento control con los reguladores de crecimiento tradicionales, para la brotación y enraizamiento, acorde a los requerimientos de cada especie. Se encontraron efectos estimulantes del crecimiento en los extractos estudiados, específicamente al gel de *A. vera* tuvo el mejor comportamiento, superior a los reguladores usados tradicionalmente, en la formación de raíces demostrando la presencia de actividad auxínica en el mismo. Rodríguez & Hechevarría (2004) sugieren que esto podría deberse a que las plantas liberan al medio una cantidad apreciable de compuestos biológicamente activos y algunos de ellos actúan como inhibidores o estimuladores de la germinación de las semillas y afectan o benefician el crecimiento de las plantas. Estas sustancias se denominan alelopáticas y su acción se conoce como alelopatía o efectos alelopáticos.

Por otro lado Olivella et al. (2001) reportan la presencia de hormonas vegetales en hojas jóvenes de *Gerbera jamesonii* cv Bolus proponiendo dos métodos para la medida

simultanea de compuestos tales como ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (AIA) por un lado, y de zeatina con ribósido de zeatina (Z+ZR) por otro. No encontraron diferencias significativas en los niveles de ABA y de AIA en hojas de diferente edad pero si encontraron diferencias significativas en los niveles de Z + ZR entre hojas jóvenes (7 días) por un lado, y hojas adultas (20 días) y maduras (60 días) por el otro; siendo las hojas jóvenes quienes presentaron una mayor cantidad de estos compuestos. Estas variaciones pueden ser debidas a una alta absorción endógena a través del flujo xilemático, o a una mayor capacidad biosintética de las hojas jóvenes (Kotov & Kotova, 2000).

También se ha encontrado a lo largo de diversos estudios sobre el maíz la presencia de hormonas vegetales en sus granos de tipo auxínico como citoquinínico citados por Bucio (2002), en su tesis doctoral sobre el efecto de los reguladores del crecimiento y otros compuestos del maíz sobre el crecimiento, la diferenciación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus*, buscando que con el uso de compuestos presentes en el maíz se pueda controlar especies toxigénicas de *Aspergillus*, mostrando algún efecto inhibitorio en su crecimiento, esporulación o síntesis de aflotoxinas. En relación la presencia de compuestos del maíz que juegan un papel importante como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico y citoquinínico se menciona claramente que:

Las hormonas en las plantas son compuestos orgánicos distribuidos en todas sus partes y que influyen sobre los procesos fisiológicos a bajas concentraciones (Davies, 1995). Al igual que en otros vegetales, existen diversas auxinas en plantas de maíz, tales como los Ácidos Indolacético, 2, 4-Diclorofenoxiacético, Indolbutírico, Naftalenacético y 2, 4, 5-Triclorofenoxiacético (Felle et al., 1991; Wright et al., 1991). De éstas, la principal es el Ácido Indolacético (Bandurski et al, 1995), el cual se ha encontrado presente en diversas partes de la planta entre las que se mencionan los granos (Haagen-Smit et al., 1942). Así mismo la Zeatina es también una Citocinina aislada de granos de maíz (Letham, 1963; Letham & Miller, 1965). Otras hormonas reportadas en semillas de maiz

en desarrollo, en reposo o en germinación han sido el Ácido Abscísico, las Giberelinas y las Citoquininas (Davies, 1995; Fong et al., 1983; Wright et al., 1991).” (Como puede leerse en Bucio, 2002, p. 7)

Por último y basados en el estudio realizado por Rodríguez & Hechevarría (2006) podemos ver cómo, no solo se buscan alternativas a reguladores de crecimiento sintéticos, sino que también se buscan alternativas para reemplazar varios de los componentes del medio de cultivo, en este caso otra alternativa al agente gelificante del medio de cultivo utilizando harina de sagú y *Aloe vera*.

Obteniendo resultados que demuestran que es posible la sustitución total o parcial del agar empleado tradicionalmente, por gel de *A. vera* y/o harina de sagú (*Maranta arundinacea* L.). La harina de sagú es obtenida del rizoma de esta especie y puede ser incluida como posible soporte sólido por el alto contenido de almidón (27,07 %) que posee, una condición que favorece la solidificación del medio. Se destaca que los medios en el que se sustituyó parcial o totalmente el agar por gel de Aloe y/o harina de sagú, no presentaron limitaciones por afectaciones producidas por contaminación, transparencia y solidificación, tampoco se observaron problemas con la desnaturalización al producirse su obligada esterilización. Este estudio coincide con el resultado alcanzado por Fuentes et al. (1991), quienes sustituyeron parcialmente el agar por polvo de rizoma de sagú en cultivo *in vitro* de *Orthosiphonstamineus* Blume (té de riñón) con buenos resultados.

De esta forma se puede contar con alternativas sostenibles al agente gelificante, que no afecten las condiciones apropiadas del medio de cultivo para el óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, se tendría un alto beneficio económico, pues el agar requiere ser importado y tiene un alto precio en el mercado mundial.

3. METODOLOGÍA

En el Laboratorio de Protección de Plantas del grupo de investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana de la Universidad del Tolima –GEBIUT, ubicado en la Universidad del Tolima en Ibagué, Colombia, se realizó la investigación de Extractos vegetales aplicados a *Saintpaulia ionantha* (Violeta africana), seleccionada como modelo experimental debido a que se ha mantenido su cultivo en el laboratorio y se tiene toda la información de su fisiología y desarrollo en cultivo *in vitro* y los protocolos de establecimiento y multiplicación de esta especie, así como el Banco de Germoplasma disponible para los ensayos.

Los segmentos nodales de esta planta fueron sometidos a la exposición de extractos vegetales, por medio de inmersión del explante en el extracto pre siembra en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) desprovisto de reguladores de crecimiento y por adición del extracto al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) directamente. Los extractos se tomaron de especies reportadas por sus contenidos de reguladores de crecimiento, así: *Aloe vera* (Extracto de gel de hoja), *Kalanchoe pinnata* (Extracto de hoja), *Zea mays* (Extracto de cotiledón, epicótilo e hipocotilo), Híbrido *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* (Extracto de endospermo) y *Gerbera jamesonii* (Extracto de hoja).

Se evaluaron un total de 24 tratamientos, incluyendo los tratamientos control de ANA (regulador de tipo auxínico) y BAP (regulador de tipo citoquinínico) como se ve en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Extracto	Forma de Aplicación	Nivel
T1	<i>Aloe vera</i>	Inmersión	10 min
T2	<i>Aloe vera</i>	Inmersión	30 min
T3	<i>Aloe vera</i>	Al medio	10% p/v
T4	<i>Aloe vera</i>	Al medio	20% p/v
T5	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Inmersión	10 min

Tratamiento	Extracto	Forma de Aplicación	Nivel
T6	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Inmersión	30 min
T7	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Al medio	10% p/v
T8	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Al medio	20% p/v
T9	<i>Gerbera jamesonii</i>	Inmersión	10 min
T10	<i>Gerbera jamesonii</i>	Inmersión	30 min
T11	<i>Gerbera jamesonii</i>	Al medio	10% p/v
T12	<i>Gerbera jamesonii</i>	Al medio	20% p/v
T13	<i>Elaeis guineensis</i>	Inmersión	10 min
T14	<i>Elaeis guineensis</i>	Inmersión	30 min
T15	<i>Elaeis guineensis</i>	Al medio	10% p/v
T16	<i>Elaeis guineensis</i>	Al medio	20% p/v
T17	<i>Zea mays</i>	Inmersión	10 min
T18	<i>Zea mays</i>	Inmersión	30 min
T19	<i>Zea mays</i>	Al medio	10% p/v
T20	<i>Zea mays</i>	Al medio	20% p/v
T21 CONTROL	ANA	Al medio	1 mg/ L -1
T22 CONTROL	ANA	Al medio	2 mg/ L -1
T23 CONTROL	BAP	Al medio	1 mg/ L -1
T24 CONTROL	BAP	Al medio	2 mg/ L -1

Para los tratamientos del extracto con aplicación al medio se realizaron soluciones porcentuales. Para el caso de extracto concentrado al 10% se tomaron 10 g o mL del extracto y se aforó a 100 mL y para extracto concentrado al 20% se tomaron 20 g o mL del extracto y se aforó a 200 mL. Cada una de estas soluciones se aplicó como una sal más en la preparación de medio Murashige y Skoog (MS), con 3 % (p/v) de sacarosa, con pH de 5.8. Para los tratamientos de inmersión del explante en el extracto, éste se preparó en una concentración del 10%. Para todos los casos, tanto los extractos para realizar la inmersión, como los medios con extracto, se sometieron a esterilización, en autoclave a una atmósfera y 120°C durante 15 min. Es necesario aclarar que el mismo día que se realizaban los extractos, se preparaba el medio de cultivo con el extracto y se esterilizaba junto con los extractos para inmersión de los explantes. Estos se

conservaban bajo condiciones controladas a una T de 24°C (± 2) y humedad relativa del 80% hasta su uso. Posteriormente en cabina de flujo laminar se realizó la siembra de los segmentos nodales de *Violeta africana* (*Saintpaulia ionantha*) de 0,7 cm a 1 cm de longitud, uno por frasco de cultivo, con cinco unidades experimentales por tratamiento y tres réplicas.

La preparación de los extractos se basó en un macerado para los tratamientos de *Aloe vera* donde se utilizó el gel de hoja, del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis*, del cual se utilizó el endospermo y de *Zea mays*, el cotiledón, epicótilo e hipocótilo. En otros casos como en los tratamientos de *Kalanchoe pinnata* y *Gerbera jamesonii* se realizó una infusión de las hojas jóvenes.

3.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DEL GEL DE *Aloe vera* “SÁBILA”

Para la obtención del extracto de *Aloe vera* se procedió con base en el método empleado por Alvarez (1996), para lo cual se colectaron hojas de plantas de 1 a 2 años de edad. Su desinfección consistió en un lavado a chorro durante 5 minutos por cada hoja, limpieza de toda la superficie con una solución de NaClO al 1% y por último un enjuague con agua destilada. Después se eliminan el ápice, los márgenes y la epidermis o parte exterior utilizando solo el tejido esponjoso donde se encuentra el gel. Este gel fue cortado en pequeñas porciones, macerado y llevado a una centrifuga a 10 000 rpm, durante 30 minutos, eliminándose los restos insolubles y finalmente obteniendo el sobrenadante el cual corresponde al extracto acuoso del gel de *Aloe vera* “sábila”; pasado este tiempo fueron esterilizados y conservados a 4°C hasta su uso.

3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE *Kalanchoe pinnata* Y *Gerbera jamesonii*

El protocolo de desinfección seguido para la obtención de extractos de hojas consistió en: tomaron las hojas jóvenes de la planta (Figura 1.), se realizó un lavado a chorro durante 10 minutos, seguido de un lavado con tween 80 y 3 enjuagues con agua

destilada y por último limpieza de la superficie de las hojas con una solución de NaClO al 1%, como se ve en la Figura 2. Se secan con toallas de papel estéril. Se pesan las hojas en cantidades de 10 g y 20 g para realizar la respectiva solución. Luego se colocan en infusión durante 30 minutos 10 g de hojas en 100 mL de agua destilada hervida para el caso del extracto al 10% y los 20 g de hojas en los 200 mL agua destilada hervida para el caso del extracto al 20; pasado este tiempo fueron filtrados, esterilizados y conservados a 4°C hasta su uso.

Figura 1. Planta de *Gerbera jamesonii* (izquierda) y *Kalanchoe pinnata* (derecha)



Fuente: Autor

Figura 2. Limpieza de hojas jóvenes de *Gerbera jamesonii*

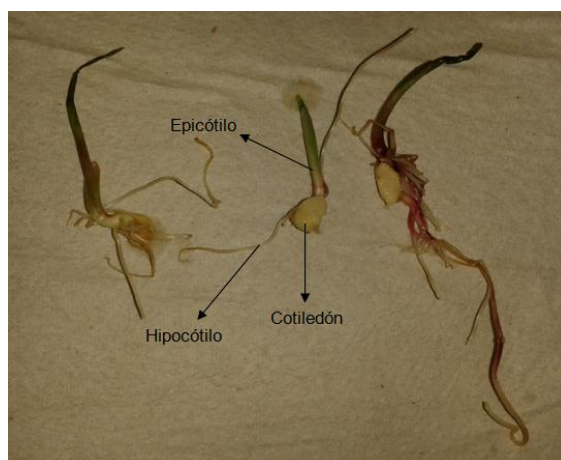


Fuente: Autor

3.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ENDOSPERMO DE *Zea mays* L. “Maíz”

Los granos de maíz se ponen a germinar en una cama húmeda previsto de luz solar con previa desinfección con etanol al 70% por un minuto y tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas germinadas con una altura de 5 cm aproximadamente se lavan con agua destilada, luego un enjuague con tween 80 durante 5 minutos, después 3 enjuagues con agua destilada, un lavado con alcohol al 70%, durante 5 minutos seguido de 3 enjuagues con agua destilada y por último lavado con NaClO al 3%. Se extrae el cotiledón, epicótilo e hipocótilo como se ve en la figura 3., estos se maceran en agua destilada en una proporción de 10 g por 100 mL de agua para el caso del extracto al 10% y 20 g por 200 mL de agua para el caso del 20%, posteriormente se filtran los extractos con papel filtro cualitativo, se esterilizan y se conservan a 4°C hasta su uso.

Figura 3. Cotiledón, epicótilo e hipocótilo extraídas de semillas de *Zea mays*



Fuente: Autor

3.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ENDOSPERMO DE HÍBRIDO *E. oleífera* x *E. guineensis* “PALMA DE ACEITE”

En condiciones de asepsia en el laboratorio, son despulpados los frutos del híbrido interespecífico OxG *Elaeis Oleífera* (NOLI o Palma americana) X *Elaeis guineensis*

(Palma Africana), retirándose todo el mesocarpo hasta obtener la semilla dentro del cuesco o endocarpo, ésta se somete a desinfección que consiste en el lavado con Tween 80, posteriormente se realizarán tres enjuagues con agua destilada estéril, desinfección con etanol al 70% por cinco minutos, tres enjuagues con agua destilada estéril, después una inmersión en Hipoclorito de sodio al 5.25% durante 10 minutos, finalmente se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril y se conservan a 4°C hasta su uso

Para realizar el extracto se sacan las almendras rompiendo el cuesco (Figura 4.). Éstas se desinfectan con un enjuague de agua destilada, enjuague con tween 80 por 5 minutos, luego 3 enjuagues con agua destilada, un lavado con alcohol al 70% por 10 minutos seguido de 3 enjuagues con agua destilada y por último un lavado con NaClO al 2% durante 5 minutos y tres enjuagues de agua destilada. Las almendras se maceran en agua destilada estéril en una proporción de 10 g por 100 mL y 20 g por 200 mL (Figura 5). En este extracto no se realizó filtración, se dejaron los residuos con intención de conocer si se generaba una mejor respuesta de este como regulador de crecimiento ya que podría ser un aporte nutricional extra al medio.

Figura 4. Almendras o endospermo extraído del cuesco o endocarpio del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis*.



Fuente: Autor

Figura 5. Macerado de las almendras del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis*



Fuente: Autor

3.5 VARIABLES EVALUADAS

De acuerdo a los objetivos del estudio las variables tenidas en cuenta para el efecto como regulador de tipo auxínico son: número de raíces, altura del explante, producción de callo. Para el efecto de regulador tipo citoquinínico son: número de hojas y número de brotes.

Las evaluaciones se realizaron a los 20, 30 y 60 días a partir de las fechas de siembra en el medio de cultivo y período de desarrollo óptimo en la especie estudiada *Saintpaulia ionantha* (Violeta Africana).

El tiempo de estas evaluaciones se tomó con base en estudios realizados como el de Rodríguez & Hechevarría (2004) donde se evaluaron las variables a los 25 a 30 días después de la siembra en el medio de cultivo.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el cálculo de medias descriptivas (porcentajes, media y error estándar). Se realizaron análisis de varianza Kruskal-wallis (Versión No paramétrica del ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal. Las diferencias entre las medias de cada tratamiento fueron evaluadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey con un nivel de significancia de $p < 0.05$. El paquete estadístico que se utilizó fue InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

El diseño del trabajo experimental fue un diseño completamente al azar, el modelo estadístico asociado al diseño es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, 3, \dots, t \\ j = 1, 2, 3, \dots, n \end{array}$$

Donde:

Y_{ij} : Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOQUINÍNICO

Al realizar el análisis de varianza Kruskal-wallis (Versión no paramétrica del ANOVA), para evaluar el efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo citoquinínico, se encontró diferencias significativas entre los tratamientos para las variables número de brotes y número de hojas.

El gel de *Aloe vera* presenta un marcado efecto alelopático y es reconocido por su acción estimulante en la mayoría de las especies e índices evaluados como lo reporta Rodríguez & Hechevarría (2002). Esto refleja el resultado obtenido en los tratamientos de *Aloe vera* ya que mostraron la mejor respuesta tanto citoquinínica como auxínica en todas las variables evaluadas. Los tratamientos T1 y T2 (donde se aplicó el extracto por inmersión de 10 min y 30 min al explante pre siembra en medio MS) generaron un número de hojas y número de brotes mayor con relación a los demás tratamientos; por otro lado, presentando el menor número de hojas y brotes estuvieron los tratamientos T15 (aplicación del extracto del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis* al medio al 10%) y T19 (aplicación del extracto de *Zea mays* al medio al 10%).

Los tratamientos que generaron un mayor número de brotes fueron T1 y T2 (Figura 7). El tratamiento T1 obtuvo una media de 3,73 a los 20 días, 6,53 a los 30 días y 11,73 a los 60 días, se generaron de 4-12 brotes por explante en un periodo de tiempo de 60 días. El tratamiento T2 obtuvo una media de 4,73 a los 20 días, 6,13 a los 30 días y 11,40 a los 60 días, con 4-11 brotes por explante en un periodo de 60 días. De acuerdo a lo anterior el T1 mostró un progreso ligeramente mayor a través del tiempo que el T2. En ambos tratamientos, T1 y T2, el vigor de los brotes se mantuvo constante y sus medias estuvieron muy cerca de las obtenidas por los tratamientos control T23 y T24, los brotes se caracterizaron por presentar hojas grandes y brillantes con tallos firmes y vigorosos, a diferencia de los demás tratamientos, como se aprecia en la figura 6.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo citoquinínico para la variable número de brotes a los 20, 30 y 60 días de cultivo *in vitro*.

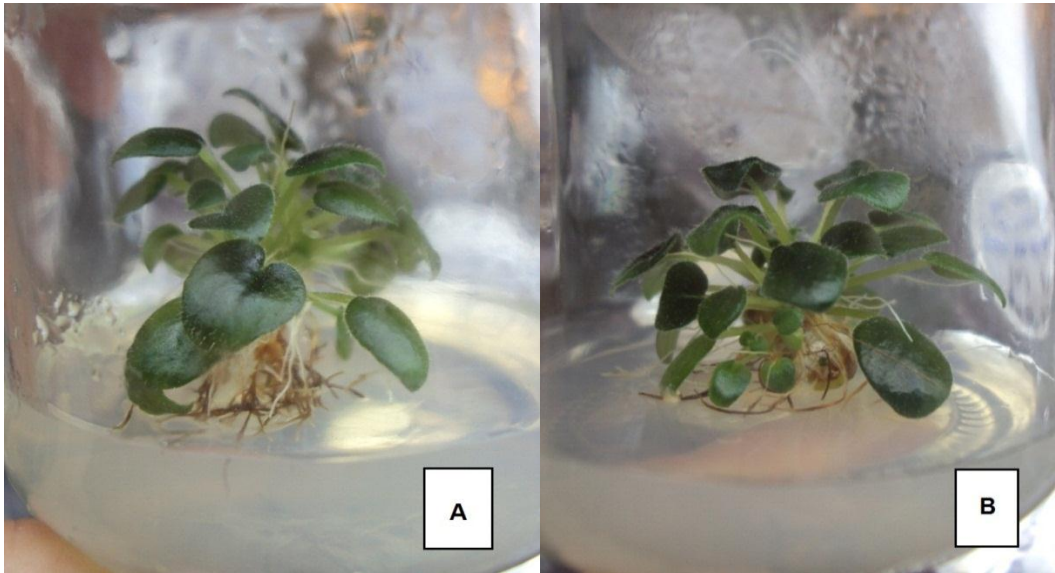
Tratamiento	N° de brotes 20 días (X±ES)	N° de brotes 30 días (X±ES)	N° de brotes 60 días (X±ES)
T1	3,73±1,44d,e,f	6,53±2,50d,e,f	11,73±7,08e,f
T2	4,73±3,06e,f	6,13±1,68e,f	11,40±4,39 f
T3	2,73±1,49b,c,d,e	5,07±2,02a,b,c,d,e,f	6,20±2,46a,b
T4	4,07±2,31d,e,f	6,80±2,34 f	8,33±5,60b,c,d,e
T5	3,27±1,62d,e,f	4,18±2,09a,b,c,d	4,73±2,49a,b
T6	4,80±2,54 f	6,93±2,89e,f	9,40±4,36c,d,e,f
T7	2,47±1,06b,c,d	3,33±1,40 a	4,33±2,13 a
T8	3,00±1,46c,d,e,f	4,47±2,29a,b,c	6,60±3,72a,b
T9	2,47±2,10a,b,c,d	5,73±3,01c,d,e,f	9,00±2,42d,e,f
T10	1,47±1,41a,b	3,53±3,36 a	6,40±4,26a,b,c
T13	2,07±1,71a,b,c	4,07±1,75a,b,c	6,13±3,31a,b
T14	2,73±1,10b,c,d,e,f	5,45±1,37c,d,e,f	7,36±1,80b,c,d,e
T15	1,13±1,19 a	3,27±1,67 a	4,60±1,64 a
T16	1,71±0,91a,b	4,64±1,08a,b,c,d,e	6,43±2,65a,b
T17	3,38±1,77c,d,e,f	5,00±2,51a,b,c,d,e,f	12,13±3,56 f
T18	2,56±1,67a,b,c,d	3,22±2,39 a	8,00±4,92b,c,d,e,f
T19	2,29±0,76a,b,c,d	3,14±1,57 a	4,14±1,07 a
T21 CONTROL	2,67±1,72b,c,d	3,60±2,20a,b	6,73±3,03b,c,d
T22 CONTROL	2,87±1,92b,c,d	4,07±2,99a,b,c	7,60±3,87b,c,d,e
T23 CONTROL	3,87±2,83c,d,e,f	6,13±4,17b,c,d,e,f	13,93±9,26d,e,f
T24 CONTROL	3,00±2,30b,c,d,e	3,40±2,82 a	13,33±8,28e,f
Kruskal-wallis (versión no paramétrica del ANOVA)	0,000*	0,000*	0,000*

Valor de $p < 0.05$ indica que hubo diferencias significativas entre los grupos comparados

Valores de la media seguidos por letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tuckey.

*Significancia a 0.05

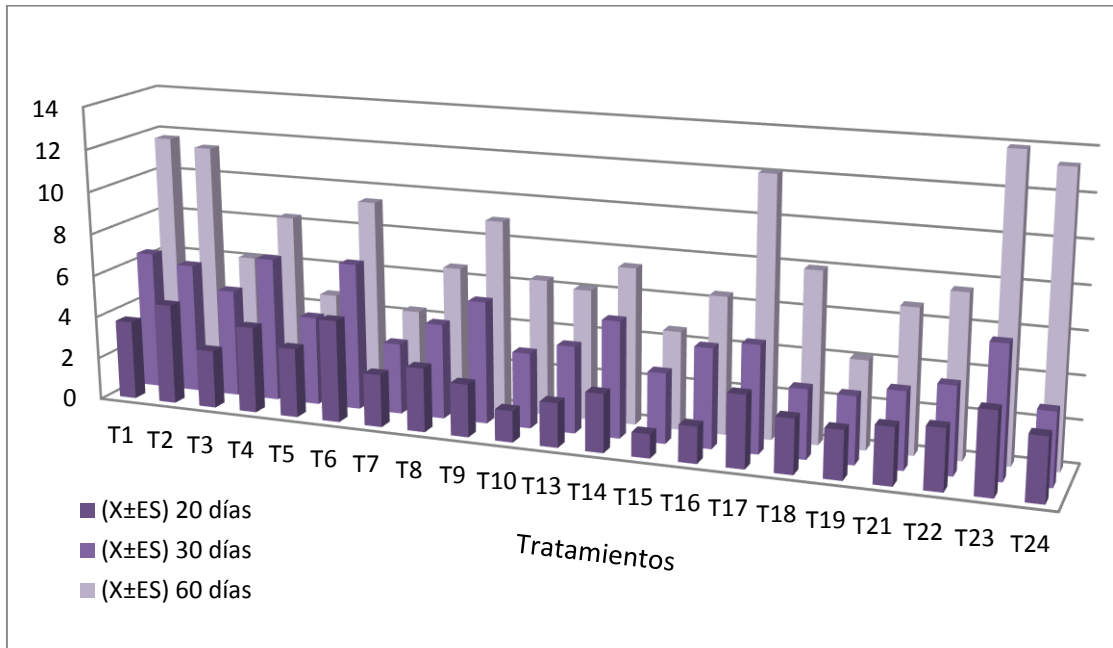
Figura 6. Respuesta generada en tratamiento T1 y T2 del extracto de Aloe vera.



Fuente: Autor

A)T1: Extracto del gel de *Aloe vera* aplicado por inmersión del explante en el extracto presiembra durante 10 minutos. B)T2: Extracto del gel de *Aloe vera* aplicado por inmersión del explante en el extracto presiembra durante 30 minutos.

Figura 7. Número de brotes por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 2.



Fuente: Autor

Los tratamientos que generaron mayor número de hojas fueron T1, T2, T6 Y T17 (Figura 8.). El T1 obtuvo una media de 4,80 a los 20 días, 8,27 a los 30 días y 12,80 a los 60 días, generando 5-13 hojas por explante en un periodo de tiempo de 60 días. El T2 obtuvo una media de 6,00 a los 20 días, 7,13 a los 30 días y 12,47 a los 60 días, con 5-12 hojas por explante en un periodo de tiempo de 60 días. Al igual que en la variable número de brotes, el T1 mostró un progreso ligeramente mayor y constante a través del tiempo en la generación de hojas que el T2. Ambos tratamientos T1 y T2, mostraron un mayor número de hojas respecto a los demás tratamientos, seguido por los tratamientos T6 y T17, pero para esta variable los tratamientos control T23 y T24, presentan un número de hojas superior a los demás tratamientos.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo citoquinínico para la variable número de hojas a los 20, 30 y 60 días de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	N° de hojas 20 días (X±ES)	N° de hojas 30 días (X±ES)	N° de hojas 60 días (X±ES)
T1	4,80±1,52 f	8,27±3,51 d,e	12,80±7,94 e,f,g
T2	6,00±3,82 f	7,13±1,77 c,d,e	12,47±4,37 f,g
T3	3,07±1,67 a,b,c,d,e	6,60±2,16 b,c,d,e	8,67±5,85 a,b,c,d
T4	4,53±2,29 d,e,f	9,93±4,08 e	10,67±3,54 d,e,f,g
T5	3,55±1,86 c,d,e,f	6,09±3,45 a,b,c,d	6,18±3,52 a,b
T6	5,47±3,14 e,f	9,67±4,97 d,e	11,87±6,69 c,d,e,f,g
T7	2,87±1,19 a,b,c,d	4,27±2,22 a	6,20±3,47 a
T8	3,40±1,68 b,c,d,e	6,07±4,06 a,b,c	8,73±4,38 a,b,c,d,e
T9	2,93±2,34 a,b,c,d,e	6,27±3,03 b,c,d	10,20±2,70 d,e,f,g
T10	2,00±1,89 a,b	4,67±4,73 a	7,47±5,26 a,b,c
T13	3,13±2,42 a,b,c,d,e	4,93±1,87 a,b	8,07±3,86 a,b,c,d,e
T14	3,64±1,21 c,d,e,f	5,64±1,57 a,b,c,d	8,00±1,84 a,b,c,d,e
T15	1,73±1,58 a	3,53±1,64 a	5,87±1,96 a
T16	2,29±1,38 a,b,c	5,21±1,05 a,b,c	7,57±3,23 a,b,c
T17	4,25±2,49 d,e,f	6,25±3,54 a,b,c,d	13,63±4,00 f,g
T18	2,89±1,76 a,b,c,d	3,89±2,80 a	9,67±4,39 b,c,d,e,f,g

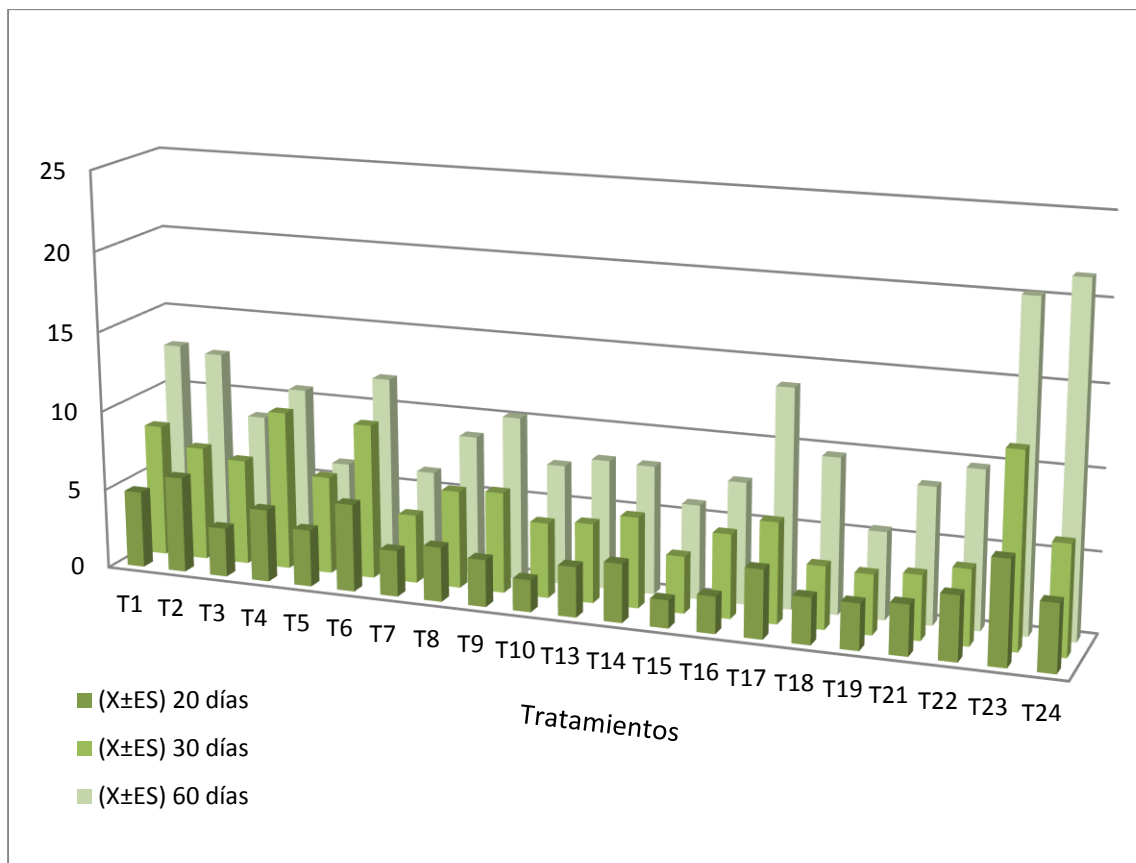
T19	2,86±1,07 a,b,c,d,e	3,71±1,25 a	5,43±1,13 a
T21 CONTROL	3,13±2,13 a,b,c,d,e	4,00±2,20 a	8,47±3,80 a,b,c,d,e
T22 CONTROL	4,00±2,36 d,e,f	4,67±3,27 a,b	9,80±4,90 b,c,d,e,f
T23 CONTROL	6,47±5,26 e,f	12,00±9,47 c,d,e	20,20±13,52 f,g
T24 CONTROL	4,20±3,38 c,d,e,f	6,80±6,11 a,b,c,d	21,47±11,81 g
Kruskal-wallis (versión no paramétrica del ANOVA)	0,000*	0,000*	0,000*

Valor de $p < 0.05$ indica que hubo diferencias significativas entre los grupos comparados

Valores de la media seguidos por letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tuckey.

*Significancia a 0.05

Figura 8. Número de hojas por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 3.



Fuente: Autor

Figura 9. Respuesta generada por T6, extracto *Kalanchoe pinnata*



Fuente: Autor

Por otro lado, el tratamiento T6 correspondiente al extracto de *Kalanchoe pinnata* aplicado por inmersión al explante por 30 min pre siembra, presentó un promedio alto cercano a los promedios de las variables números de hojas y brotes de los tratamientos de *Aloe vera* T1 y T2 a través del tiempo. De acuerdo al número de hojas, a los 20 días se obtuvo una media de 5,47, a los 30 días de 9,67 y a los 60 días de 11,87 generando 5-12 hojas por explante en un periodo de tiempo de 60 días tal como en los T1 y T2. En cuanto al número de brotes, el T6 obtuvo una media de 4,80 a los 20 días, 6,80 a los 30 días y 9,40 a los 60 días, generando 5- 9 brotes por explante en un periodo de tiempo de 60 días (Figura 7.). Se cree que la presencia de polifenoles en el extracto de *Kalanchoe pinnata* (Sharker et al., 2012), pueden tener un efecto como brasinoesteroides, ya que estos son polihidroxifenoles. Éstos generan algunos estímulos fisiológicos como la elongación y división celular en segmentos de tallos que promueven el crecimiento, estimulan el gravitropismo y aumentan la resistencia al estrés. De esta forma la respuesta del *Kalanchoe pinnata* como regulador de crecimiento de tipo citoquinínico, podría deberse principalmente a este tipo de compuestos presentes en sus hojas.

El tratamiento T17, que corresponde al extracto de *Zea mays* también mostró diferencias significativas respecto a las demás medias de los otros tratamientos con respecto a las variables número de hojas y número de brotes. Este tratamiento obtuvo una media de 4,25 a los 20 días, 6,25 a los 30 días y 13,63 a los 60 días es decir, de 4-14 hojas por explante, en un periodo de tiempo de 60 días (Figura 8.). Estas medias muestran un aumento progresivo en el desarrollo y producción hojas así como en el número de brotes puesto que a los 20 días presentó una media de 3,38, a los 30 días de 5,00 y a los 60 días 12,13, generando de 3-12 brotes por explante en un periodo de tiempo de 60 días y siendo éstos de buen vigor para todos los tiempos. Estos resultados como regulador de crecimiento de tipo citoquinínico son atribuidos principalmente a la citoquinina, Zeatina que es también un aislado de semillas de maíz en desarrollo, en reposo o en germinación como lo reporta Bucio (2002).

Figura 10. Respuesta generada por T17 del extracto *Zea mays*



Fuente: Autor

4.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO AUXÍNICO

Al realizar el análisis de varianza Kruskal-wallis (Versión No paramétrica del Anova), para evaluar el efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico, se encontró diferencias significativas entre los tratamientos para las variables número de raíces y altura. Por otro lado se realizó la prueba de chi-Cuadrado para evaluar las diferencias de producción de callo.

La mayor producción de raíces estuvo representada por los tratamientos T1 *Aloe vera* 10 min, T2 *Aloe vera* 30 min, T9 *Gerbera jamesonii* 10 min y T17 *Zea mays* 10 min (Figura 11). El tratamiento T1, presentó una media de 1,40 a los 20 días, 5,07 a los 30 días y de 7,20 a los 60 días, generando de 1- 7 raíces por explante y mostrando un aumento progresivo a través del tiempo. Un comportamiento muy parecido mostró el T2 ya que se obtuvieron unas medias de 2,20 a los 20 días, 4,93 a los 30 días y 7,33 a los 60 días, generando de 2- 7 raíces por explante. Los tratamientos de *Aloe vera* T1 y T2 no mostraron diferencias significativas entre ellos en la generación de raíces, esto demuestra que el extracto de *Aloe vera* sigue teniendo una acción estimulante no solo citoquinínico sino también auxínico.

El tratamiento 17 correspondiente al extracto *Zea Mays* aplicado por inmersión al explante durante 10 min presentó una diferencia significativa con respecto a las medias de los otros tratamientos en las variables número de raíces y altura. De acuerdo al número de raíces, obtuvo una media de 0,75 a los 20 días, 2,38 a los 30 días y 5,27 a los 60 días generando en promedio de 1- 5 raíces por explante en un periodo de tiempo de 60 días (Figura 11). Esta respuesta podría explicarse debido a la presencia de diversas auxinas en plantas de maíz, principalmente el Ácido Indol acético presentes en sus semillas (Bucio, 2002). En cuanto a la altura de las plantas sus medias no mostraron un aumento progresivo y por tanto no existieron diferencias significativas con respecto a las medias del resto de tratamientos (Figura 12).

Tabla 4. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable número de raíces a los 20, 30 y 60 días de cultivo *in vitro*.

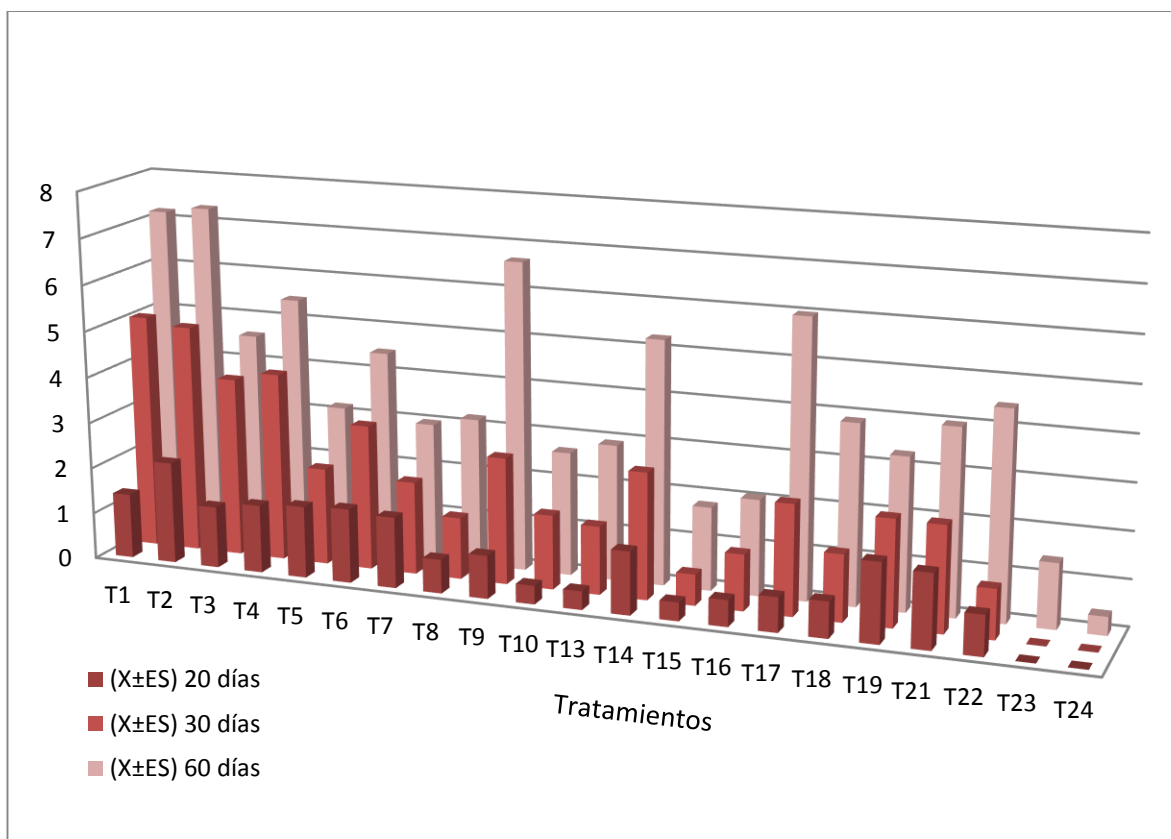
Tratamiento	N° de raíces 20 días (X±ES)	N° de raíces 30 días (X±ES)	N° de raíces 60 días (X±ES)
T1	1,40±1,64c,d,e	5,07±2,76 i	7,20±2,70 j
T2	2,20±2,01 e	4,93±1,98 i	7,33±3,42i,j
T3	1,33±1,45c,d,e	3,87±2,03g,h,i	4,60±2,87e,f,g,h,i,j
T4	1,47±1,68c,d,e	4,07±2,02h,i	5,47±2,13g,h,i,j
T5	1,55±2,07b,c,d,e	2,09±2,39b,c,d,e,f	3,18±3,25b,c,d,e,f
T6	1,60±1,59d,e	3,13±1,85f,g,h,i	4,47±2,56e,f,g,h,i
T7	1,53±1,30d,e	2,00±1,31c,d,e,f,g	3,00±2,17b,c,d,e,f
T8	0,73±0,88a,b,c,d,e	1,33±1,29b,c,d,e	3,20±2,01b,c,d,e,f,g
T9	0,93±1,39a,b,c,d,e	2,73±2,05d,e,f,g,h,i	6,67±3,77h,i,j
T10	0,40±1,06a,b	1,60±1,96b,c,d,e,f	2,67±2,74b,c,d,e
T13	0,40±0,74a,b,c	1,47±1,46b,c,d,e,f	2,93±2,49b,c,d,e
T14	1,36±1,36c,d,e	2,73±1,42e,f,g,h,i	5,27±1,79f,g,h,i,j
T15	0,40±1,06a,b	0,67±1,18a,b	1,80±1,82a,b,c
T16	0,57±0,76a,b,c,d	1,21±1,37b,c,d	2,07±1,69a,b,c,d
T17	0,75±0,71a,b,c,d,e	2,38±2,13c,d,e,f,g,h	6,00±2,51g,h,i,j
T18	0,78±1,09a,b,c,d,e	1,44±1,74b,c,d,e,f	3,89±4,65b,c,d,e,f,g
T19	1,71±0,76 e	2,29±1,50c,d,e,f,g,h,i	3,29±2,43b,c,d,e,f,g,h
T21 CONTROL	1,60±2,10b,c,d,e	2,27±2,63b,c,d,e,f	4,00±3,32c,d,e,f,g,h
T22 CONTROL	0,87±1,81a,b,c,d	1,07±1,83a,b,c	4,47±3,58d,e,f,g,h
T23 CONTROL	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	1,40±1,88a,b
T24 CONTROL	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,40±1,06 a
Kruskal-wallis (versión no paramétrica del ANOVA)	0,000*	0,000*	0,000*

Valor de $p < 0.05$ indica que hubo diferencias significativas entre los grupos comparados

Valores de la media seguidos por letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tuckey.

*Significancia a 0.05

Figura 11. Número de raíces por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 4.



Fuente: Autor

Para la variable altura (cm), los tratamientos que presentaron mejor respuesta fueron T1, T2 y T9. El tratamiento T1, presentó una media de 1,00 cm a los 20 días, 1,07 cm a los 30 días y de 1,24 cm a los 60 días, desarrollando en promedio una altura de 1,10 centímetros por explante en un periodo de tiempo de 60 días. El T2 obtuvo unas medias de 0,96 cm a los 20 días, 1,07 cm a los 30 días y 1,38 cm a los 60 días, desarrollando en promedio una altura de 1,14 centímetros por explante en un período de 60 días. Como se observa en la figura 12. Las medias de los tratamientos T1 y T2 son las más altas respecto a la altura, respecto a los demás tratamientos incluyendo los tratamientos control T21 y T22.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable Altura (cm) a los 20, 30 y 60 días de cultivo *in vitro*.

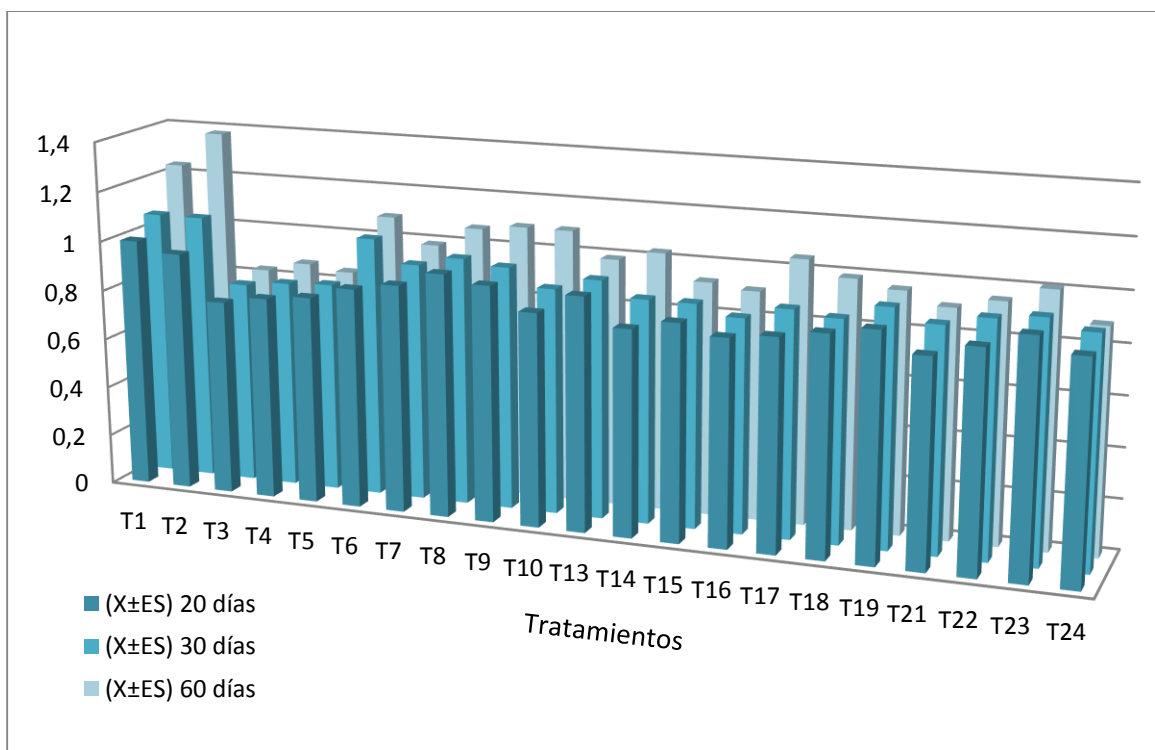
Tratamiento	Altura (cm) 20 días (X±ES)	Altura (cm) 30 días (X±ES)	Altura (cm) 60 días (X±ES)
T1	1,00±0,15 e	1,07±0,11 f	1,24±0,22g,h
T2	0,96±0,16d,e	1,07±0,15e,f	1,38±0,24 h
T3	0,78±0,10 a	0,81±0,11 a	0,83±0,11 a
T4	0,81±0,10a,b	0,83±0,10a,b	0,87±0,13a,b,c
T5	0,83±0,13a,b,c	0,84±0,12a,b	0,85±0,11a,b
T6	0,88±0,12b,c,d,e	1,04±0,14d,e,f	1,09±0,12f,g
T7	0,91±0,13b,c,d,e	0,95±0,14b,c,d,e	0,99±0,14c,d,e,f
T8	0,97±0,16d,e	0,99±0,14c,d,e,f	1,07±0,11f,g
T9	0,94±0,12d,e	0,97±0,12c,d,e,f	1,09±0,17f,g
T10	0,85±0,11a,b,c,d	0,90±0,10a,b,c	1,09±0,24e,f,g
T13	0,93±0,17c,d,e	0,95±0,14c,d,e,f	0,99±0,15c,d,e,f
T14	0,82±0,09a,b,c	0,89±0,08a,b,c	1,03±0,14d,e,f
T15	0,86±0,11a,b,c,d	0,89±0,12a,b,c	0,93±0,11a,b,c,d,e
T16	0,82±0,12a,b,c	0,85±0,16a,b	0,91±0,15a,b,c,d
T17	0,84±0,09a,b,c,d	0,90±0,08a,b,c,d	1,05±0,19d,e,f,g
T18	0,87±0,13a,b,c,d,e	0,88±0,14a,b,c	0,99±0,23a,b,c,d,e,f
T19	0,90±0,10b,c,d,e	0,94±0,11b,c,d,e,f	0,96±0,10a,b,c,d,e,f
T21 CONTROL	0,82±0,11a,b,c	0,89±0,17a,b,c	0,91±0,16a,b,c,d
T22 CONTROL	0,87±0,16a,b,c,d,e	0,93±0,21a,b,c,d	0,95±0,26a,b,c,d
T23 CONTROL	0,93±0,18b,c,d,e	0,95±0,18b,c,d,e	1,01±0,25b,c,d,e,f
T24 CONTROL	0,87±0,20a,b,c,d	0,91±0,23a,b,c	0,89±0,17a,b,c,d
Kruskal-wallis (versión no paramétrica del ANOVA)	0,000*	0,000*	0,000*

Valor de $p < 0.05$ indica que hubo diferencias significativas entre los grupos comparados

Valores de la media seguidos por letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tuckey.

*Significancia a 0.05

Figura 12. Altura (cm) por tratamiento a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 5.



Fuente: Autor

Finalmente, el tratamiento T9 inmersión en el extracto de *Gerbera jamesonii* por 10 minutos, también generó un buen progreso en la producción del número de raíces a través del tiempo. Se obtuvo una media de 0,78 raíces a los 20 días pero avanzó drásticamente a 2,73 a los 30 días y 6,67 a los 60 días, generando de 1- 7 raíces por explante en un periodo de tiempo de 60 días (Figura 9). Con respecto a la altura de las plantas, a los 20 días obtuvo una media de 0,94 cm, a los 30 días de 0,97 cm y a los 60 días 1,09 cm; lo que indica que su progreso en el tiempo se mantuvo constante. Olivella et al. (2001), encontraron altos niveles de Ácido abscísico (ABA), Acido indol acético (AIA) y Zeatina en hojas jóvenes y adultas de plantas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus lo que evidencia que los resultados obtenidos como regulador de crecimiento de tipo auxínico en este tratamiento coinciden con la presencia de estas sustancias en el extracto de sus hojas lo que posiblemente incidió en este tratamiento.

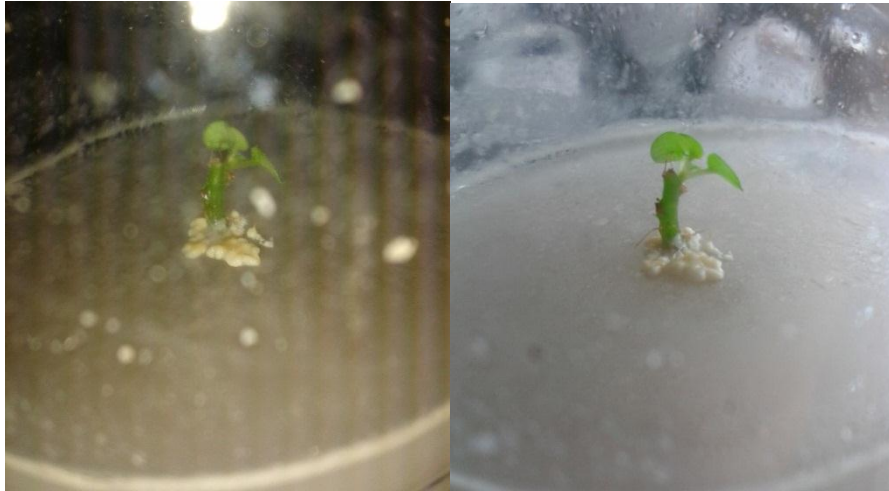
Todos los tratamientos del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis* obtuvieron medias que no mostraron un aumento progresivo a través del tiempo y por tanto no existieron diferencias significativas con respecto a las medias del resto de tratamientos; por consiguiente los tratamientos del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis* T13, T14, T15 y T16, no representan una fuente importante como regulador de tipo auxínico ni citoquinínico. A pesar que los tratamientos en los cuales se aplicó el extracto al medio, en proporción de 10% y 20%, fueron debidamente esterilizados, los tratamientos T15 y T16 de inmersión del explante en el extracto 10 y 20 minutos, presentaron una alta tasa de colonias de bacterias color naranja como vemos en la Figura 14, identificada como cocos Gram negativos. Estos se desarrollaron a los 30 días de la siembra.

Figura 13. Respuesta generada por T9 del extracto *Gerbera jamesonii*



Fuente: Autor

Figura 14. Bacteria presente en segmentos nodales de *Violeta africana* en tratamientos T15 y T16 del extracto del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis*



Fuente: Autor

Los tratamientos de *Gerbera jamesonii* T11 y T12 , en los cuales el extracto se aplicó al medio en una concentración del 10% y 20%, respectivamente, los explantes presentaron oxidación a los 8 días después de la siembra, lo que impidió la observación de una respuesta evaluable (Figura 11). Para el caso del tratamiento T20 de *Zea mays* donde el extracto se aplicó al medio en una concentración del 20%, se presentó igualmente oxidación y contaminación de los explantes, razón por la cual se perdió todo el material vegetal sembrado en esos medios. Al repetir el montaje de estos tratamientos, nuevamente bajo las mismas condiciones de asepsia y al sembrar en medio estéril, los explantes solo se oxidaron y no mostraron respuesta alguna.

Figura 15. Oxidación en los tratamientos T11 y T12 del extracto *Gerbera jamesonii*



Fuente: Autor

En cuanto a la producción de callo, evaluada por su presencia o ausencia en cada explante, se realizó una prueba de Chi cuadrado que muestra el porcentaje dentro del periodo de tiempo de 60 días (Figura 16).

Los únicos tratamientos que generaron callo fueron T3 y T4 del extracto *Aloe vera* añadido en el medio de cultivo y los T5, T6, T7 y T8 del extracto de *Kalanchoe pinnata*, junto con los tratamientos control T21, T22, T23 y T24. El T3 mostró un porcentaje de 6,66% a los 20 días, 26,6% a los 30 días y 33,3% a los 60 días progresivo y constante a través del tiempo a diferencia del T4 que solo generó 6,66% de callo a los 30 días y 26,6% a los 60 días.

Los tratamientos T5, T6, T7 y T8 no generaron callo a los 20 días ni a los 30 días sino alrededor a los 60 días, mostrando una producción de callo del 9,1% en el T5, 26,6% en el T6, 6,66% en el T7 y 6,66% en el T8.

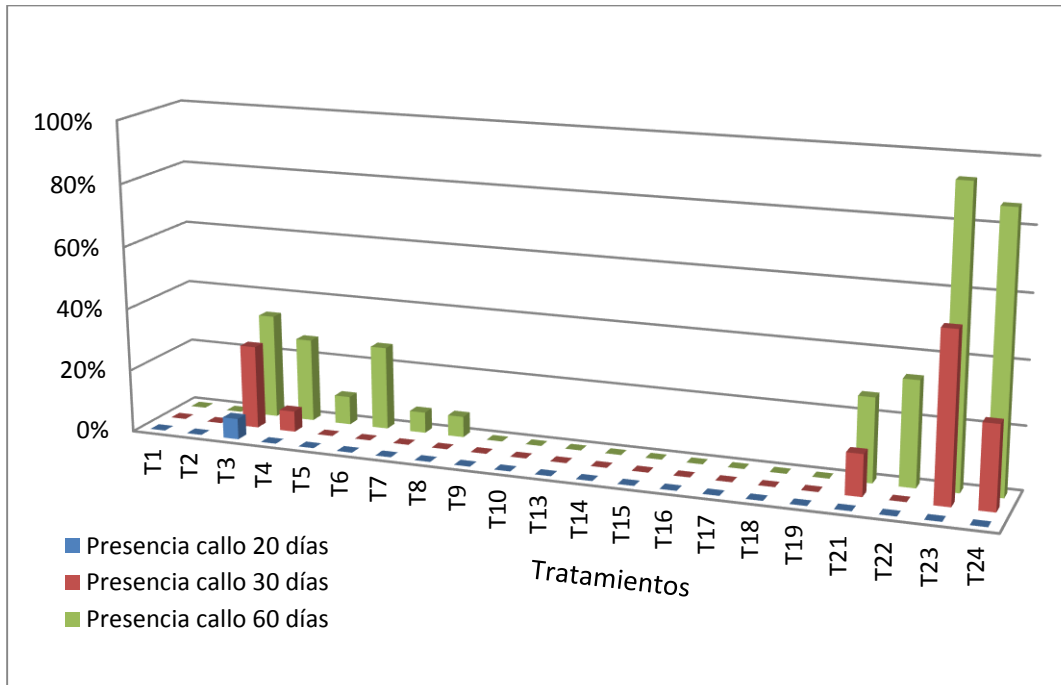
Por su parte todos los tratamientos control generaron callo dentro del periodo de tiempo de 60 días y de alguna manera constante y progresiva.

Tabla 6. Efecto de los tratamientos como reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínico para la variable Producción de callo a los 20, 30 y 60 días de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Presencia callo 20 días	Presencia callo 30 días	Presencia callo 60 días
1	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%
3	6,66%	26,60%	33,30%
4	0%	6,66%	26,60%
5	0%	0%	9,10%
6	0%	0%	26,60%
7	0%	0%	6,66%
8	0%	0%	6,66%
9	0%	0%	0%
10	0%	0%	0%
13	0%	0%	0%
14	0%	0%	0%
15	0%	0%	0%
16	0%	0%	0%
17	0%	0%	0%
18	0%	0%	0%
19	0%	0%	0%
21	0%	13,30%	26,70%
22	0%	0%	33,30%
23	0%	53,30%	93,30%
24	0%	26,70%	86,70%

Prueba de Chi cuadrado que muestra el porcentaje dentro del periodo de 60 días

Figura 16. Porcentaje de presencia de callo en los tratamientos a los 20, 30 y 60 días según la Tabla 6.



Fuente: Autor

5. CONCLUSIONES

- La mejor forma de aplicación para todos los tratamientos, fue inmersión del explante en el extracto pre siembra en el medio de cultivo (MS), durante 10 minutos y 30 minutos.
- Los resultados obtenidos en las variables evaluadas: número de brotes, número de hojas, número de raíces, altura (cm) y producción de callo (%), permiten proponer la utilización de extractos vegetales *Aloe vera*, *Zea mays*, *Gerbera jamesonii* y *Kalanchoe pinnata* como alternativa del uso de reguladores de crecimiento de tipo auxínico y citoquinínico comerciales.
- Los extractos de *Aloe vera* y *Zea mays* pueden usarse como reguladores de crecimiento de tipo auxínico y citoquinínico ya que presentan buena generación de hojas, brotes, raíces, altura y callo, importate en el desarrollo de cualquier especie en cultivo *in vitro*.
- El extracto de *Gerbera jamesonii* puede usarse como regulador de tipo auxínico ya que presenta buen desempeño en la generación de raíces y altura (cm).
- El extracto de *Kalanchoe pinnata* puede usarse como regulador de crecimiento de tipo citoquinínico pues genera gran número de hojas y brotes, demostrando su efecto y su posible actividad brasinoesteroide.
- El extracto del híbrido interespecífico OxG (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), no representa una fuente significativa de regulador de crecimiento auxínico ni citoquinínico ya que su desempeño en la generación de hojas, brotes, raíces, altura y callo no fue alto pero debido a su constancia a través del tiempo podría ser utilizado como alternativa a regulador de crecimiento vegetal en caso de no contar con alguno de los extractos antes mencionados.

- En general todos los extractos evaluados presentaron algún tipo de actividad como regulador de crecimiento y podrían utilizarse en caso de no contar con los reguladores de crecimiento comerciales.

RECOMENDACIONES

- Es necesario implementar en los procesos de obtención de extractos la utilización de filtros milipore de 0.45 micras que garanticen una asepsia de los mismos.
- Realizar ensayos de aclimatización de plantas de *Saintpaulia ionantha* (violeta africana) obtenidas por cultivo *in vitro* en medios enriquecidos con extractos vegetales de *Aloe vera*, *Zea mays* y *Kalanchoe pinnata* como regulador de crecimiento.
- Realizar ensayos con otras especies diferentes a *Saintpaulia ionantha* donde se apliquen los extractos utilizados para determinar la efectividad de los mismos.
- Aplicar pruebas de separación y purificación cromatográficas a los extractos del híbrido *E. oleífera* x *E. guineensis*, *Zea mays* y *Gerbera jamesonii* para aislar los compuestos presentes en estos.

REFERENCIAS

Álvarez A.; Ramos I.; Robaina Y.; Pérez G.; Cuevas M. & Carrillo C. (1996). Efecto antiulceroso de fórmulas que contienen un extracto de *Aloe vera* L. (sábila). *Rev Cubana Plant Med [online]*. Vol.1, n.3, pp. 31-36. ISSN 1028-4796.

Aprocsal. (1994). *De Comunidad a Comunidad*. Boletín No. 7. San Salvador: Asociación de promotores comunales salvadoreños.

Bastidas S.; Peña E.; Reyes R.; Pérez J. & Tolosa W. (2007). Comportamiento agronómico del cultivar híbrido RC1 de Palma de aceite (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) x *Elaeis guineensis*. *Rev Corpoica* 8(1):5-11.

Briggs, P. (2009). *Tanzania: With Zanzibar, Pemba and Mafia*. (6^{ta} ed.). USA: Bradt Travel Guides.

Bucio, C. M. (2002). *Efecto de los reguladores del crecimiento y otros compuestos del maíz sobre el crecimiento, la diferenciación y la síntesis de micotoxinas en Aspergillus*. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de Los Garza, N.L.

Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2007). *Biología*. (7^{ma} ed.). Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.

Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Investigadora, Unidad de Biotecnología. [Versión pdf]. Recuperado de: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf

Chamorro, A. H.; Martínez, S. L.; Fernández, J. C. & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la

multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. *Misty blue*. *Agronomía Colombiana*, 25 (1), 47-53.

Darbyshire, I. (2006). *Flora of Tropical East Africa: Gesneriaceae*. África: In H.J. Beentje & S.A. Ghazanfar.

Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M. & Robledo C.W. (2014) *InfoStat versión 2014*. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina: Grupo InfoStat., FCA. Recuperado de: <http://www.infostat.com.ar>

Fuentes, V.; Castro M. & Ordaz D. (1991). Sustitución de agar por polvos de rizomas de sagú (*Maranta arundinacea* L.) en cultivo *in vitro* de té de riñón (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.) *Esf. Exp. Plantas Med.* J T Roig. CIDM. (no publicado).

Jó García, M.; Hernández, R.; Bustios, S.; Esteves, M. & Echevarría, Y. (2005) Algunas experiencias en la utilización del *Aloe vera* en la preparación de medios de cultivo. Universidad de Pinar del Río. *Revista CIGET Pinar del Río*, 10 (4)

Jordán, M. & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citoquininas*. Fisiología Vegetal. FA Squeo, L. Cardemil. La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.

Konan, E. K.; Durand-Gasselin, T.; Kouadio, J.Y.; Flori, A.; Rival, A.; Duval, Y. & Pannetier, C. (2010). *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports* 29: 1-13.

Kotov A. A. & Kotova L. M. (2000). The contents of auxins and cytokinins in pea internodes related to the growth of lateral buds. *J. Plant Physiol.* 156, 438-448.

Llorente, B. E. (2002). *Aislamiento, Purificación, Caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas.

Müller, L. (1964). *Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. Turriaba, Costa Rica: Editorial SIC.

Naylor, E. & Johnson, B. (1937). A histological study of vegetative reproduction in *Saintpaulia ionantha*. *American Journal of Botany*. Vol.24, No. 10. pp. 673-678

Olivella, C.; Vendrell, M. & Savé, R. (2001). Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg*, 16, 333-342.

Pérez-Álvarez, J.; Aquino-Triana, S.; Flores-Espinoza, A.; Ramírez-Baca, P.; Candelas-Cadillo, M. G.; Aguilera-Ortiz, M. & Chew, M. R. G. (2000). Descripción de la calidad fisicoquímica, microbiológica y nutrimental de jugo de sábila *Aloe vera* varbarbadensis. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. Av. Artículo 123 s/n.

Raven, H.; Evert, R. & Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. Vol. 2 (4^{ta} ed.). New York, NY: Editorial Reverté S. A.

Robey, M. J. (1988). *African violets, gifts from nature*. New York, NY: Cornwall Books.

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT, 969 páginas

Rodríguez H. & Hechevarría I. (2002). Efectos alelopáticos de *Aloe vera* (L.) Burm sobre otras especies de plantas medicinales en condiciones de laboratorio. *Rev Cubana Plantas Medicinales*. 2002:7(3).

Rodríguez, H. & Hechevarría, I. (2004). Efectos estimulantes del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de *Aloe vera* (L.) N. L. Burm. *Rev Cubana Plantas Medicinales* [online]. Vol.9, n.2, pp. 0-0. ISSN 1028-4796.

Rodríguez H. & Hechevarría I. (2006). Gel de *Aloe vera* L N.L. Burm y harina de sagú como soporte sólido de medios de cultivo para plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* pág.11 (1).

Rojas-Rodríguez, F.; Bermúdez, G. & Jiménez, Q. (2006). *Plantas ornamentales del trópico*. Primera edición. Costa Rica: Editorial tecnológica de costa rica.

Sharker, S.; Hossain, M.; Haque, M.; Chowdhury, A.; Kaisar, A.; Hasan, C. & Rashid, M. (2012). Chemical and biological studies of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) growing in Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1317–S1322.

Taiz, L & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. (3ra ed.). Castellón de la plana, España: Universitat Jaume I.

Zambrano JE. (2004). Los híbridos interespecíficos *Elaeis oleifera* H.B.K.por *Elaeis guineensis* Jacq. Una alternativa de renovación para la zona oriental de Colombia. *Rev Palmas* 25 (Número especial, Tomo II):339-349.