

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**ESTUDIOS EN CALLOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS  
SOMÁTICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y  
ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE  
*Aloe barbadensis*, Miller (ALOEACEAE)**

**GIOVANNI GARRO MONGE**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**2004**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIOS EN CALLOGÉNESIS Y  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA,  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS  
FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE  
*Aloe barbadensis*, Miller (ALOEACEAE)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Posgrado en Biología para optar al grado de *Magister Scientiae*

**GIOVANNI GARRO MONGE**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2004**

## **DEDICATORIA**

A mi Señor Jesucristo, fortaleza de mi vida

A mis padres, Claudio y Angela, por darme siempre oportunidades de superación, apoyo y amor incondicional a lo largo de mi vida

A mi esposa Adriana, compañera, amiga y apoyo sincero

A mi hija Valeria, alegría de mi existir

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Marta Valdez, por creer siempre en mí y darme su apoyo, orientación y motivación constante a lo largo de mi formación profesional

Al Dr. Oscar Rocha y a la Dra. Rosaura Romero por su confianza, amistad y apoyo en mi desarrollo profesional.

A los compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología, Gabriel Aguilar y Luis Castro, por su gran apoyo en mi trabajo de laboratorio y sus instrucciones en el manejo de las técnicas de PCR y RAPD.

A los compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Transformación Genética de Plantas de la Escuela de Biología, Marlon, Alex y Johnatan, quienes colaboraron siempre facilitándome mi trabajo en los espacios limitados de mi tiempo.

A los compañeros de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por su apoyo moral y práctico en la finalización de mis estudios de posgrado.

A mi esposa quién durante la realización de mi tesis colaboró mucho con su motivación y apoyo constante.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento del proyecto “Establecimiento de Cultivos Celulares de *Aloe barbadensis*” sin el cual no habría sido posible la realización de mi proyecto de tesis.

A la Comisión de Fondos de Incentivos del MICIT-CONICIT, por el financiamiento otorgado para la realización de los análisis de ADN en las especies de *Aloe*.

A la empresa Sábila Industrial (Laboratorios Carrington, Inc.), por medio de su exgerente Dr. Santiago Rodríguez y su actual gerente general MSc. José Zúñiga, por colaborar con la donación del material vegetal y los análisis de cromatografía líquida (HPLC).

A todos, Muchas gracias !!

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de *Magister Scientiae*.

---

Dr. Victor Jiménez  
REPRESENTANTE DE LA DECANA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

---

Dra. Marta Valdez Melara  
DIRECTORA DE TESIS

---

Dr. Oscar Rocha Núñez  
ASESOR

---

Dra. Rosaura Romero Chacón  
ASESORA

---

Dra. Virginia Solís  
DIRECTOR DEL PROGRAMA REGIONAL DE  
POSGRADO EN BIOLOGÍA

---

Giovanni Garro Monge  
CANDIDATO

## ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	VII
I- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>Aloe</i> .....	1
DIVERSIDAD DEL GÉNERO <i>Aloe</i> .....	3
COMPONENTES QUÍMICOS EN <i>Aloe barbadensis</i> . Miller.....	4
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL POLISACÁRIDO ACEMANNAN.....	8
USOS MÉDICOS DE <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	10
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES .....	11
CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS EN SUSPENSIÓN.....	15
MARCADORES MOLECULARES DE ADN.....	16
AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD).....	17
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA.....	23
LITERATURA CITADA.....	29
II- TEMA 1: Callogénesis somática en <i>Aloe barbadensis</i> .....	36
III- TEMA 2: Inducción de callogénesis y embriogénesis somática en <i>A. barbadensis</i> a partir de semillas.....	58
IV- TEMA 3: Estudios de reproducción sexual en <i>A. barbadensis</i> .....	76

V- TEMA 4: Detección de compuestos de interés farmacológico en callos de <i>A. barbadensis</i> .....	89
VI- TEMA 5: Estudios moleculares de ADN en especies de <i>Aloe</i> en Costa Rica.....	105
VII- CONCLUSIONES GENERALES.....	119
VIII ANEXO 1: Fotografías de especies de <i>Aloe</i> colectadas en el Área Metropolitana, Costa Rica.....	121
IX- Anexo 2: Secuencias de los imprimadores utilizados en el estudio molecular de ADN de especies de <i>Aloe</i> .....	124

## RESUMEN

*Aloe barbadensis* Miller, pertenece a la familia Aloeaceae del grupo de las monocotiledóneas y con centro de origen localizado en Sudáfrica. El género *Aloe* posee cerca de 350 especies. Las plantas son principalmente herbáceas, de hojas suculentas, lanceoladas, que crecen en forma de roseta. Las células del parénquima de las hojas contienen varios compuestos de uso medicinal, cuyos principios activos han sido utilizados en la fabricación de numerosos productos comerciales, tanto médicos como cosméticos. La planta ha sido cultivada de forma tradicional por vías de reproducción vegetativa. Sin embargo, esta técnica a pesar de ser muy rentable, ha tenido serios problemas de control de la contaminación endógena de las plantas. En este sentido, resulta de gran interés la implementación de sistemas de cultivos celulares que permitan disminuir al mínimo los niveles de contaminación endógena, para los procesos industriales de obtención de compuestos con actividad biológica.

En el presente trabajo se desarrolló un sistema de callogénesis somática, utilizando como explante, bases de hojas de plantas jóvenes. Se desarrolló un procedimiento eficiente de desinfección de los explantes el cual permitió contar con material en condiciones adecuadas para su manejo en cultivo *in vitro*. También se implementaron los procedimientos adecuados tanto para la inducción de los callos, como para el mantenimiento de los mismos. Los medios de cultivo utilizados se basaron en el medio MS con modificaciones en cuanto a las concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP. Los callos obtenidos bajo estas condiciones fueron usados para la detección preliminar de compuestos de interés farmacológico. Utilizando la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se logró la detección del compuesto de mayor interés comercial en esta especie como es el polisacárido

Acemannan. En este sentido se logró realizar una comparación de contenido del polisacárido a nivel de los callos con respecto al contenido del mismo compuesto a nivel del gel puro extraído de hojas de una plantación comercial. Aquí se pudo determinar que el contenido encontrado en los callos es cerca de ochenta veces menor que el encontrado usualmente a nivel de las hojas. Además se realizaron análisis cualitativos de presencia de antraquinonas por medio de la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). Estos análisis dieron resultados positivos, sin embargo los compuestos no fueron identificados de forma específica. Por otro lado, a partir del cultivo de plantas adultas (2-3 años) en condiciones de campo, se logró obtener semillas que fueron usadas para la inducción de procesos de embriogénesis somática de *A. barbadensis*. De esta forma, se desarrollaron procedimientos que permitieron la inducción de calogénesis somática y se observaron eventos relacionados con la embriogénesis somática. El cultivo de estas plantas adultas en condiciones de campo permitió además, realizar observaciones de los procesos de floración y fructificación. Estas observaciones representan el primer informe en la literatura sobre esos procesos para la especie *A. barbadensis*. Dada la importancia comercial de la especie y con base en la escasa información disponible en Costa Rica sobre el recurso fitogenético de la misma, se realizaron estudios moleculares de ADN con varias de las especies de *Aloe* presentes en el país. Este trabajo permitió implementar procedimientos de laboratorio para la escogencia de material vegetal, extracción de ADN y las reacciones de amplificación de ADN polimórfico utilizando imprimadores comerciales de la casa Operón. De esta forma se desarrollaron condiciones experimentales preliminares para el estudio y caracterización molecular del recurso fitogenético de la especie en el país.

## LISTA DE CUADROS

PÁGINA

---

### I- INTRODUCCIÓN GENERAL

#### Cuadro 1.

Composición química del gel de las hojas de *A. barbadensis* (Garuda Internacional 1998).....7

#### Cuadro 2.

Actividad biológica asociada a *Acemannan* según Reynolds y Deweck (1999).....9

### II- TEMA 1: Callogénesis somática en *A. barbadensis*

#### Cuadro 1.

Respuesta de inducción de callos a las cuatro semanas de cultivo, mostrada por diferentes explantes de *A. barbadensis* utilizando dos medios de cultivo.....42

#### Cuadro 2.

Desinfección de explantes de *A. barbadensis* con hipoclorito de sodio y sonicación .....45

#### Cuadro 3.

Tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, utilizados en la inducción de callogénesis a partir de explantes de base de hoja de *A. barbadensis*.....48

**Cuadro 4.**

**Respuesta de inducción de callogénesis (%) en explantes provenientes de base de hoja (1-2 cm) extraídos de plantas jóvenes de *A. barbadensis*.....49**

**Cuadro 5.**

**Composición química de los medios de cultivo utilizados para examinar la regeneración de plantas de *A. barbadensis*.....53**

**III- TEMA 2: Inducción de Callogénesis y embriogénesis somática en *A. barbadensis* (Aloaceae) a partir de semillas.**

**Cuadro 1:**

**Número total de “estructuras de embriogénicas” en los callos de *Aloe barbadensis* .....67**

**IV- TEMA 3: Estudios de reproducción sexual en *Aloe barbadensis***

**Cuadro 1. Inducción de germinación *in vitro* de semillas de *A. barbadensis*.  
.....83**

**V- TEMA 4: Detección de compuestos de interés farmacológico en callos de *A. barbadensis***

**Cuadro 1.**

**Tiempos de retención de Acemannan en gel de hojas frescas de *A. barbadensis* y en muestras de callos somáticos, analizados por medio de la técnica de HPLC.....98**

**VI- TEMA 5: Estudios moleculares de ADN en especies de *Aloe***

**Cuadro 1**

**Código de muestras de especies de *Aloe* colectadas para análisis genético por marcadores de ADN (RAPDs).....109**

**Cuadro 2.**

**Procedimiento utilizado en la extracción de ADN de hojas jóvenes de *Aloe* para análisis genético por RAPDs..... 110**

**Cuadro 3.**

**Detalle del programa utilizado en el termociclador IDAHO TECHNOLOGY™ para la reacción de PCR con muestras de *Aloe*..... 113**

**Cuadro 4.**

**Secuencias de los imprimadores OPK 19 y OPA 07..... 114**

## LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

### I- INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1.

Corte paradermal de la hoja de *Aloe barbadensis*. .....6

### II- TEMA 1: Callogénesis somática en *A. barbadensis*

Figura 1.

Plantas de *A. barbadensis* de 4 meses de edad cultivadas en invernadero y utilizadas en los experimentos de inducción de calogénesis.....43

Figura 2.

Hojas jóvenes a las cuales se les ha extraído la parte basal para ser utilizada como explante.....44

Figura 3.

Explantos (base de hojas) utilizados en la inducción de callos somáticos de *A. barbadensis*.....46

Figura 4.

Callos somáticos originados en la epidermis de los explantes de *A. barbadensis*, después de 4 semanas de cultivo en medio de inducción de calogénesis.....46

**Figura 5.**

**Callos somáticos inducidos en explantes extraídos de la base de hojas de *A. barbadensis*, después de 8 semanas de cultivo en medio de inducción de callogénesis.....51**

**Figura 6.**

**Callo somático de *A. barbadensis* luego de 12 de semanas de cultivo, 8 en medio de inducción y 4 en medio de mantenimiento.....51**

**III- TEMA 2: Inducción de callogénesis y embriogénesis somática en *A. barbadensis* a partir de semillas**

**Figura 1.**

**Semilla de *A. barbadensis* obtenida de plantas de 2 años, cultivadas en condiciones de campo y utilizadas en la inducción de callos.....64**

**Figura 2.**

**Callo generado con el medio MSC-15 a partir de semillas de *A. barbadensis* después de 12 semanas de cultivo.....65**

**Figura 3.**

**Comparación entre callos de 16 semanas de cultivo provenientes: A- explantes de base de hoja y B- explantes de semilla de *A. barbadensis*...65**

**Figura 4.**

**Número total de brotes en callos originados a partir de embriones maduros de *A. barbadensis* en los diversos tratamientos de regeneración luego de 4 semanas de cultivo.....68**

Figura 5.

Número total de brotes en callos originados a partir de embriones maduros de *Aloe barbadensis* en los diversos tratamientos de regeneración luego de 12 semanas de cultivo.....68

Figura 6.

Brotes obtenidos en los tratamientos de regeneración con callos de *A. barbadensis* inducidos a partir de semillas. ....69

Figura 7.

Estructuras de tipo “alargamiento cotiledonar” generadas a nivel de los brotes obtenidos con los tratamientos 2 y 3 para la regeneración de plántulas de *A. barbadensis*.....69

Figura 8

Callos cultivados después de 12 semanas que muestran las estructuras organogénicas y una alta pubescencia.....70

#### IV- TEMA 3: Estudios de reproducción sexual en *A. barbadensis*

Figura 1.

Ilustración de inflorescencia terminal en *A. barbadensis*, que muestran la ramificación superior del raquis.....81

Figura 2.

Ilustración de un corte longitudinal de flor de *A. barbadensis*.....82

Figura 3.

Planta “ecotipo” de *A. barbadensis*, en inmediaciones de San José.....82

Figura 4.	
Ilustración de infrutescencia de <i>A. barbadensis</i> .....	84
Figura 5.	
Fotografía de infrutescencia de <i>A. barbadensis</i> en etapa inmadura.....	84
Figura 6.	
Ilustración de las cápsulas dehiscentes observadas en plantas de <i>A. barbadensis</i> .....	85
Figura 7. Fotografía de infrutescencia de <i>A. barbadensis</i> que muestra los frutos a la madurez abriéndose en forma longitudinal.....	85
Figura 8.	
Ilustración de corte longitudinal en cápsula de <i>A. barbadensis</i> .....	86
Figura 9.	
Ilustración de semillas en <i>A. barbadensis</i> .....	86
Figura 10.	
Fotografía de una semilla de <i>A. barbadensis</i> .....	86
III- TEMA 4: Detección de <i>Acemannan</i> en callos de <i>A. barbadensis</i>	
Figura 1	
Callos somáticos de <i>A. barbadensis</i> de doce semanas de cultivo utilizados en la detección de <i>Acemannan</i> por técnicas de HPLC.....	95
Figura 2.	
Espectro de absorción en HPLC, típico de una muestra de gel puro de <i>A. barbadensis</i> .....	96

Figura 3.	
Espectro de absorción de HPLC, encontrado en la muestra 1 de callos somáticos de <i>A. barbadensis</i> .....	97
Figura 4.	
Concentración (mg/100mL) del polisacárido comercial <i>Acemannan</i> en muestras de gel de hojas frescas (1) y muestras de callos somáticos (2,3,4) de <i>A. barbadensis</i> , analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	98
Figura 5	
Detección cualitativa de antraquinonas por medio de la técnica de cromatografía de capa fina (TLC) en callos de <i>A. barbadensis</i> .....	99
V- TEMA 5: Estudios moleculares de ADN en especies de <i>Aloe</i>	
Figura 1.	
Electroforegrama que muestra la migración del ADN total extraído a partir de hojas jóvenes de plantas de <i>Aloe</i> .....	111
Figura 2.	
Electroforegrama para las 13 muestras y un control negativo (14) en dilución 1/10 utilizando el imprimador OPK 19.....	112
Figura 3.	
Electroforegrama que muestra la amplificación de fragmentos polimórficos al azar de ADN de 13 muestras de <i>Aloe</i> con el imprimador OPK 19 de la casa OPERON. ....	114

## VI- ANEXO I

Figura 1:

Plantas adultas de *Aloe barbadensis* Miller.....121

Figura 2.

A y B, Planta de *Aloe spinosissima* Hort. en floración creciendo a la orilla de una calle (Barrio Córdoba).....121

Figura 3.

Plantas de *Aloe saponaria* Haw., creciendo en invernadero durante su floración.....122

Figura 4.

Plantas de *Aloe saponaria* Haw., creciendo junto a otras de *Aloe barbadensis* en condiciones de invernadero. ....122

Figura 5.

Planta de *Aloe arborescens* creciendo en los jardines de los Tribunales de Justicia en Cartago.....123

Figura 6.

Inflorescencia de *Aloe arborescens* que muestra 5 ramificaciones con racimos terminales y gran número de flores.....123

VII- ANEXO 2.

Figura 1:

Secuencias y concentración original de los imprimadores del código OPK  
(OPERON Technologies), utilizados en el estudio molecular de las  
especies de *Aloe*.....124

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### DESCRIPCIÓN DEL GENERO *ALOE*

El género *Aloe* pertenece a la familia *Aloeaceae* (Weiserma 1998). Su centro de origen se ubica en Sudáfrica y ha sido ampliamente cultivado en el norte de Africa y el mediterráneo, en países como Grecia y el sur de Italia. La palabra “Aloe” deriva del griego “Als” o “Alos” que significa *sal*, el cual quizá se relacione con el sabor “acre” que presenta el zumo que se extrae de estas plantas (Granados-Sánchez y Castañeda-Perez 1988).

Clasificación Taxonómica de *Aloe barbadensis* Miller. (Texas A & M, 2004).

Clase . Liliopsida

Subclase V: Liliidae

Orden 1: Liliales

Familia: *Aloeaceae*

Género: *Aloe*

Especie: *barbadensis*, Miller.

El género comprende más de 350 especies identificadas, siendo así el más grande de la tribu *Aloinea*, que comprende además los géneros *Gasteria*, *Haworthia*, *Astroloba*, *Poelnitzia*, *Chamaealoe*, *Chortolirium*, *Lomathophilum*, *Leptaaloe* y *Guillauminia*

(Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988). Las plantas del género *Aloe* fueron introducidas por los españoles en el continente Americano y en general se encuentran ampliamente distribuidas en muchas partes del mundo en zonas desérticas y áridas (Grindlay y Reynolds 1986).

Las plantas son en general suculentas, de hojas gruesas y dentadas o espinosas en los márgenes, que se agrupan en forma de roseta (entre 20 y 30 por planta), sin tallo o caulescentes, su hábito es usualmente herbáceo aunque se encuentran algunas especies con crecimiento en arbusto o arborescente de hasta 15 m de altura (*A. eminens*). Las plantas son perennes con rizoma largo y estolonífero. Presentan inflorescencias superiores con longitudes entre 50 a 60 cm y con 8 a 10 cm de base. La inflorescencia es terminal o lateral, simple o ramificada, formada por un raquis de 1 a 1.35 m, desnuda y lisa con una o dos ramificaciones laterales, la mitad de su longitud finalizada por racimos-espigas. Las flores son de color amarillo o rojo, con listas verdosas dirigidas hacia abajo y acompañadas de una bráctea membranosa lanceolada de color blanco o rosado con líneas oscuras y de 6 mm, pedúnculos curvos de 4 mm, perianto cilíndrico, curvo. Poseen seis estambres hipogíneos, filamentos aleteados, anteras oblongas dorsijas; ovario sésil, oblongo-triangular con varios óvulos en cada cavidad, estilo filiforme, estigma pequeño. La reproducción es sexual, sin embargo su cultivo se ha realizado principalmente a través de propagación vegetativa debido a que los frutos son abortados prematuramente. La floración se da en varias épocas del año dependiendo de la especie, pero sobre todo durante los meses de verano (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

La mayoría de las especies del género *Aloe* son diploides  $2n = 14$  y con una poliploidía limitada al 7% de las especies. El cariotipo básico se muestra muy constante a través del género y parece ser que ni las aberraciones cromosómicas ni la poliploidía han formado parte importante en los fenómenos evolutivos de especiación del género, sino más bien que esta especiación se ha debido principalmente a dos factores: mutación genética e hibridación. Este último ha sido muy importante y de hecho se conocen más de 18 híbridos dentro del género (Vij *et al.* 1980).

La historia de la planta de Sábila se remonta a 2.000 años A.C., en los escritos de arcilla de la Mesopotamia, época desde la cual se conoce sobre todo sus usos medicinales. La especie del género *Aloe* más conocida a lo largo de la historia, fue conocida por cerca de 200 años como *Aloe vera* L., un error taxonómico debido a que su nombre correcto es *Aloe barbadensis* Miller. (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988, Weiserma 1998, Texas A&M 2004).

#### DIVERSIDAD DEL GÉNERO *ALOE*

Desde hace mucho tiempo se ha creído que el centro de origen del género se encuentra en las tierras bajas del sureste de África de donde se distribuyeron los Aloes ancestrales, durante la era terciaria. Se reconocen 11 centros de especiación secundaria en las tierras altas del continente o “África Alta” en la que se encuentran el 82% de las especies identificadas. Se supone que las 350 especies tienen un antecesor común. No obstante existen dudas acerca de: i) dónde es el centro de origen real; ii) si existe un patrón evolutivo de las especies; iii) si el centro de origen es significativo para la producción de

nuevas especies, o si hay centros secundarios donde también ocurre especiación (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

En América, las plantas del género *Aloe* fueron introducidas por los españoles durante el tiempo de la colonia, y se cree que se han distribuido casi exclusivamente debido a razones ornamentales y por su relación con usos curativos domésticos. En las últimas décadas se conoce el cultivo en forma masiva de la especie *A. barbadensis*, que por su importancia económica, en la fabricación de cosméticos y medicamentos, ha sido ampliamente cultivada en regiones del estado de Texas, Arizona, Nuevo México y zonas áridas de México y Guatemala.

En Costa Rica, las especies de éste género siguen siendo cultivadas de forma ornamental principalmente, con la excepción de *A. barbadensis* que ha empezado a cultivarse recientemente de forma comercial, por algunas compañías internacionales y locales.

Actualmente no se encuentran informes en la literatura acerca de la distribución y diversidad del género en el país. Incluso, se desconoce este tipo de información para la región centroamericana.

#### COMPONENTES QUÍMICOS EN *Aloe barbadensis*, Miller.

Los componentes químicos del gel y exudados de las hojas de *A. barbadensis* han sido ampliamente estudiados en relación con las propiedades farmacológicas que presentan algunos de ellos. Sin embargo, algunos estudios no distinguen claramente entre los componentes encontrados en el gel y los encontrados en el exudado de hojas.

La masa del gel de las hojas de *A. barbadensis* es un mucílago (fig. 1) compuesto principalmente de polisacáridos naturales con pequeñas cantidades de otros compuestos. Contiene cerca de un 98.5% de agua con una porción insoluble en alcohol, de alto contenido en ácido urónico, fructosa y azúcares hidrosolubles (Grindlay y Reynolds 1986). Mandal y Das (1980) sostienen que los principales componentes del gel son: ácido galacturónico acompañado de pequeñas cantidades de galactano, arabinano y un glucomanan no acetilado. Además de polisacáridos, se han identificado una serie de otros compuestos presentes en el gel. Gjerstad (1971) encontró pequeñas cantidades de azúcares libres como glucosa y aldopentosa. También encontró un 2.5% (peso seco) de proteína y 18 aminoácidos comunes de los cuales, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, la histidina y la arginina son los que se presentan en mayor cantidad.

Recientemente se han publicado varios informes acerca de nuevos componentes extraídos de las hojas de *A. barbadensis*. Estos mencionan compuestos relacionados con los C-glucósidos, C-glucosilantronas (Okamura *et al.* 1997), antronas y antroquinonas (Saleem *et al.* 1997), una serie de compuestos llamados “cromonas” (Speranza *et al.* 1997, Waller *et al.* 1997), algunos de los cuales han presentado propiedades antiinflamatorias comparables a los efectos de la hidrocortisona (Hutter *et al.* 1996).

Algunos productos naturales aislados a partir de *A. barbadensis* son barbaloina, tetranitroaloe emodina, aloesina, isoaloesina,  $\beta$ -sitosterol, giberelinas, polisacáridos como carrisina y aloferon, algunos alcanos, ácidos grasos y bencenos (Saleem *et al.* 1997).

A pesar de que las hojas han sido el principal objeto de trabajo en la búsqueda de principios activos, Saleem *et al.* (1997) también han trabajado en la identificación de compuestos como aloe barbendol encontrado en las raíces de *A. barbadensis*.



**Figura 1.** Corte paradermal de la hoja de *Aloe barbadensis*. La flecha señala el mucilago presente en la epidermis de la hoja. (Tomado de Weiserma 2004).

De forma general, una cantidad de compuestos han sido estudiados en *A. barbadensis*. Un informe reciente de Garuda International (1999) menciona la composición química en el gel extraído de las hojas de *A. barbadensis* que se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1: Composición química del gel de las hojas de *A. barbadensis*. Según Garuda International Inc. (1999).

<b>Mono y Polisacáridos **</b>	<b>Aminoácidos ppm</b>	<b>Vitaminas mg / 100mL</b>	<b>Enzimas Unidades / 100 mL</b>
Polihexanosas	Acido aspártico 13-15	B-1 : 6-7	Amilasa 1100-1600
Hexanosas	Acido glutámico 13.5-15.5	B-2 : 6-7	Lipasa 600-800
Xilosa	Alanina 1.0-1.3	C : 47-61	
Arabinosa	Arginina 4.5 - 5.5	Niacinamida: 30-37	
Galactosa	Fenilalanina 4.3- 4.7	B-6 : 3.0-3.7	
Glucosa	Glicina 7.0-8.0	Colina . 9.5-11.2	
	Histidina 2.8-3.3		
	Isoleusina 3.5-4.0		
	Leucina 8.5-9.0		
	Lisina 5.0-6.0		
	Metionina 1.5-2.0		
	Prolina 8.0-9.0		
	Serina 6.0-7.0		
	Tirosina 2.8-3.3		
	Treonina 5.0-6.0		
	Valina 6.5-7.0		

\*\* Las concentraciones específicas aún no han sido determinadas

Otros compuestos determinados son:

Proteína: 0.11g / 100 g

Grasa: 0.09g / 100 g

Ceniza : 0.25%

Fibra cruda: 0.10%

Calorías: 3.3/100 g. (Garuda International Inc. 1999).

Las proteínas encontradas en el gel de la planta han sido principalmente glucoproteínas detectadas en varias especies del género *Aloe*, como por ejemplo una con actividad en la proliferación celular de células *in vitro* de humanos y hamsters (Yagi *et al* 1997). La proteína posee un peso molecular de 29.000 Da y está constituida de dos subunidades. En otros estudios se ha informado de la presencia de una serie de elementos tales como aluminio, boro, bario, calcio, hierro, magnesio, manganeso, sodio fosforo, silicon y estroncio (Yamaguchi *et al.* 1993).

#### ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL POLISACÁRIDO ACEMANNAN

Resulta de gran interés un compuesto llamado *Acemannan*, un polisacárido insoluble en alcohol, el cual ha sido de amplio uso en estudios tanto de trastornos gástricos (colitis ulcerativa, gastritis), cicatrización de heridas, quemaduras por fuego, como en el tratamiento de los efectos de la radiación solar en la piel, adyuvante en la respuesta inmunológica, etc. (Roberts y Travis 1995, Green 1996, Williams *et al.* 1996, Byeon *et al.* 1998).

El polisacárido *Acemannan*, conocido comercialmente como Carrasyn <sup>TM</sup>, ha sido descrito por Carrington Laboratories (Texas) como una poli-manosa acetilada de cerca de 80.000 Daltons y mencionado además como un estimulador del sistema inmune y otra serie de propiedades inmunológicas (McDaniel y McAnalley 1987, Reynolds y Dweck 1999).

Una gran cantidad de estudios se han llevado a cabo acerca de la actividad biológica de este polisacárido. Recientemente, Reynolds y Deweck (1999) mencionan una gran lista

de referencias en las cuales se ha asociado el compuesto *Acemannan* con diversas actividades biológicas. Esta información se resume en el cuadro 2.

Cuadro 2: Actividad biológica asociada a *Acemannan* (Reynolds y Deweck 1999).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Inhibición de la adhesión bacterial en células del pulmón	Azghani <i>et al.</i> 1995
Adyuvante de virus	Chinnah <i>et al.</i> 1992
Estimulación en formación de macrófagos	Egger <i>et al.</i> 1996
Pérdida de reacción tóxica en ratas y perros	Fogleman <i>et al.</i> 1992a
Pérdida de toxicidad oral en ratones, ratas y perros	Fogleman <i>et al.</i> 1992b
Estimulación en formación de leucocitos	Green 1996
Necrosis de tumores caninos y felinos	Harris <i>et al.</i> 1991
Supresión de la replicación viral <i>in vitro</i>	Kahlon <i>et al.</i> 1991a
Terapia en SIDA	Kahlon <i>et al.</i> 1991b; McDaniel <i>et al.</i> 1987
Modificación de la glucosilación de glucoproteínas virales	Kemp <i>et al.</i> 1990
Regresión de fibrosarcomas	King <i>et al.</i> 1995
Estimulación en síntesis del colágeno	Lindblad y Thul 1994
Actividad antiviral en cultivos celulares	McAnalley <i>et al.</i> 1988
Estimulación de la actividad asesina natural de la célula	Marshall y Druck 1993
Inducción de citoquinas	Marshall <i>et al.</i> 1993
Ayudante de la vacuna del Herpes	Nordgren <i>et al.</i> 1992
Regresión del sarcoma en ratones	Peng <i>et al.</i> 1991
Curación de úlceras orales	Plemons <i>et al.</i> 1994
Curación de quemaduras de radiación	Roberts y Travis 1995
Estabilización clínica de la leucemia felina	Sheets <i>et al.</i> 1991
Curación de heridas	Tizard <i>et al.</i> 1994
Estimulación de la respuesta de linfocitos a los aloantígenos	Womble y Helderman 1988
Alivio de SIDA en Felinos	Yates <i>et al.</i> 1992

## USOS MÉDICOS DE *Aloe barbadensis*, Miller.

Dioscórides, quien fuera médico cirujano de Nerón, sabía usar *Aloe* para cicatrizar heridas, curar la disentería, “limpiar el estómago”, detener el flujo de sangre y curar la ictericia. En el “Herbario Griego”, Dioscórides menciona las cualidades medicinales de los jugos secos de *A. barbadensis* (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

Además, numerosos estudios han asociado el gel extraído de las hojas de la planta con: i) actividad antimicótica (Saks y Barkaigolan 1995); ii) cicatrización de heridas (Jiménez-Magallanes *et al.* 1995); iii) curación de problemas gástricos (Parmar *et al.* 1986); iv) propiedades anti-inflamatorias (Udupa *et al.* 1994, Hutter *et al.* 1996).

Algunos estudios mencionan que el poder curativo del gel de *Aloe*, como medicamento (cápsulas, extracto o ungüento) está basado en un concepto diferente al de las drogas comunes debido a que el gel contiene moléculas de azúcar altamente reactivas, las cuales son utilizadas por las células de los tejidos dañados para limpiar y “hacer reparaciones” del tejido a punto de morir (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

Estudios recientes realizados en conejos, han relacionado la actividad terapéutica tópica del gel extraído de las hojas de *A. barbadensis*, con la pentoxifilina en el alivio de picaduras de insectos (Miller y Koltai 1995). Otros estudios realizados en ratones han encontrado efectos positivos del uso del polisacárido *Acemannan*, contenido en el gel de *A. barbadensis*, en tejido irradiado por rayos gamma (Roberts y Travis 1995), así como

en casos de dermatitis producida por efecto de irradiación solar (Williams *et al.* 1996) y radiación ultravioleta (Byeon *et al.* 1998)

Otros resultados de gran interés son los encontrados por Koo (1994) en relación con la actividad antiulcerante y antidiabética del extracto del gel, así como con la actividad inmunológica encontrada en un polisacárido extraído de las células del parénquima de las hojas (Hart *et al.* 1989). Por otro lado, Fahim y Wang (1996) han informado que un liofilizado extraído de *A. barbadensis*, en conjunto con acetato de zinc puede servir como anticonceptivo vaginal.

La vasta información científica acerca del uso médico de las plantas de *Aloe* y en forma específica de *A. barbadensis*, es una señal clara de la relevancia de continuar estudios serios en relación con la identificación y extracción de los diversos compuestos químicos presentes en la planta, con potencial para el uso farmacológico.

#### CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES DEL GENERO *Aloe* Y DE LA ESPECIE *A. barbadensis*, Mill.

Dentro del género *Aloe* se han estudiado varios sistemas de cultivo *in vitro* en especies como *A. ferox*, *A. petrorensis*, *A. arborescens* y *A. ciliaris*, orientados al establecimiento de organogénesis somática (Gui *et al.* 1990, Comeanu *et al.* 1994), a la formación de callos (Groenenwald *et al.* 1975, Racchi 1988), al cultivo de anteras (Keijzer y Crest 1987), así como al cultivo *in vitro* para el estudio de metabolitos secundarios de interés farmacológico (Racchi 1988).

Los compuestos de interés farmacológico podrían ser extraídos de mancha más eficiente, en condiciones controladas de asepsia y homogeneidad química, en sistemas *in vitro*, tales como la calogénesis somática y el cultivo de células en suspensión. Hasta el momento, los estudios han aportado algunos resultados importantes en cuanto a la micropropagación, pero no así en cuanto a la inducción de calogénesis somática.

Groenewald y colaboradores (1975) generaron callos somáticos en *A. petrorensis*. En este estudio ellos escogieron tejidos provenientes de semillas como explantes, y lograron la generación de callos a las cuatro semanas de cultivo. A partir de este sistema de calogénesis se regeneraron plántulas en periodos de 8 a 10 semanas después de iniciados los cultivos.

Racchi (1988) logró la inducción de callos en *Aloe ferox*. Sus mejores resultados fueron a partir de explantes extraídos de semillas intactas (embrión y segmentos de cotiledón). Los callos se formaron cuatro semanas después de iniciados los cultivos y fueron de color amarillo-verdoso, pálidos, compactos y con nódulos. La estructura nodular desarrollada dentro del callo dió origen a grupos de estructuras morfogénicas. La mayoría de los callos fueron capaces de desarrollar plántulas en medio con y sin reguladores de crecimiento y mantuvieron su capacidad embriogénica por más de un año. Algunos análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) dieron resultado positivo en las plántulas, para detectar la presencia de compuestos como aloesin, aloeresin y aloin, pero éstos compuestos no se encontraron en los callos (Racchi 1988).

Otro trabajo importante dentro del género *Aloe* ha sido el realizado por Corneanu y colaboradores (1994) en *A. arborescens*. En este trabajo, los autores informan la regeneración de plantas a partir de segmentos de tallo de brotes axilares cuando utilizan el medio básico MS (Murashige y Skoog 1962) sin el uso de reguladores de crecimiento en las primeras etapas del cultivo. En este estudio se logró la neoformación de plántulas. Se han obtenido pocos resultados con el uso de explantes haploides dentro del género *Aloe*. Keijzer y Crest (1987) realizaron estudios para la búsqueda de diferencias citológicas entre las células del tejido de anteras, relacionadas con la esterilidad masculina de las plantas de *Aloe ciliaris*. En estos estudios los autores iniciaron cultivos *in vitro* de anteras, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos en inducción de brotes o regeneración de plantas.

Debido a su baja capacidad de reproducción sexual, *A. barbadensis* ha sido cultivada principalmente de forma vegetativa y recientemente algunos trabajos informan de su cultivo mediante técnicas *in vitro*. En éstos, se han establecido sistemas de regeneración de plantas mediante organogénesis somática al utilizar tejidos como: i) meristemos apicales (Natali *et al.* 1990, Meyer y Staden 1991, Richwine 1995, Hirimburegama y Gamage 1995), ii) anteras (Keijzer y Cresti 1987), iii) bases de hojas (Cavallini *et al.* 1993) y iv) meristemos radicales (Roy y Sarkar 1991). Estas investigaciones han tenido como objetivo principal la micropropagación en masa de las plantas (Meyer y Van Staden 1991) y el estudio de la variación somaclonal, a nivel de contenido y variaciones cuantitativas en el ADN de los tejidos cultivados (Castronera-Sanchez *et al.* 1988, Cavallini *et al.* 1993).

Aún cuando ha sido posible el establecimiento de sistemas de organogénesis y regeneración de plantas *in vitro*, la especie ha mostrado ser bastante recalcitrante para el desarrollo de sistemas de embriogénesis somática. Contrario a lo encontrado en la literatura para otras especies relacionadas (*A. ferox*, *A. petrorensis*), *A. barbadensis* sólo ha presentado formación de callos morfogénicos en los estudios realizados por Castronera-Sánchez *et al.* (1988) y Cavallini *et al.* (1993). Sin embargo en estos estudios la respuesta embriogénica de los callos no fue observada.

Castronera-Sánchez *et al.* (1988) estudiaron el comportamiento de varios tipos de explantes en cuanto a la capacidad morfogénica. En este estudio, se encontró que el 5% de los explantes de la base de hojas formaron callos suaves que se originaron en la base del tejido epidérmico. Estos callos fueron amarillentos y desarrollaron centros meristemáticos persistentes (mitóticamente activos) en 3 semanas. Ocasionalmente algunos explantes de base de hojas desarrollaron pequeñas cantidades de callos compactos los cuales formaron brotes cuando se cultivaron en MS con 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-benzilaminopurina (BAP). En este estudio, los autores encontraron una fuerte correlación positiva entre la habilidad morfogénica y el contenido de ADN en el núcleo de callos y brotes.

Cavallini y colaboradores (1993) encontraron variaciones en el contenido de ADN de las plantas regeneradas por cultivo *in vitro* en comparación con las plantas cultivadas *in vivo*. Ellos observaron cambios como tetraploidía así como una correlación entre el contenido básico de ADN en el núcleo y el área de la célula epidermal. Este punto es importante

debido a que, si esta relación también se puede dar con la dimensión de la célula del parénquima (en donde se acumulan los principios activos de *Aloe*), podría afectar la productividad de la planta en cuanto a esos principios activos (Cavallini *et al.* 1993). Sin embargo, hasta la fecha no se han dado nuevos informes que permitan confirmar éstas hipótesis.

Los sistemas de cultivo *in vitro* desarrollados para la especie *A. barbadensis* Mill. han resultado ser de interés, en cuanto al potencial de micropropagación masiva de la especie, y para evitar los problemas generados con la baja tasa de reproducción sexual presentada por la especie. No obstante, el establecimiento de un sistema de callogénesis somática o cultivo de células en suspensión para la especie, vendría a ser de mayor provecho no sólo en cuanto la micropropagación masiva, sino también en cuanto a la selección de líneas “élite” dentro de las poblaciones *in vitro*, así como para el estudio de aspectos fundamentales de la constitución genética de la especie.

## CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS EN SUSPENSIÓN

La embriogénesis somática es el desarrollo de embriones a partir de células somáticas sin la participación de gametos. En este proceso se dan etapas semejantes a las de la reproducción sexual. Cada embrión somático es una estructura bipolar, con un eje radical-apical, independiente del tejido que le dio origen, que genera una planta diferenciada similar a las cigóticas (Litz y Jarret 1991). La regeneración de plantas a través de dicho proceso es por tanto

un buen modelo o sistema, a partir del cual se puede dar la aplicación de técnicas biotecnológicas, tales como la ingeniería genética.

Los embriones somáticos pueden ser generados en medios de cultivo semi-sólidos o líquidos. Estos últimos se conocen como cultivos de células en suspensión o suspensiones celulares, que tienen la ventaja de producir embriones somáticos individualizados en gran número. A nivel comercial, el cultivo de células en suspensión en bioreactores (Teng *et al.* 1993), es una estrategia idónea para incrementar el rendimiento en la producción y extracción de sustancias de uso farmacológico. Esto, debido a las condiciones asépticas, a las variables físicas y químicas controladas, así como al volumen ilimitado de los cultivos.

## MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas, colores, tamaños (características morfológicas), que los distinguen entre sí. Esta variabilidad, o polimorfismo genético, ocurre en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Así, cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos sirve entonces como una etiqueta o marcador genético que se convertirá en un rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos.

Los marcadores moleculares no son afectados por el medio ambiente, ya que se basan en la secuencia del ADN y la información genética no cambia aunque las plantas estén

sujetas a condiciones extremas y variadas. Además, como se trata de ADN, la información es constante en cualquier parte de la planta y en cualquier etapa de desarrollo. Al igual que los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores moleculares detectan la variación natural entre individuos y su herencia sigue las leyes mendelianas. Una ventaja adicional es la posibilidad de analizar loci únicos (regiones únicas en el genoma) o loci múltiples (regiones repetidas a través del genoma).

En la actualidad los marcadores moleculares de ADN, empleados de manera amplia son:

1. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de ADN (RFLP, siglas en inglés)
2. Fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD, siglas en inglés)
3. Polimorfismos en fragmentos amplificados de ADN (AFLP, siglas en inglés).
4. Secuencias cortas repetidas de ADN, o microsatélites

**ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE ADN POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD siglas en inglés: “*random amplified polymorphic DNA*”)**

La técnica de los RAPD se basa en una modificación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). Esta última, permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas. Pequeños oligonucleótidos, con homología a las secuencias flanqueantes, son utilizados como

iniciadores para la polimerización del ADN de la región de interés. La técnica de los RAPD usa un solo oligonucleótido con secuencia al azar y se amplifica una región del genoma flanqueada por réplicas invertidas del oligonucleótido. Los resultados de la amplificación se pueden visualizar después de su migración en una cámara de electroforesis, utilizando un gel de agarosa y una tinción con bromuro de etidio. La base del polimorfismo en este caso resulta en pequeños cambios en o cerca de las regiones de homología del oligonucleótido, que pueden afectar los productos de la PCR y causar ganancia o pérdida de bandas (Watson *et al.* 1988).

Esta técnica resulta muy adecuada para investigar variabilidad en especies relacionadas y puede servir como herramienta en la caracterización genética de especies. Junto con la técnica de RFLP, mini y micro-satélites, los RAPDs representan una alternativa de bajo costo y alto rendimiento para analizar muestras en alto número (Rafalski 1997).

Dentro de algunas de las dificultades y limitaciones de la técnica, Hadrys *et al.* (1992) mencionan las siguientes:

- El tamaño del imprimador: la especificidad del análisis del genoma, está determinada por el tamaño del imprimador. De esta forma imprimadores cortos podrían amplificar un gran número de secuencias difíciles de manejar y por otro lado, imprimadores muy grandes podrían amplificar unas pocas secuencias aportando poca información. Los tamaños más recomendados por la mayor parte de los autores, son de 10 pares de bases.

- Alta sensibilidad a las condiciones de la reacción: debido a su base en la técnica de PCR, la principal limitación de los RAPD es su sensibilidad a las condiciones de la reacción de PCR, por lo cual pequeños cambios en las condiciones pueden afectar la reproducibilidad de amplificación de los productos de PCR. La técnica es sensible a: 1) los perfiles de temperatura usados en la reacción, 2) el tipo de *Taq* polimerasa usada, 3) la concentración de  $Mg^{2+}$ . Por su lado el perfil de la amplificación es sensible a la *Taq* y a la concentración de ADN. Carlson *et al.* (1991) han encontrado que la concentración óptima de la muestra de ADN por reacción puede variar sustancialmente de las condiciones típicas (25 ng por reacción) utilizadas, dependiendo de la combinación entre ADN e imprimador. Los perfiles térmicos establecidos dependen del *termociclador* utilizado y por tanto deben ser estandarizados. Solamente mediante una estandarización estricta de las condiciones de reacción se puede garantizar la reproducibilidad de los productos de amplificación.
- Posibilidad de Co-migración: un supuesto del uso de la técnica de RAPD, es que los fragmentos amplificados son únicos y que el procedimiento no amplifica dos fragmentos distintos los cuales podrían co-migrar en el gel debido a su tamaño similar. De esta forma la co-migración se podría comprobar con ayuda de un análisis con la técnica de transferencia con papel secante, conocida como “*Southern blot*”. De forma alterna se podría también utilizar un gel de poliacrilamida el cual incrementa la resolución de las bandas y así se podría observar mejor la separación entre ellas.

- Baja reproducibilidad de los productos amplificados: como en las demás técnicas de marcadores moleculares, algunos fragmentos obtenidos de los RAPD pueden ser ambiguos y difíciles de contar, otros por su parte pueden ser bastante claros pero poco reproducibles. En cuanto a los fragmentos difusos, estos pueden derivarse de hibridaciones no específicas entre productos de la amplificación no relacionados y por tanto no pueden ser usados como marcadores genéticos. A pesar de la aparición espontánea de este tipo de eventos, la experiencia ha mostrado que si la amplificación por medio de RAPD es repetida dos o más veces, la mayoría de los marcadores son observados claramente y pueden ser reproducibles y contables.

Las técnicas más comunes utilizadas para la búsqueda de marcadores moleculares de ADN difieren de forma sustancial en cuanto a: i) grado de complejidad de los procedimientos, ii) cantidad de ADN requerida, iii) información de la secuencia necesaria para el inicio del análisis del genoma, iv) poder de análisis de genotipos relacionados, v) costos en términos de mano de obra y dinero y vi) robustez de la técnica en sus aplicaciones. En este sentido, la técnica de RAPD parece tener alto potencial de aplicación en muchas áreas de la taxonomía y ecología, debido a sus requerimientos mínimos de tecnología, mano de obra y costos (Lynch y Milligan 1994).

## OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de cultivos celulares embriogénicos de Sábila (*Aloe barbadensis*, Miller), que permita el subsecuente cultivo de células en suspensión, la regeneración de plantas y el análisis de compuestos con actividad biológica. Además, estudiar algunos eventos de reproducción sexual y realizar análisis moleculares de ADN en especies de *Aloe* presentes en el país.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos embriogénicos de *Aloe barbadensis* a partir de explantes de base de hojas extraídos de plantas jóvenes. Para esto, se seguirá el siguiente procedimiento:
  - i) Escogencia del procedimiento para la desinfección adecuada de los explantes de *A barbadensis*
  - ii) Selección del medio de cultivo (semi-sólido) óptimo para la inducción y mantenimiento de los callos embriogénicos
  - iii) Obtención de plantas *in vitro* a partir del cultivo de callos embriogénicos anteriormente desarrollados, en condiciones de cultivo semi-sólido.
  
- 2- Desarrollar los procedimientos adecuados para la inducción de callos embriogénicos a partir de explantes de semilla obtenidos de plantas adultas cultivadas en condiciones de campo. Para esto se llevaran a cabo actividades similares a las citadas en el objetivo anterior en

cuanto a la desinfección de explantes y escogencia de medios de cultivo para la inducción y mantenimiento de los callos.

- 3- Realizar estudios de los eventos de reproducción sexual observados en las plantas cultivadas en condiciones de campo. Describir el proceso de fructificación y de producción de semillas.
- 4- Realizar análisis que permitan la identificación y cuantificación de los compuestos de interés farmacológico presentes en los cultivos celulares establecidos a partir de bases de hoja. Esto se realizará por medio de las técnicas de cromatografía de capa fina (TLC) para el caso de antraquinonas y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para el caso del polisacárido *acemannan*.
- 5- Realizar análisis de ADN con el fin de encontrar marcadores moleculares para las especies de *Aloe* presentes en el país.
  - i) Se realizarán estudios de identificación y colecta de las especies de *Aloe* presentes en el país con el objeto de conocer el recurso fitogenético de la especie.
  - ii) Los estudios moleculares de ADN se llevarán a cabo por medio de la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (“RAPD”).

## **PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA**

### **UBICACIÓN DEL AREA DE ESTUDIO**

La investigación se llevó a cabo principalmente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Transformación Genética de Plantas, de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica (UCR). Los análisis moleculares de ADN se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la misma Escuela. Por otro lado, para los análisis de presencia de compuestos de interés farmacológico en los cultivos celulares desarrollados, se contó con la colaboración de los laboratorios 011 y 012 de la Escuela de Química de la UCR y del Departamento de Control de Calidad de la compañía farmacéutica, Carrington Laboratorios en su Planta Sábila Industrial, Liberia, Guanacaste.

### **OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal que se utilizó en la investigación para la inducción de los cultivos celulares (*Aloe barbadensis*) fue facilitado por la empresa Sábila Industrial, Inc. (Liberia, Guanacaste) y la empresa Rancho Aloe de Costa Rica (Bagaces, Guanacaste). El material se colectó en el campo de la plantación y fue mantenido en condiciones de invernadero de la Escuela de Biología (UCR) hasta su utilización en el laboratorio.

Además se colectó material vegetal de otras especies de *Aloe* en las inmediaciones del Área Metropolitana, en jardines y fincas.

## I- DESARROLLO DEL SISTEMA DE CALLOGÉNESIS SOMÁTICA

En una primera etapa se desarrollaron los procedimientos experimentales para la inducción de callos embriogénicos de *A. barbadensis*. Para esto, se siguió el siguiente procedimiento:

### 1- Escogencia del explante

En los estudios de callogénesis somática se utilizaron varios explantes tales como: semillas, bases de hojas, inflorescencias, ovarios inmaduros, meristemos apicales, rizomas. De estos se escogieron aquellos que presenten las respuestas más favorables al cultivo e inducción de callos.

Se utilizaron los siguientes métodos de extracción de explantes:

- i) Cavallini *et al.* (1993) para explantes provenientes de bases de hojas
- ii) Groenewald *et al.* (1975) y Racchi (1988), en el caso de semillas e inflorescencias
- iii) Natali *et al.* (1990) para el caso de meristemos apicales

En todos los casos, los explantes se cultivaron en placas de Petri con medio semi-sólido (25 ml de medio por placa) a razón de 3 a 5 por placa. Se realizaron subcultivos cada dos a tres semanas dependiendo de la respuesta observada.

### 2- Método de desinfección de explantes

Durante este período inicial se buscaron los métodos de desinfección adecuados para cada uno de los explantes. Para esto se utilizaron diferentes protocolos de desinfección recomendados en la literatura por Castronera-Sánchez *et al.* (1988), Natali *et al.* (1990),

Cavallini *et al.* (1993), basados en el uso de soluciones de hipoclorito de sodio al 4,25%, etanol 70% y Benomyl (antimicótico) como agentes desinfectantes. Además se estudió el efecto del uso de técnicas de sonicación, asociadas a los protocolos de desinfección.

De manera general se siguió el siguiente procedimiento básico:

Los explantes se colocaron en una solución que contiene hipoclorito de sodio al 4,25 % y se sometieron a sonicación por periodos de tiempo preestablecidos, luego se realizaron lavados con agua autoclavada (3 veces), luego se transfirieron a etanol al 70 % por periodos de 1-3 min. Luego se volvieron a lavar con agua autoclavada (3 veces) hasta eliminar completamente el alcohol. En seguida los explantes se mantuvieron en contacto con una solución de Benomyl al 1 % por un período de 5 min para un posterior y último lavado con agua autoclavada (3 veces) antes de ser sembrados en el medio de cultivo.

Los protocolos de desinfección se establecieron de forma independiente para cada tipo de explante de manera a obtener un mínimo de contaminación del material sembrado en los medios de cultivo.

### 3- Selección del medio de cultivo (semi-sólido) óptimo para la generación de callos embriogénicos.

La generación de callos en los diferentes explantes se evaluó en varios medios de cultivo con el fin de encontrar las mejores condiciones para la inducción de callos embriogénicos.

Se usaron aquellos medios utilizados para especies del género *Aloe* por autores como: Castronera-Sánchez *et al.* (1988), Natali *et al.* (1990), Cavallini *et al.* (1993), Groenewald *et al.* (1975) y Racchi (1988), Meyer y Van Staden (1991), Roy y Sakar (1991).

**Los** tratamientos se basaron en la utilización del medio básico de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) con algunas modificaciones tales como suplementos de Kinetina y 2,4-D como reguladores de crecimiento. Otros suplementos como el ácido p-aminobenzoico y la tirosina, sugeridos por Cavallini *et al.* (1993) fueron examinados también.

En una primera etapa se trabajó con el medio MS suplementado con kinetina (1 mg/L) y 2,4-D (0.5mg/L), Phytigel™ (3,0 g/L), sacarosa (30 g/L) y ajustado a un pH de 5.8.

Luego de la evaluación de la capacidad de los explantes para inducir callos en los diversos tratamientos, se escogió la mejor combinación “explante-medio de cultivo” con base en el mayor número y velocidad de generación de callos embriogénicos.

Todos esos cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad y de temperatura entre 25 y 26°C.

## II- REGENERACIÓN PLANTAS

La capacidad morfogénica de los callos embriogénicos se evaluó en términos de su habilidad para la neoformación de plántulas. En este sentido, los tratamientos incluyeron modificaciones en la formulación del medio de cultivo para regeneración tales como:

i) aumento en la concentración de citoquininas en el medio anteriormente seleccionado para callogénesis, ii) cultivo en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento y iii) cultivo en alternancia de luz y oscuridad ( fotoperíodo 12 horas, 2.000 Lux) y temperatura entre 25 y 26°C.

### III- ESTUDIO DE PRESENCIA DEL POLISACÁRIDO ACEMANNAN EN LOS CULTIVOS CELULARES ESTABLECIDOS

Una vez establecidos los cultivos celulares en medio líquido, se procedió a seleccionar y a mantener las diversas líneas celulares con el fin de evaluar su capacidad para la producción de metabolitos de interés farmacológico.

La presencia de compuestos tales como Acemannan se evaluó mediante el uso de técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con los parámetros establecidos en la literatura (Okamura *et al.* 1996) para la detección de compuestos de interés farmacológico.

Se evaluaron de forma preliminar, los tejidos generados con el fin de detectar otros compuestos de interés farmacológico tales como antraquinonas, haciendo de uso de los protocolos establecidos por Verpoorte *et al.* (1999) y Wagner y Bladt (1996) a través de técnicas de cromatografía de capa fina (TLC).

### IV- ANÁLISIS MOLECULARES DE ADN EN ESPECIES DEL GÉNERO *ALOE* PRESENTES EN EL PAÍS

Este estudio comprendió la búsqueda de información escrita en las instituciones encargadas de la recolección e identificación de especies presentes en el país como son: el Instituto Nacional de Biodiversidad (Inbio), el Herbario Nacional y el Herbario de Plantas de la Universidad de Costa Rica.

De forma periódica se realizó la búsqueda y colecta de material vegetal, que posteriormente se preparó para su identificación en el herbario. Este trabajo se realizó con la ayuda de expertos reconocidos en el país, de literatura correspondiente y del criterio taxonómico de entidades internacionales (Jardines Botánicos y Universidades).

Los análisis moleculares se realizaron siguiendo el siguiente procedimiento:

Se utilizaron protocolos de extracción de ADN reportados en la literatura (Mohamad *et al.* 1994). De la misma forma se utilizaron protocolos para la amplificación al azar de ADN polimórfico descritos por Harris (1998), Caetano-Anollés y Gresshoff (1997). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se llevaron a cabo en un termociclador (*RapidCycler*) de enfriamiento por aire de la marca IDAHO TECHNOLOGY. Los imprimadores ("primers") utilizados para la amplificación al azar de los fragmentos de ADN vegetal fueron de la casa Operón, con los códigos OPK del 1 al 19. Se trabajó con enzima "taq" polimerasa de la casa PROMEGA. Los electroforegramas se realizaron utilizando geles de agarosa (SIGMA) al 1,5% para la migración de los productos de PCR.

## REFERENCIAS

- Azghani A.O, Williams, I., Holiday, D.B; Johnson, A.R. 1995. A beta-linked mannan inhibits adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human lung epithelial cells. *Glycobiology* 5: 39-44.
- Byeon SW, Pelley RP, Ullrich SE, Waller TA, Bucana CD y Strickland FM. 1998. *Aloe barbadensis* extracts reduce the production of interleukin-10 after exposure to ultraviolet radiation. *Journal of Investigative Dermatology* 110 (5): 811-817.
- Caetano-Anollés y Gresshoff P 1997. DNA Markers. Protocols, Applications and overviews. Wiley-Liss Inc. USA. Pp 364.
- Carlson J., Tulsieram L., Glaubitz J.C., Luk V., Kauffeldt C. y Rutledge R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194-200.
- Castronera-Sánchez I, Natali L. y Cavallini A. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis*, Mill. Morphogenetic ability and nuclear DNA content. *Plant-Science,-Irish-Republic.*, 55: (1) 53-59.
- Cavallini A., Natali L., Cionini G., Sassoli O. y Castorena-Sanchez I. 1993 *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Quantitative DNA variations in regenerated plants. *Plant-Science* 91 (2): 223-229.
- Chinnah A.D., Baig M., Tizard I.R., Kemp M.C. 1992. Antigen-dependt adyuvant activity of a polydispersed  $\beta$ -(1-4) linked acetylated mannan. *Vaccine* 10: 551-558.
- Compton M. E. 1994. Stadistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 217 -242.
- Corneanu M., Corneanu G., Badica C., Minea R., Bica D. y Vekas L. 1994. *In vitro* organogenesis at *Aloe arborescens* (Liliaceae). *Revue Roumaine de Biologie. Serie de Biologie Vegetale.* 39 (1):45-52.
- Egger S., Brown G.S, Kelsey L.S., Yates K.M., Rosenberg L.J., Talmadge J.E. 1996. Studies on optimal dose and administration schedule of a hematopoietic stimulatory  $\beta$ -(1-4) linked acetylated mannan. *International Journal of Immunopharmacology* 43: 195-205.
- Erllich H. 1989. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press. New York. USA.
- Fahim M.S. y Wang M. 1996. Zinc acetate and lyophilized *Aloe barbadensis* as vaginal contraceptive. *Contraception-Stoneham* 53(4): 231-236

- Fernández G.C 1992. Residual analysis and data transformations: Important tools in statistical analysis. *HortScience*. 27(4): 297-300.
- Fogleman R.W., Shellenberger T.E., Balmer M.F., Carpenter R.H., McAnalley B.H. 1992<sup>a</sup>. Subchronic oral administration of Acemannan in the rat and dog. *Veterinary and Human Toxicology* 34: 144-147.
- Fogleman R.W., Chapdelaine J.M., Carpenter R.H., McAnalley B.H. 1992<sup>b</sup>. Toxicology evaluation of injectable Acemannan in the mouse, rat and dog. *Veterinary and Human Toxicology* 34: 201-205.
- Garuda International, Inc. 1999.  
[www.garudaint.com/www.milkcalcium.com/dtvaloc1.htm](http://www.garudaint.com/www.milkcalcium.com/dtvaloc1.htm)
- Gjerstad G. 1971. Chemical studies of *Aloe vera* juice-1: amino acid analysis. *Advancing Frontiers of Plant Sciences* 28: 311-315.
- Granados-Sanchez D. y Castañeda-Perez A.D. 1988. SÁBILA, *Aloe barbadensis* Mill. Planta agroindustrial (medicinal) del desierto. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. México. Pp 50.
- Green P. 1996. *Aloe vera* extracts in equine clinical practice. *Veterinary Times* 26: 16-18.
- Grindlay D. y Reynolds T. 1986 The *Aloe vera* phenomenon : A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117-151.
- Groenewald E., Koeleman A. y Wessels D. 1975. Callus formation and plant regeneration from seed tissue of *Aloe pretorensis*, Pole Evans. *Z. Pflanzenphysiologie* 75: 270-272
- Gui YL., Xu T.Y., Gu S.R., Liu S.Q., Zhang Z., Sun G.D. y Zhang Q. 1990. Studies on stem tissue culture and organogenesis of *Aloe vera*. *Acta-Botanica-Sinica*. 32 (8): 606-610
- Hadrys H., Ballick M. y Schierwater B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1, 55-63.
- Hart-LA; Berg-AJJ-van-den; Kuis-L; Dijk-H-van; Labadie-RP; Van-den-Berg-AJJ; Van-Dijk-H 1989. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. *Planta-Medica*. 55(6): 509-512.
- Harris C., Pierce K., King G., Yates K.M., Hall J. y Tizzard I. 1991. Efficacy of Acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Molecular Biotherapy* 3: 207-213.

- Harris E.** 1998. A Low-Cost Approach to PCR. Appropiate transfer of biomolecular techniques. Oxford University Press. New York
- Hirimburegama-K., Gamage-N.** 1995. *In vitro* multiplication of *Aloe vera* meristem tips for mass propagation. Horticultural-Science 27 (3-4): 15-18.
- Hutte J.A., Salman M., Stavinoha W., Satsangi N., Williams R., Streeper R. y Weintraub ST.** 1996. Antiinflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. Journal of Natural Products 59(5): 541-543.
- Jiménez-Magallanes L., Sumano-López H. y Mateos-Trigos G.** 1995. Uso de Sábila (*Aloe vera*) para el tratamiento de laceraciones y grietas en tetas de vacas lecheras. Veterinaria Mexicana. 26 (3): 271-272
- Kahlon J., Kemp M.C.X., Carpenter R.H., Shannon W.M. y McAnalley B.H.**1991a. Inhibition of AIDS virus replication by Acemannan in vitro. Molecular Biotherapy 3: 127-135.
- Kahlon J., Kemp M.C.X., Yawei N., Carpenter R.H., Shannon W.M., McAnalley B.H.**1991b. In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir. Molecular Biotherapy 3: 214-223
- Keijzer C. y Cresti M.** 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. Annals of Botany 59: 533-542.
- Kemp M.C., Kahlon J., Chinnah, A.D., Carpenter R.H., McAnalley B.H., McDaniel H.R, Shannon W.M** 1990. *In vitro* evaluation of the antiviral effects of acemannan on the replication and pathogenesis of HIV-1 and other enveloped viruses: modification of the processing of glyco-protein precursors. Antiviral Research 13: 83-88
- King G.K, Yates K.M., Greenlee P.G., Pierce K.R., Ford C.R., McAnalley B.H., Tizzard I.R.** 1995. The effect of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. Journal of the American Animal Hospital Association 31: 439-447.
- Koo MWL.** 1994. *Aloe vera*: anti-ulcer and anti-diabetic effects. Phytotherapy Research. 8 (8): 461-464.
- Lindblad W. y Thul J.** 1994. Sustained increase in collagen biosynthesis in acemannan impregnated PVA implants in the rat. Wound Repair and Regeneration 2: 84.
- Litz R.E. y Jarret R.L.** 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali, Colombia. Cap. 7, p.143.

- Lynch M. y Milligan B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mandal G. y Das A. 1980. Structure of the D-galactan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research* 86: 247-257.
- Marshall G.D y Druck J.P. 1993. In vitro stimulation of NK activity by acemannan. *Journal of Immunology* 150: 241A.
- Marshall G.D., Gibbons A.S. y Parnell L.S. 1993. Human cytokines induced by acemannan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 91: 295.
- McAnalley B.H, McDaniel H.R, y Carpenter R.H. 1988. Demonstration of in vitro antiviral action of acemannan (ACE-M) against multiple viruses including the HIV virus. *Proceedings of the IV International Conference on AIDS 1988*. 158.
- McAnalley B.H. 1988. Process for preparation of aloe products, produced thereby and composition thereof. United States Patent. N° 4, 917890
- McDaniel H.R. Perkins S. y McAnalley B.H. 1987. A clinical pilot study using Carrisyn™ (*Aloe vera* concentrate) treatment of AIDS patients. *American Journal of Clinical Pathology* 88: 534.
- McDaniel H.R y McAnalley B.H. 1987. Evaluation of poymannoacetate (Carrasyn™) in the treatment of aquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clinical Research* 35: 483a
- Meyer H. y Van Staden J. 1991 Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 26 (3): 167-171.
- Miller M.B. y Koltai P.J. 1995. Treatment of experimental frostbite with penoxifylline and *Aloe vera* cream. *Archives of Otolaryngology. Head and Neck Surgery* 121(6): 678-680.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Natali L., Castorena-Sanchez I. y Cavallini A. 1990 In vitro culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 71-74.
- Nordgren R.M., Stewart-Brown B., Rodeberg J.H. 1992. The role of acemannan as an adjuvant for Marek's disease vaccine. *Proceedings of the XIX World's poultry Congress* 165-169

- Okamura N., Asai M., Hine N. y Yagi A.** 1997. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in *Aloe* species. *Journal of Chromatography* 746 (2): 225-231.
- Farman N., Tariq M., Al-Yahya M., Ageel A., Al-Said M.** 1986. Evaluation of *Aloe vera* leaf exudate and gel for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Fitoterapia* 57 (5): 380-383.
- Peng S.Y., Norman J., Curtin G., Corrier D., Mcdaniel H.R, y Busbee D.** 1991. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator Acemannan. *Molecular Biotherapy* 3: 79-87.
- Plemmons J.N., Rees T.D., Binnie W.H., Wrigth J.M., Guo I. Hall J.E.** 1994. Evaluation of Acemannan in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Wounds* 6: 40-45.
- chi M.** 1988. Using in vitro culture to study the biosynthesis of secondary products in *Aloe ferox*. *Rivista-di-Agricoltura Subtropicale- e-Tropicale* 82 (4): 707-714.
- Rafalski A.** 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In *DNA markers. Protocols, applications and overviews*. Editado por. Caetano-Anollés G. y Gresshoff P. Wiley-Liss Inc. New York. Pp 363.
- Reynolds T. y Dweck A.C.** 1999. *Aloe vera* leaf gel: A Review Update. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 3-37.
- Richwine A., Tipton J., Thompson G.** 1995. Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. *HortScience* 30 (7): 1443-1444.
- Roberts D.B. y Travis E.L.** 1995. Acemannan containing wound dressing gel reduces radiation induced skin reaction in C-H mice. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 32: 1047-1052.
- Roy S.C. y Sarkar A.** 1991. *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia-Horticulturae* 47 (1-2): 107-113
- Saks Y. y Barkaigolan R.** 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology & Technology* 6 (1-2): 159-165.
- Saleem R., Faizi S., Deeba F., Shaheen B. and Husain M.** 1997. Anthrones from *Aloe barbadensis*. *Phytochemistry* 45 (6): 1279-1282
- Shoos M.A., Unger B.A., Giggelman G.F., Tizzard I.R.** 1991. Studies of the effect of Acemannan on retrovirus onfections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Molecular Biotherapy* 3: 41-45

- Speranza G., Fontana G., Zanzola S. y Di Meo A. 1997. Studies on Aloe. 15. Two new 5-methylchromones from cape Aloe. *Journal of Natural Products* 60 (7): 692-694.
- Teng W.L., Lin C.P y Liu Y.J. 1993 Regenerating lettuce from suspension culture in a 2-liter Bioreactor. *HortScience* 28 (6): 669-671.
- Texas A & M Bioinformatics Working Group. Flowering Plant Gateway. 2004.  
[www.csdl.tamu.edu/FLORA/newgate/cronang.htm](http://www.csdl.tamu.edu/FLORA/newgate/cronang.htm)
- Tizard I., Busbee D., Maxwell B., Kemp M.C. 1994. Effects of Acemannan, a complex carbohydrate, on wound healing in young and aged rats. *Wounds* 6: 201-209.
- Udupa S.L., Udupa A.L. y Kulkarni D.R 1994. Anti-inflammatory and wound healing properties of Aloe vera. *Fitoterapia* 65 (2): 141-145.
- Valdez M., Garro G., Espinoza A. M. 1997. Establishment of morphogenic rice cell suspension cultures (*Oryza sativa*) in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 44 (3) / 45 (1): 593-595.
- Verpoorte R., Van der Heijden R., Hoopen H. y Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21: 467-479.
- Vij S.P., Sharma M. and Toor I.S. 1980. Cytogenetical investigations into some garden ornamentals II. The genus *Aloe* L. *Cytologia* 45: 515-532.
- Wagner H. y Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas.* Second Edition. Springer. Germany.
- Waller T., Jia Q., Padmapriya A. 1997. Purification of Cinnamoyl-C-glycoside chromone. United States Patent. N° 5,675,000.
- Watson J., Hopkins N., Roberts J., Steitz J.A. y Weiner A. 1988. *Molecular biology of the gen.* Editorial Benjamin Cummings Inc. Curta edición. California.USA.
- Weiserma J. 1998. USDA.ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm Resources laboratory, Beltsville, Maryland.  
[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41)
- Williams M.S., Burk M., Loprinzi C., y Shomberg P.J. 1996. Phase III double blind evaluation of an *Aloe vera* gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 36: 345-349

- Womble D. and Helderman J.H. 1988. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by Acemannan (Carrisyn <sup>TM</sup>). *International Journal Of Immunopharmacology* 10: 967-974.
- Yagi A., Egusa T., Arase M., Tanabe M., Tsuji H. 1997. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from *Aloe vera* gel. *Planta Medica* 63: 18-21.
- Yamaguchi I., Mega N., Sanada H. 1993. Components of the gel *Aloe vera* (L.) Burm.f. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 57: 1350-1352.
- Yates K.M, Rosenberg L.J., Harris C.K., Bronstad D.C., King G.K., Biehle G.A., Walker B., Ford C.R., Hall J.E., Tizard I.R. 1992. Pilot study of the effect of Acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 35: 177-189.

**TEMA 1:**

**Callogénesis somática en *Aloe barbadensis*, Miller.**

**(Aloaceae)**

## Callogénesis somática en *Aloe barbadensis*, Miller.

(Aloaceae)

Garro Giovanni<sup>1</sup> y Valdez Marta<sup>1</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

[ggarro@itcr.ac.cr](mailto:ggarro@itcr.ac.cr), [mvaldez@biologia.ucr.ac.cr](mailto:mvaldez@biologia.ucr.ac.cr)

### RESUMEN

Diversos explantes tales como ovarios inmaduros, discos de rizoma y bases de hojas de plantas jóvenes, fueron evaluados durante la inducción de callogénesis en *A. barbadensis*. La desinfección del material para eliminar su contaminación endógena se llevó a cabo con la ayuda de un baño ultrasónico. Los segmentos de base de hoja provenientes de plantas jóvenes (2-3 meses) cultivadas bajo condiciones de invernadero fueron las que presentaron la mejor respuesta. Se evaluaron un total de 18 tratamientos en los cuales se realizaron diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-bencilaminopurina (BAP) y la adenina, adicionados al medio básico MS. La combinación con la que se obtuvo los mejores resultados en la inducción de callos fue el medio MS con 2,5 mg/L de 2,4-D, 2.0 mg/L de BAP junto a 80 mg/L de adenina como complemento. Esta combinación produjo un 28% de inducción de callos después de cuatro semanas de cultivo y un 89% de inducción después de catorce semanas de cultivo. También se escogió un medio apropiado para el mantenimiento de los callos obtenidos reduciendo la concentración de 2,4-D a 1.5 mg/L y de BAP a 1.0 mg/L. Para la regeneración de plantas se evaluaron diversos tratamientos con los cuales se lograron obtener algunas estructuras organogénicas. Sin embargo la producción de embriones somáticos no fue observada

bajo las condiciones evaluadas. Este procedimiento, sin embargo, podría permitir la ejecución de estudios futuros tanto para la inducción de embriogénesis somática, así como para el estudio y extracción de compuestos con actividad farmacológica en esta especie.

**Palabras clave:** callogénesis somática, *Aloe barbadensis*, cultivo *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

*Aloe barbadensis* (Miller), es la especie mejor conocida del género. Su clasificación taxonómica ha sido objeto de controversia por lo que se le conoce también como *Aloe vera* L. (Grindlay y Reynolds 1986), y actualmente se le incluye dentro de la familia Aloaceae (Weiserma 1998). Sus propiedades farmacológicas han sido conocidas empíricamente desde tiempos antiguos. Las células del parénquima de las hojas contienen varios compuestos de uso medicinal, cuyos principios activos han sido utilizados en la fabricación de numerosos productos comerciales, tanto médicos como cosméticos. Recientemente, numerosos estudios han asociado la planta con: i) actividad antimicótica (Saks y Barkaigolan 1995); ii) cicatrización de heridas (Jiménez-Magallanes *et al.* 1995); iii) curación de problemas gástricos (Parmar *et al.* 1986) ; iv) propiedades anti-inflamatorias (Grindlay y Reynolds 1986, Udupa *et al.* 1994, Hutter *et al.* 1996).

Por su importancia comercial, la planta ha sido cultivada principalmente de forma vegetativa, esto debido a su casi inexistente reproducción de tipo sexual y por la ventaja que ofrece la reproducción asexual en términos de homogeneidad genética. Sin embargo dentro del género *Aloe* se han estudiado varios sistemas de cultivo *in vitro* en especies como *A. ferox*, *A. petrorensis*, *A. arborescens* y *A. ciliaris*, orientados al establecimiento

de organogénesis somática (Gui *et al.* 1990, Comeanu *et al.* 1994), a la formación de callos (Groenewald *et al.* 1975, Racchi 1988), al cultivo de anteras (Keijzer y Cresti 1987), así como al cultivo *in vitro* para el estudio de metabolitos secundarios de interés farmacológico (Racchi 1988).

Los compuestos de interés farmacológico podrían ser extraídos de manera más eficiente utilizando metodologías de cultivo *in vitro*, los cuales permiten mejores condiciones de asepsia y homogeneidad química de los compuestos. Los principales sistemas utilizados han sido la callogénesis somática y el cultivo de células en suspensión.

Hasta el momento, los estudios han aportado algunos resultados importantes en cuanto a la micropropagación masiva, sin embargo, en cuanto a la inducción de callogénesis somática aún no hay resultados satisfactorios dentro de la especie *A. barbadensis*.

Algunos trabajos que han informado del cultivo *in vitro* de *A. barbadensis* utilizando técnicas *in vitro* mediante organogénesis somática han hecho uso de diversos explantes tales como: i) meristemos apicales (Natali *et al.* 1990, Meyer y Van Staden 1991, Richwine *et al.* 1995, Hirimburegama y Gamage 1995), ii) anteras (Keijzer y Cresti 1987), iii) bases de hojas (Cavallini *et al.* 1993) y iv) meristemos radicales (Roy y Sarkar 1991).

Aún cuando ha sido posible la regeneración de plantas *in vitro* por medio de sistemas de organogénesis, la especie ha mostrado ser bastante recalcitrante para el desarrollo de sistemas de embriogénesis somática. Contrario a lo encontrado en la literatura (Gui *et al.* 1990, Groenewald *et al.* 1975) para otras especies relacionadas (*A. ferox* y *A. petrorensis*), *A. barbadensis* sólo ha presentado formación de callos morfogénicos en los estudios realizados por Castronera-Sánchez *et al.* (1988) y Cavallini *et al.* (1993).

Los sistemas de cultivo *in vitro* desarrollados para *A. barbadensis* Mill. han resultado ser de interés, en cuanto al potencial de micropropagación masiva, y para evitar los problemas generados con la baja tasa de reproducción sexual presentada por la especie.

No obstante, el establecimiento de un sistema de callogénesis somática o cultivo de células en suspensión para la especie, vendría a ser de mayor provecho no sólo en cuanto a la micropropagación masiva, sino también en cuanto a la selección de líneas “élite” dentro de las poblaciones *in vitro*, así como para el estudio de aspectos fundamentales de la constitución genética de la especie. En este trabajo se realizará el establecimiento del sistema de callogénesis somática e inducción de regeneración en explantes de hoja de *A. barbadensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de material vegetal

El material vegetal se obtuvo por donación de la empresa Carrington Laboratories Inc. (Planta Sábila Industrial, Guanacaste). Las plantas se colectaron en el campo y posteriormente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) para cultivarlas en condiciones de invernadero.

### Explantos evaluados

En una primera etapa se trabajó con diversos explantes tales como a) inflorescencias y flores inmaduras, b) discos de rizoma, c) primordios foliares y d) bases de hoja de plantas jóvenes (2-4 meses de edad) (Figs. 1 y 2). Las hojas utilizadas corresponden a las cinco hojas más internas y más jóvenes de la planta. De la base de las hojas juveniles (Fig.2), se disectaron fragmentos entre 1 cm y 3 cm de longitud.

### Desinfección de los explantes

Los explantes se colocaron en recipientes de vidrio en una solución de hipoclorito de sodio al 4,25% y se mantuvieron en un baño ultrasónico por un período de 5 minutos, lo cual facilita la penetración del desinfectante en los tejidos. Luego de la desinfección, se

coloca el recipiente que contiene los explantes, en una cámara de flujo laminar y se lavaron con agua destilada estéril tres veces hasta eliminar completamente la solución de hipoclorito de sodio de su superficie. Luego de esto, los explantes se mantuvieron en solución de etanol 70% por un minuto. Luego se lavaron nuevamente con agua destilada y autoclavada por tres veces.

#### **Inducción de callogénesis**

Se utilizó un primer medio de cultivo semi-sólido modificado a partir del medio básico establecido por Murashige y Skoog (1962) con tiamina 0.5 mg/L como vitamina y con los siguientes reguladores de crecimiento: 2,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2.0 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP) y 40 mg/L de adenina. Se agregó Phytigel® como agente gelificante al 3 % y sacarosa al 4%. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad, a una temperatura de 24 - 25 grados celsius.

#### **Mantenimiento de callos**

Los callos inducidos después de 8 semanas de cultivo (Fig.5), se transfirieron a un segundo medio de cultivo semi-sólido modificado a partir del medio básico establecido por Murashige y Skoog (1962) que contiene tiamina 0.5 mg/L como vitamina y los siguientes reguladores de crecimiento: 1,5 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 1.0 mg/L de BAP (6-Benzilaminopurina) y 80 mg/L de adenina. La selección de estos medios se llevó a cabo según lo informado por Castronera-Sánchez *et al.* (1988) y Cavallini *et al.*(1993). Se agregó un agente gelificante al 0.3 % y sacarosa al 4%. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 24-25 grados celsius. La medición del crecimiento de los callos se realizó tomando muestras de callos y colocándolas sobre papel cuadriculado milimétrico y midiendo su área en un plano. Las mediciones se realizaron por espacio de dos semanas con 10 muestras de

callo. A partir de esas mediciones, al final del período se sacó un promedio del crecimiento observado en cada muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

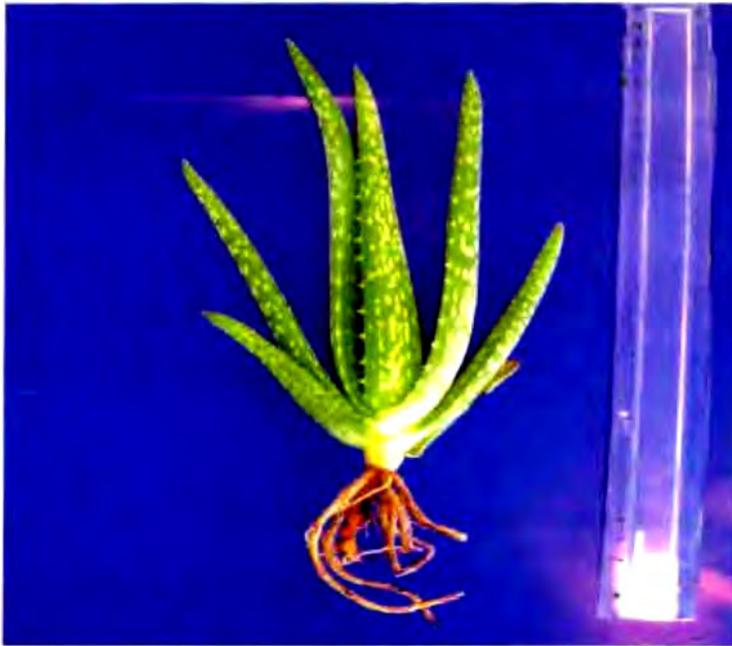
### 1. Escogencia del explante con mayor capacidad en la formación de callos

Los explantes fueron evaluados para su respuesta a la formación de callos, cultivándolos en dos diferentes medios de cultivo que tienen como base el medio MS complementado con 2 diferentes reguladores de crecimiento: MS-01 (2,4-D 0,25 mg/L, Kinetina 1,0 mg/L), MS-02 (2,4-D 1,0 mg/l, kinetina 0,25 mg/L) y utilizando el medio MS sin reguladores de crecimiento como control (MS-00). Los resultados de este experimento se muestran en el cuadro 1.

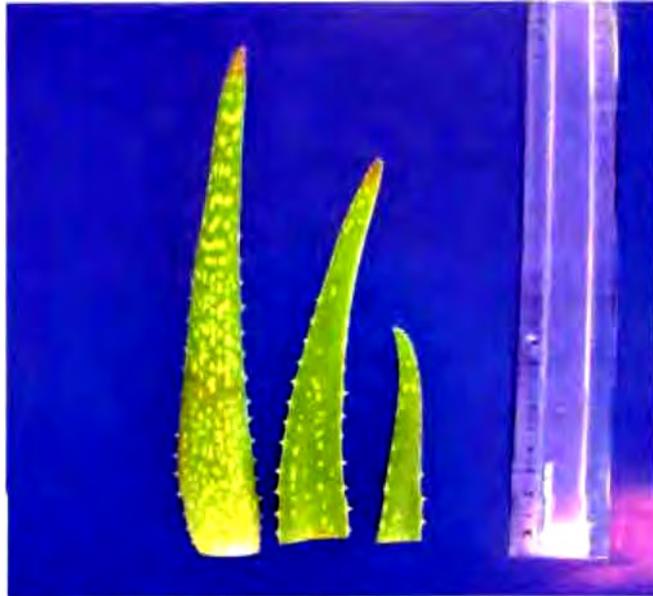
**Cuadro 1.** Respuesta de inducción de callos a las cuatro semanas de cultivo, mostrada por diferentes explantes de *A. barbadensis* al utilizar dos medios de cultivo (MS-01 y MS-02) con reguladores de crecimiento y un medio (MS) sin reguladores de crecimiento como control.

<b>Explante</b>	<b>MS-01</b>	<b>MS -02</b>	<b>MS-00</b>
<b>Inflorescencias inmaduras</b>	n=15 0 %	n=15 0 %	n=10 0 %
<b>Flores inmaduras</b>	n=40 0 %	n=40 0 %	n=30 0 %
<b>Ovarios maduros</b>	n=55 0 %	n=50 0 %	n=50 0 %
<b>Discos de rizoma</b>	n=30 0 %	n=30 0 %	n=30 0 %
<b>Apices de primordios foliares</b>	n=14 21 %	n=12 17 %	n=12 0 %
<b>Bases de hojas</b>	n=16 75 %	n=15 13 %	n=10 0 %

Los resultados del Cuadro 1 muestran que el explante con mejor respuesta a la inducción de callos es la base de hojas proveniente de plantas jóvenes (fig 3). Este explante fue escogido no solo con base en su respuesta alta en la formación de callo (75%) sino también a las características del callo formado que resultó más compacto y de coloración “blancuzca”.



**Figura 1.** Plantas de de *A barbadensis* 4 meses de edad cultivadas en invernadero y utilizadas en los experimentos de inducción de callogénesis.



**Figura 2.** Hojas jóvenes a las cuales se les ha extraído la parte basal para ser utilizada como explante.

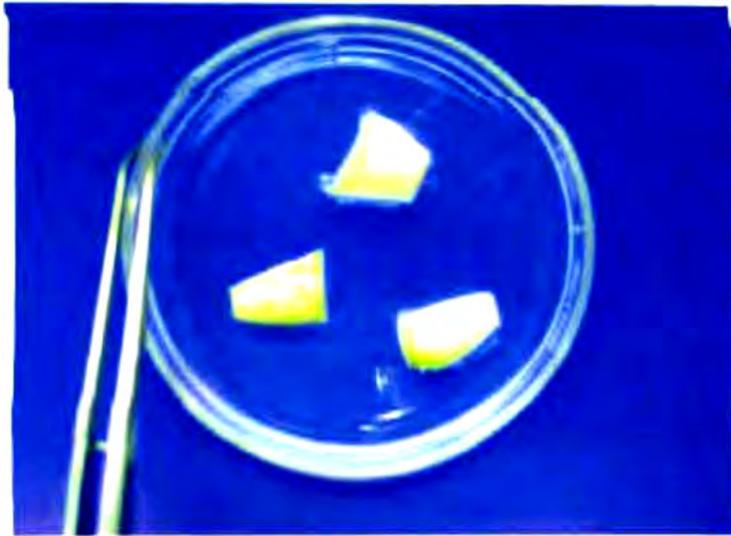
## **2. Escogencia del protocolo de desinfección de explantes de *A. barbadensis***

Debido a la alta contaminación endógena presentada por los explantes del material obtenido, se evaluaron varios protocolos de desinfección recomendados en la literatura (Natali *et al.* 1990, Meyer y Van Staden 1991, Richwine 1995, Hirimburegama y Gamage 1995, Keijzer y Cresti 1987, Cavallini *et al.* 1993) sin embargo, fue necesario incluir variaciones debido a que los porcentajes de contaminación obtenidos con estos protocolos no fueron apropiados. La inclusión del uso de un baño ultrasónico permitió contar con un protocolo adecuado en la desinfección de los explantes utilizados, según se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Desinfección de explantes de *A. barbadensis* con una solución de hipoclorito de sodio al 4% y baño ultrasónico en diversos tiempos (minutos) de exposición. Los resultados corresponden a tres experimentos en los que se utilizaron un total de 164 explantes y se evaluaron a los 8 días después del tratamiento de desinfección.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo de sonicación Minutos</b>	<b>Total Explantes Desinfectados</b>	<b>% Explantes Vivos, no contaminados posterior a desinfección</b>	<b>% Total de contaminación</b>
<b>01</b>	2	34	67	32
<b>02</b>	3	34	67	32
<b>03</b>	4	34	73	29
<b>04</b>	5	34	85	15
<b>05</b>	10	14	43	0
<b>06</b>	15	14	27	0

El tratamiento que logró disminuir la contaminación en porcentajes aceptables (15 %) y además permitir la mayor sobrevivencia de los explantes (85 %) fue el tratamiento 04.



**Figura 3.** Explantes (base de hojas) utilizados en la inducción de callos somáticos de *A. barbadensis*



**Figura 4.** Callos somáticos originados en la epidermis de los explantes de *A. barbadensis*, después de 4 semanas de cultivo en medio de inducción de callogénesis

**3. Escogencia de un medio de cultivo semi-sólido adecuado para la inducción de callos somáticos de *A. barbadensis*, a partir del explante de base de hojas seleccionado previamente.**

Se realizaron 18 tratamientos (cuadro 3) diferentes en los cuales se combinaron los reguladores de crecimiento junto con el medio base MS con el fin de encontrar la mejor combinación, en la cual se diera la inducción de callogénesis en porcentajes más altos y en el menor período de tiempo. Se utilizaron explantes provenientes de plantas *A. barbadensis* cultivadas en condiciones de invernadero (fig 1). Los explantes (entre 1-2 cm) fueron extraídos de las hojas más jóvenes de las plantas (fig 2). El medio base MS fue complementado con 0,5 mg/L de tiamina, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de myo-inositol y 3 g/L de "Phytigel" como gelificante. El pH fue ajustado a 5.8. En cada tratamiento se utilizó 16 explantes en placas de Petri a razón de 2 explantes por placa. La evaluación de la respuesta de callogénesis en los 18 tratamientos se realizó durante un período 14 semanas de subcultivo, con evaluaciones cada 4 o 5 semanas, después de la siembra de los explantes (Fig 4). Estos resultados se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 3.** Tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, utilizados en la inducción de callogénesis a partir de explantes de base de hoja de *A. barbadensis*.

Tratamiento	2,4-D mg/L	BAP mg/L	Adenina mg/L
1	1.5	1.0	40
2	2.0	1.0	40
3	2.5	1.0	40
4	1.5	1.0	80
5	2.0	1.0	80
6	2.5	1.0	80
7	1.5	1.5	40
8	2.0	1.5	40
9	2.5	1.5	40
10	1.5	1.5	80
11	2.0	1.5	80
12	2.5	1.5	80
13	1.5	2.0	40
14	2.0	2.0	40
15	2.5	2.0	40
16	1.5	2.0	80
17	2.0	2.0	80
18	2.5	2.0	80

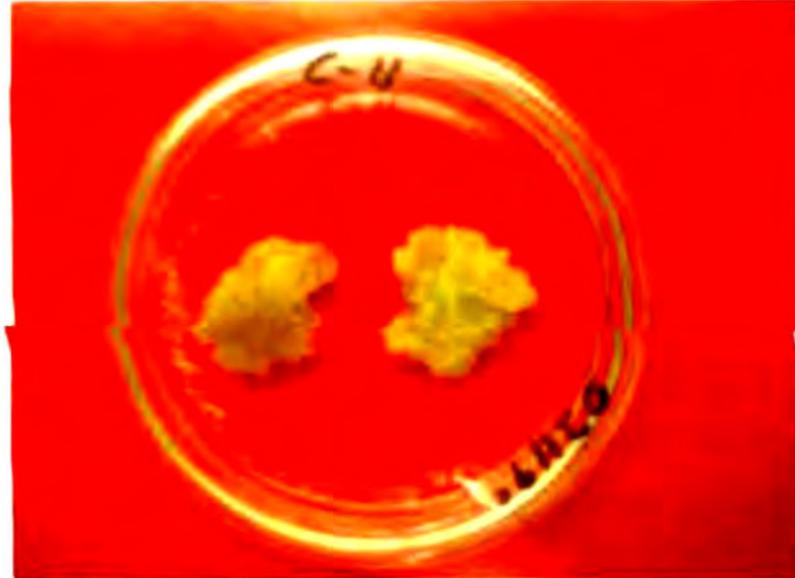
**Cuadro 4.** Respuesta de inducción de calogénesis (%) en explantes provenientes de base de hoja (1-2 cm) extraídos de plantas jóvenes de *A. barbadensis*. Durante un período de 14 semanas y en 18 tratamientos diferentes.

Tratamiento	1 Evaluación 4 semanas	2 Evaluación 6 semanas	3 Evaluación 12 semanas	4 Evaluación 14 semanas
1	n=45 0	0	40	87
2-	n=45 0	13	55	74
3-	n=45 0	0	22	55
4-	n=45 3,4	3,0	10	25
5-	n=51 0	0	27	58
6-	n=45 0	0	10	46
7-	n=45 0	0	13	13
8-	n=45 3	10	42	61
9-	n=45 5	7	20	33
10-	n=45 4,6	7,4	29,6	41,7
11-	n=45 3	3,2	29	43
12-	n=45 0	0	17	47,6
13-	n=45 0	6,6	25	71
14-	n=45 5,1	12	33	65
15-	n=45 28	44	47	89
16-	n=45 0	0	13	20
17-	n=45 9,5	20	45	50
18-	n=45 0	0	13	33

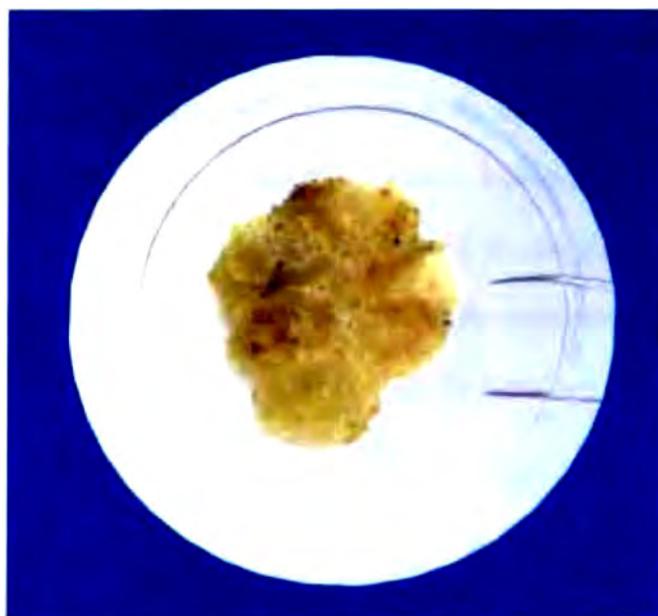
El cuadro 4, muestra que el mejor tratamiento para la inducción temprana de calogénesis y con el porcentaje mayor a través del tiempo es el tratamiento 15. En este tratamiento se obtiene 28 % de callos a las cuatro semanas de cultivo y el porcentaje se incrementa hasta 89 % después de las 14 semanas. Los callos generados con este tratamiento se presentan en la Fig. 4.

#### **4. Selección un medio de cultivo semi-sólido para el mantenimiento de callos somáticos provenientes de explantes de *A. barbadensis*.**

Tomando en cuenta los niveles de reguladores de crecimiento requeridos para la inducción de callos somáticos en los explantes de *A. barbadensis* (cuadro 4), se elaboró un medio de mantenimiento con la cantidad de reguladores de crecimiento reducida en un 50%, lo cual significó utilizar 1.5 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de BAP. Además, la concentración de sacarosa fue aumentada a 40 g/L, con el objetivo de proveer una mayor disponibilidad de azúcares y provocar un estrés osmótico que facilite la neoformación de estructuras embriogénicas (Endress 1994). Las figuras 5 y 6 muestran los callos obtenidos luego de 8 y 12 semanas de cultivo respectivamente en medio de mantenimiento de callos.



**Figura 5.** Callos somáticos inducidos en explantes extraídos de la base de hojas de *A. barbadensis*, después de 8 semanas de cultivo en medio de inducción de callogénesis.



**Figura 6.** Callo somático de *A. barbadensis* luego de 12 de semanas de cultivo, 8 en medio de inducción y 4 en medio de mantenimiento.

El medio de cultivo para el mantenimiento de los callos es un MS suplementado con 1.5 mg/L de 2,4-D, 1.0 mg/L de BAP y 80 mg/L de sulfato de adenina. Con este medio se pudo observar un crecimiento aceptable de los callos (aprox. 0,1 cm<sup>3</sup> /día) y un nivel de oxidación bajo en la superficie de los callos.

Estos resultados de callogénesis aportan información valiosa ya que son un primer informe sobre el establecimiento del sistema para la especie *A. barbadensis*. Debido a la importancia económica que representa la especie en términos de compuestos de actividad farmacológica, este sistema puede permitir la evaluación y estudio de los principales compuestos activos de la planta en sistemas *in vitro*, así como su producción a gran escala por medio de la implementación de sistemas de cultivo en masa de callos.

##### **5. Inducción de embriogénesis somática en callos de *A. barbadensis***

La inducción de regeneración en callos de *A. barbadensis* se llevó a cabo por medio del uso de diversos medios de regeneración reportados en la literatura (Groenenwald *et al.* 1975, Racchi 1988) y por algunas variaciones hechas al medio de mantenimiento de callogénesis, establecido en este trabajo. Con los callos generados a partir de explantes foliares (bases de hoja), se iniciaron los experimentos de regeneración. Se examinaron cuatro medios semi-sólidos de regeneración. El medio básico utilizado, fue un MS, suplementado con varias combinaciones de reguladores de crecimiento y de aditivos orgánicos. El cuadro 4 muestra la composición química de estos medios de cultivo. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones de 12 horas de fotoperíodo, a una intensidad de 2000 lux, y a una temperatura de 25 °C.

**Cuadro 5.** Composición química de los medios de cultivo utilizados para examinar la regeneración de plantas de *A. barbadensis*. Los medios se basan en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Compuesto	Medio R-01	Medio R-02	Medio R-03	Medio R-04
Tiamina	20 mg/L	10 mg/L	10 mg/L	5,0 mg/L
Glicina	20 mg/L	2,0 mg/L	---	---
Cisteína	40 mg/L	10 mg/L	---	---
Caseína Hidrolizada	200 mg/L	200 mg/L	---	400 mg/L
Extracto de malta	800 mg/L	---	---	200 mg/L
Acido nicotínico	---	1,0 mg/L	---	
Piridoxina	---	1,0 mg/L	---	
2,4 D	1,0 mg/L	---	1,0 mg/L	
BAP	4,0 mg/L	4,0 mg/L	4,0 mg/L	4,0 mg/L
Mio-inositol	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	
Sulfato de adenina	60 mg/L	60 mg/L	---	
Sacarosa	30 g/L	40 g/L	40 g/L	40 g/L
Phytigel®	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L
pH	5,6	5,6	5,6	5,6

Para cada medio de cultivo se sembraron 3 callos por placa, con un total de 10 placas por tratamiento. Estos se evaluaron cada cuatro semanas durante seis meses. En los tratamientos R2 y R4, se observó la generación de numerosos tricomas, que en varios casos pueden estar asociados con tejidos en regeneración como lo mostrado en la inducción de callos de arroz y de maíz, según lo informado por Valdez (Comunicación personal). Además, en los callos cultivados en el tratamiento 4 se observó la presencia de

zonas de coloración verdosa. No obstante, estas zonas no lograron regenerar brotes. Una explicación para este resultado negativo puede ser que este tipo de callos no logró generar embriones o estructuras organogénicas durante la callogénesis, que permitieran la formación ulterior de brotes. En conclusión, este tipo de explante (bases de hojas jóvenes), no parece tener capacidad regenerativa bajo estas condiciones de cultivo. La neoformación de estructuras embriogénicas ocurre en los primeros estadios de inducción de la callogénesis. Según Vasil y Thorpe (1994) hay tres factores primordiales en la inducción de la regeneración: i) altos niveles de auxinas, ii) bajos niveles de nitrógeno y iii) estrés osmótico facilitado por altos niveles de carbohidratos en el medio de cultivo. A pesar de que los niveles de auxina utilizados en la fase de inducción de callos fueron altos comparados con los usados por Natali *et al.* (1990), junto con los niveles de carbohidratos, parece ser que los niveles de nitrógeno en los medios utilizados deben ser estudiados con mayor detalle para determinar las combinaciones apropiadas que garanticen la formación de embriones somáticos en esta especie.

Por otro lado, la respuesta de regeneración pudo verse afectada por el tiempo prolongado de los callos en medios de mantenimiento (aprox. 5 meses) ya que se ha comprobado que con el tiempo la capacidad de regeneración puede disminuir, según lo encontrado por Gómez (1998) al trabajar en otros sistemas vegetales.

Experimentos posteriores a partir del sistema de callogénesis establecido, así como los medios de regeneración evaluados, podrían aportar datos que complementen el procedimiento adecuado para la regeneración de plantas *in vitro* de *A. barbadensis*.

## REFERENCIAS

- Castronera-Sanchez I., Natali L. y Cavallini A. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis*, Mill. Morphogenetic ability and nuclear DNA content. *Plant-Science* 55: (1)53-59.
- Cavallini A. Natali L., Cionini G., Sassoli O. y Castorena-Sanchez I. 1993 *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* mill.: Quantitative DNA variations in regenerated plants. *Plant-Science* 91: (2) 223-229.
- Corneanu M., Corneanu G., Badica C., Minea R., Bica D. y Vekas L. 1994. *In vitro* organogenesis at *Aloe arborescens* (Liliaceae). *Revue Roumaine de Biologie. Serie de Biologie Vegetale* 39 (1):45-52
- Endress R. 1994. *Plant cell biotechnology*. Springer-Verlag, Germany. Pp 353.
- Grindlay D. y Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon : A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117-151.
- Groenewald E. G., Koeleman A. y Wessels D.C.J. 1975. Callus formation and plant regeneration from seed tissue of *Aloe pretorensis*, Pole Evans. *Z. Pflanzenphysiology* 75: 270-272
- Gui Y.L., Xu T.Y., Gu S.R., Liu S.Q., Zhang Z., Sun G.D. y Zhang Q. 1990. Studies on stem tissue culture and organogenesis of *Aloe vera*. *Acta-Botanica-Sinica* 32 (8): 606-610.
- Hirimburegama K. y Gamage N. 1995. *In vitro* multiplication of *Aloe vera* meristem tips for mass propagation. *Horticultural-Science* 27 (3-4):15-18.
- Hutter J., Salman M., Stavinoha W., Satsangi N., Williams R., Ströeper R. y Weintraub S. 1996. Antiinflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products* 59(5): 541-543.
- Jiménez-Magallanes L., Sumano-López H. y Mateos-Trigos G. 1995. Uso de Sábila (*Aloe vera*) para el tratamiento de laceraciones y grietas en tetas de vacas lecheras. *Veterinaria Mexicana* 26 (3): 271-272

- Keijzer C. y Cresti M. 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. *Annals of Botany* 59: 533 – 542.
- Meyer H. y Van Staden J. 1991 Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 26 (3): 167-171.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Natali L., Castorena-Sanchez I. y Cavallini A. 1990. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 71-74.
- Parmar N., Tariq M., Al-Yahya M., Ageel A., Al-Said M. 1986. Evaluation of *Aloe vera* leaf exudate and gel for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Fitoterapia* 57 (5): 380-383.
- Pérez J.N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. Ediciones Geo. PP 390.
- Archí M. 1988. Using *in vitro* culture to study the biosynthesis of secondary products in *Aloe ferox*. *Rivista-di-Agricoltura Subtropicale- e-Tropicale* 82 (4): 707-714.
- Reynolds T. y Dweck A.C. 1999. Aloe vera leaf gel: areview update. *Journal of Ethnopharmacology* 68:3-37
- Richwine A.M., Tipton J.L. y Thompson G. 1995. Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. *HortScience* 30 (7): 1443-1444.
- Roy S., Sarkar A. 1991. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia-Horticulturae* 47 (1-2) 107-113
- Saks Y. Barkaigolan R. 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology & Technology* 6 (1-2):159-165.
- Udupa S.L., Udupa A.L., y Kulkarni D.R. 1994. Anti-inflammatory and wound healing properties of *Aloe vera*. *Fitoterapia* 65 (2): 141-145.

Valdez M., Garro G., Espinoza A. M. 1997. Establishment of morphogenic rice cell suspension cultures (*Oryza sativa*) in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 44 (3) / 45 (1): 593-595.

Vasil I. y Thorpe T. 1994. *Plant cell tissue culture*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 592.

Weiserma J.H. 1998. USDA. ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm Resources laboratory, Beltsville, Maryland.

[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41)

**TEMA 2:**

**Inducción de Callogénesis y embriogénesis somática  
en *Aloe barbadensis* (Aloaceae) a partir de semillas.**

Inducción de callogénesis y embriogénesis somática en *Aloe barbadensis*  
(Aloaceae) a partir de semillas.

Garro Giovanni<sup>1</sup> y Valdez Marta<sup>1</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

[ggarro@tcr.ac.cr](mailto:ggarro@tcr.ac.cr), [mvaldez@biologia.ucr.ac.cr](mailto:mvaldez@biologia.ucr.ac.cr)

#### RESUMEN

A partir de plantas maduras de *Aloe barbadensis*, cultivadas bajo condiciones de campo, se logró obtener semillas que fueron utilizadas en la inducción de callos. Se evaluaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento junto con el medio básico MS con el fin de escoger la combinación más apropiada para la inducción de los callos. Una concentración de 2.5 mg/L de ácido 2.4-diclofenoxiacético y 2.0 mg/L de 6-bencilaminopurina fue la combinación que resultó más eficiente en la inducción de los callos. Las masas celulares observadas mostraron respuesta morfogénica formando estructuras pro-embriogénicas similares a las informadas en la literatura para plantas monocotiledóneas. Estas estructuras se observaron en altas cantidades a nivel de los callos. Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados con estudios ulteriores que garanticen la formación de embriones somáticos.

**Palabras clave:** callogénesis, embriogénesis somática, *Aloe barbadensis*, cultivo *in vitro*, explantes de semillas.

## INTRODUCCIÓN

Debido a su alta capacidad en la producción de compuestos de interés farmacológico tales como polisacáridos, antraquinonas y glucósidos, *A. barbadensis*, Mill., ha sido la especie de mayor interés dentro del género *Aloe* (Grindlay y Reynolds 1986, Reynolds y Dweck 1999). Tradicionalmente la especie es cultivada de forma vegetativa y en la actualidad algunos trabajos informan de su cultivo mediante técnicas *in vitro*. En éstos, se han establecido sistemas de regeneración de plantas mediante organogénesis somática utilizando diversos explantes como: meristemos apicales (Natali *et al.* 1990, Meyer y Van Staden 1991, Richwine *et al.* 1995, Hirimburegama y Gamage 1995), anteras (Keijzer y Cresti 1987), bases de hojas (Cavallini *et al.* 1993) así como meristemos radicales (Roy y Sarkar 1991).

En especies como *A. ferox*, *A. petrorensis*, *A. arborescens* y *A. ciliaris*, se han estudiado varios sistemas de cultivo *in vitro* orientados a la formación de callos (Groenenwald *et al.* 1975), cultivo de anteras (Keijzer y Cresti 1987), así como el cultivo *in vitro* para el estudio de metabolitos secundarios de interés farmacológico (Racchi 1988). No obstante, aún no se ha informado del establecimiento del sistema de callogénesis o de cultivos celulares para de la especie *A. barbadensis*.

La callogénesis es un paso inicial básico para el establecimiento de cultivos celulares en plantas (Stafford y Warren 1991). Junto con el sistema de suspensiones celulares, la callogénesis permite realizar estudios de fisiología vegetal, inducción de embriogénesis somática y estudios de expresión de genes (Stafford y Warren 1991, Endress 1994). Además, debido a su naturaleza de crecimiento amorfo e ilimitado, puede ser utilizado tanto para detectar la presencia de compuestos de importancia farmacológica, como para la producción de los mismos. El cultivo de callos (embriogénicos) es un sistema

también válido para la conservación de recursos genéticos debido a su potencial en la producción masiva de plantas completas (Altman 1998).

La extracción de los compuestos de importancia farmacológica a partir de plantas de *A. barbadensis*, cultivadas de forma convencional, ha representado serios problemas para mantener niveles constantes de productividad de peso seco y para obtener plantas libres de contaminación endógena. Por su fisiología, las plantas de *Aloe* incorporan gran cantidad de agua a nivel de sus células epidérmicas, lo cual se vuelve desfavorable cuando se cultiva en regiones con altos índices de precipitación. Esta agua produce la dilución de los sólidos totales y por tanto, de la cantidad de polisacáridos de interés. Por otro lado, la fabricación de productos farmacológicos, requiere condiciones de asepsia muy altas que difícilmente se pueden cumplir cuando se trabaja con productos naturales con niveles altos de contaminación endógena (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

El objetivo de este trabajo fue la inducción de embriogénesis somática a partir de semillas de *A. barbadensis*. Este trabajo representa además el primer informe de calogénesis somática al utilizar explantes de semillas de *A. barbadensis*. Esto podría servir como punto de partida para el desarrollo de sistemas celulares para el estudio de compuestos de interés farmacológico así como para la regeneración de plantas libres de patógenos o la manipulación genética de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ● **Obtención del material vegetal**

El material vegetal fue proporcionado por la empresa Sábila Industrial (Carrington Laboratories Inc) ubicada en Liberia de Guanacaste. Se obtuvieron plantas maduras (un año o más) que se cultivaron en condiciones de campo y se mantuvieron por un período de 2 años en el cual no se les eliminaron las hojas más viejas. Al cabo de este período se obtuvieron semillas (fig 1) a partir de los frutos capsulares de las plantas adultas.

### **Desinfección de los explantes e inducción de los callos**

Los embriones maduros fueron desinfectados de acuerdo con el protocolo de Valdez *et al.* (1997) y sembrados en cuatro medios de cultivo elaborados a partir del medio base MS: dos de calogénesis y dos de regeneración, a saber: 36 embriones (18 juveniles y 18 maduros) en medio de regeneración R4. De la misma manera, otros 36 explantes se colocaron en medio R3. Doce semillas juveniles se sembraron en MSC 15 (medio de inducción de callos de sábila: 2.5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP) y 20 semillas maduras en MSC 17: 2 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP. Luego de 16 semanas de cultivo, los explantes en medio de regeneración no produjeron ningún tipo de estructura morfológica, por lo que se descontinuaron estos experimentos. De los explantes sembrados (35) en los medios de calogénesis, se obtuvo un callo aparentemente de tipo embriogénico, luego de seis semanas de cultivo. Este callo se transfirió a medio MSC con 2,5 mg/L de 2, 4-D para inducir una respuesta embriogénica. Este callo se mantuvo en las mismas condiciones de cultivo durante 48 semanas, lo que permitió obtener un total de 72 callos isogénicos, como resultado de la fragmentación de los callos cada 4 semanas.

### **Inducción de embriogénesis somática a partir de callos provenientes de semilla**

Los callos obtenidos a las 12 semanas se mantuvieron en cultivo durante 6-8 semanas adicionales, en medio de callogénesis (MSC), con la finalidad de contar con suficiente número de ellos para los experimentos de regeneración en diversos medios de cultivo. La composición de los medios de cultivo para evaluar la capacidad morfogénica de los callos, se definió con base en la composición del medio que generó los mejores resultados en los experimentos de callogénesis, es decir el MSC, suplementado con 2.5 mg/L de 2,4-D. De esa manera, se diseñó una serie de 16 tratamientos, en los cuales se varió la concentración de 2, 4-D o se sustituyó este compuesto por ANA, y se complementó con diversas concentraciones de BAP.

## **RESULTADOS**

### **Obtención de Semillas de *A. barbadensis*.**

El uso de semillas como explante para el cultivo *in vitro* en *A. petrorensis* se ha informado por Groenewald *et al* (1975). Para *A. barbadensis*, no se han encontrado informes que describan la utilización de este tipo de explantes, por lo cual este es un primer informe para la inducción de callos (fig. 2) en esta especie.

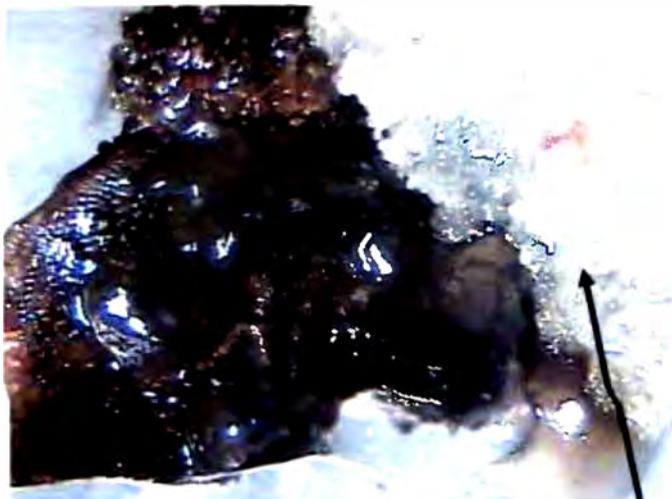
La obtención de semillas (fig 1) de esta especie en Costa Rica se informa en el tema tres de esta tesis.



**Figura 1.** Semilla de *A. barbadensis* obtenida de plantas de 2 años cultivadas en condiciones de campo y utilizadas en la inducción de callos.

#### **Inducción de callogénesis en semillas de *A. barbadensis***

El medio MSC-15, utilizado en la inducción de callos a partir de las semillas de *A. barbadensis* fue el único que logró la inducción de callos. Estos callos fueron utilizados para su multiplicación y futura inducción de regeneración. Las figuras 2 y 3 muestran los callos generados a partir de las semillas y la comparación de estos con los generados en el trabajo informado en el tema 1 de esta tesis, a partir de explantes de base de hoja en plantas juveniles de *A. barbadensis*.



**Figura 2.** Callo generado (flecha) con el medio MSC-15 a partir de semillas de *A. barbadensis* después de 12 semanas de cultivo



**Figura 3.** Comparación entre callos de 16 semanas de cultivo provenientes: A- explantes de base de hoja y B- explantes de semilla de *A. barbadensis*. La formación de estructuras “organizadas” es notoria en los callos inducidos a partir de semillas

El cultivo y multiplicación de los callos inducidos se logró mediante el uso de los medios de mantenimiento descritos en el tema 1 de esta tesis. Con éstos medios se obtuvieron resultados muy semejantes en cuanto a la tasa de crecimiento. En los callos provenientes de semillas (fig. 3-b), se puede notar cierta organización a nivel de las masas amorfas que se agrupan en colonias globulares, con coloraciones blancuzcas, más pálidas que las encontradas en los callos obtenidos a partir de explantes de bases de hoja.

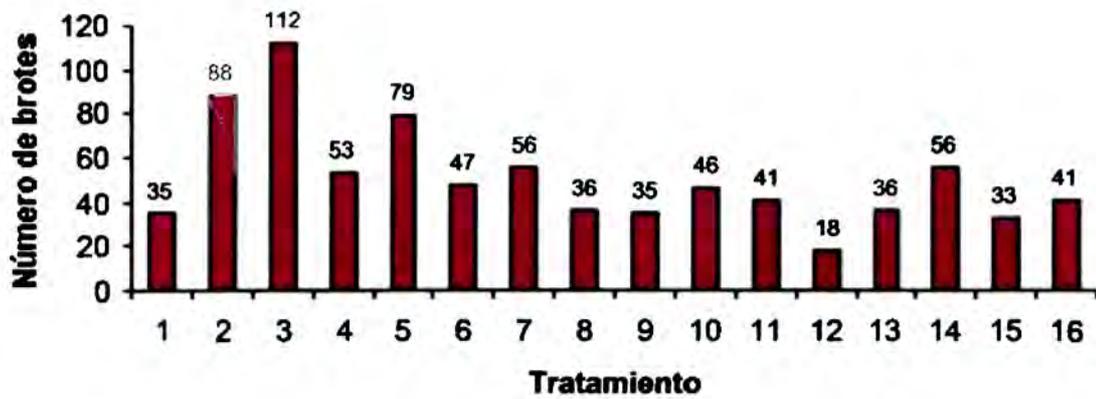
#### **Inducción de embriogénesis somática a partir de callos provenientes de semilla**

El Cuadro 1 muestra la composición de los tratamientos realizados para la obtención de respuesta embriogénica.

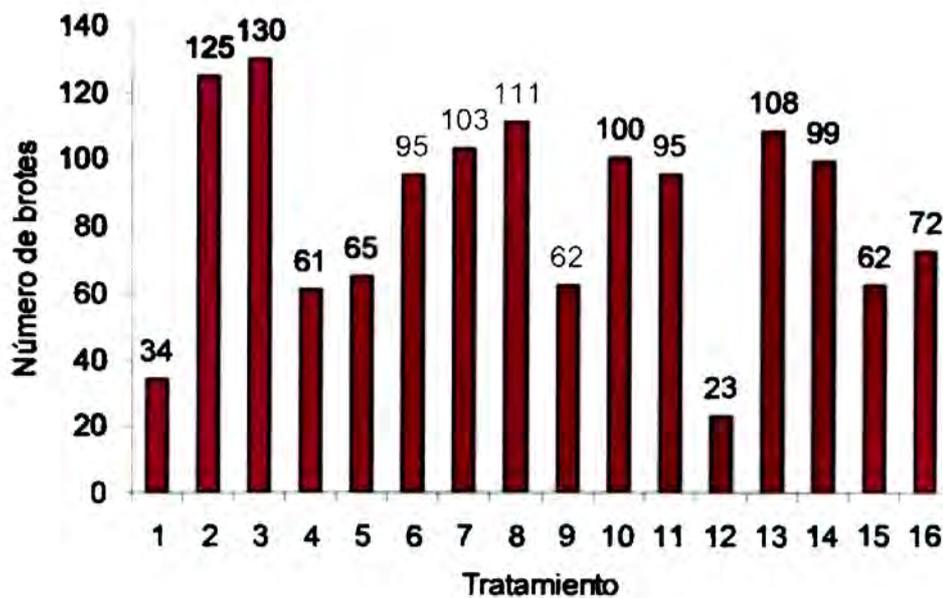
Como se muestra en las figuras 4 y 5, a pesar de que en casi todos los tratamientos aplicados se obtuvieron respuestas organogénicas (fig. 6), los tratamientos 2 y 3 resultaron ser los más eficientes en la producción de alto número de brotes. Observaciones al microscopio de luz revelaron la presencia de altas cantidades de estructuras que parecen ser pro-embriogénicas (fig 7). Estas presentan formaciones tipo "alargamiento cotiledonar", brillantes, que sugieren la posible existencia de eventos de embriogénesis somática en los cultivos. Luego de más de 12 semanas de subcultivo en los tratamientos 2 y 3 mostrados en el cuadro 1, se observó aumento de tamaño y de coloración en los brotes generados junto con prolongaciones y producción de pubescencia (fig.8). No obstante, en ellas no se observó la generación de plántulas. Por ello, se realizaron varios tratamientos de estrés osmótico y reducción de nutrientes (uso del medio MS básico sin reguladores de crecimiento y al 50% de sus componentes). Sin embargo, no se logró los resultados esperados con estos tratamientos.

**Cuadro 1:** Número total de “estructuras de embriogénicas” en los callos de *Aloe barbadensis* derivados de los explantes y examinados en 16 tratamientos con diversas concentraciones de auxinas (2,4-D y ANA) y de la citoquinina BAP, luego de 4 y 12 semanas de cultivo.

Tratamiento				No total de brotes en callos, a las 4 semanas de cultivo	Total de brotes/callos, a 12 semanas de cultivo
	ANA	2,4-D	BAP		
1		0.4	2.0	35	34
2		0.2	2.0	88	125
3		0.05	2.0	112	135
4		0.4	4.0	53	61
5		0.2	4.0	79	65
6		0.05	4.0	47	95
7		0.2	0.5	56	98
8		0.1	0.5	36	111
9		0.03	0.5	35	62
10		0.2	1.0	46	95
11		0.1	1.0	41	90
12		0.03	1.0	18	23
13	0.5		0.5	36	118
14	0.5		1.0	56	99
15	0.2		1.0	33	62
16	0.2		0.5	41	72



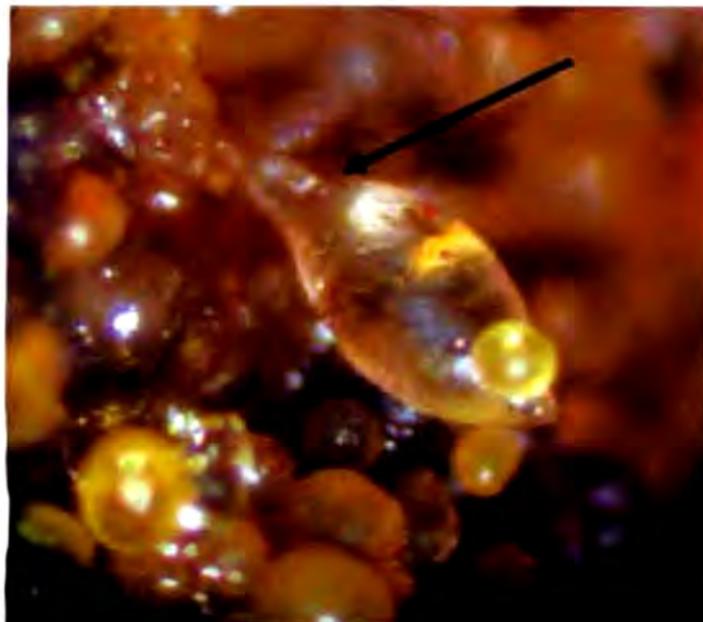
**Figura 4.** Número total de brotes en callos originados a partir de embriones maduros de *Aloe barbadensis* en los diversos tratamientos de regeneración luego de 4 semanas de cultivo.



**Figura 5.** Número total de brotes en callos originados a partir de embriones maduros de *Aloe barbadensis* en los diversos tratamientos de regeneración luego de 12 semanas de cultivo.



**Figura 6.** Brotes obtenidos en los tratamientos de regeneración con callos de *A. barbadensis* inducidos a partir de semillas.



**Figura 7.** La flecha indica las estructuras de tipo "alargamiento cotiledonar" generadas a nivel de los brotes obtenidos con los tratamiento 2 y 3 para la regeneración de plántulas de *A. barbadensis*.



**Figura 8:** Callos cultivados después de 12 semanas que muestran las estructuras organogénicas y de alta pubescencia.

## DISCUSIÓN

La obtención de semillas de esta especie es sumamente difícil debido a que las flores se caen prematuramente de la inflorescencia. Esto limita altamente su polinización y fecundación, y por tanto ha dificultado en gran manera la reproducción sexual de la especie. No se ha podido encontrar, hasta la fecha, ningún informe en la literatura científica internacional de este tipo de resultados para el género *Aloe*. Esto se debe probablemente a la baja frecuencia de este tipo de eventos para el género. Nuestros resultados serían uno de los primeros en ser publicados.

La inducción de los callos se logró de forma eficiente en cuanto a la forma, apariencia y tasa de crecimiento. Estas características resultaron similares a las encontradas en los callos derivados de bases de hojas, según ha sido informado en el tema I de este trabajo de tesis. No obstante, los resultados que aquí se presentan, muestran evidencia de que estos callos a diferencia de los derivados de base de hojas, forman ciertas “agrupaciones globulares”. Estas observaciones pueden sugerir, la generación de eventos de embriogénesis somática (Pérez 1998). A pesar de que las células de los callos generados

parecen ser embriogénicas, según lo mencionan Vasil y Thorpe (1994), el desarrollo de embriones somáticos maduros capaces de generar plántulas, no fue observada en esas células.

Es posible que las condiciones de cultivo, principalmente las combinaciones ensayadas para los reguladores de crecimiento, no fueron las óptimas requeridas para este tipo de material. Las estructuras pro-embriogénicas observadas, tanto en su número como en su forma son evidencia de cierta programación o predisposición de las células a la respuesta embriogénica. Por lo tanto se requiere afinar más la técnica con el fin de obtener la inducción precisa de la ruta embriogénica completa. Inductores adicionales a los reguladores de crecimiento, como el uso de poliaminas o algunos aminoácidos como glutamina o alanina, o reducciones en la concentración de nitrógeno (Vasil y Thorpe 1994), podrían mejorar las condiciones nutritivas de los medios utilizados y generar resultados más satisfactorios. Además, el uso de otros factores, como cambios fuertes de temperatura, aumento en la concentración de iones de hipoclorito, anaerobiosis (Pérez 1998), podrían ser evaluados para la generación de plántulas.

## REFERENCIAS

- Altman A. 1998. Agricultural biotechnology. Marcel Dekker Inc. New York, USA. PP 770.
- Cavallini A., Natali L., Cionini G., Sassoli O., Castronera-Sánchez I. 1993 *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* mill.: Quantitative DNA variations in regenerated plants. *Plant-Science* 91: 2, 223-229.
- Corneanu M., Corneanu G., Badica C., Minea R., Bica D. Y Vekas L. 1994. *In vitro* organogenesis at *Aloe arborescens* (Liliaceae). *Revue Roumaine de Biologie. Serie de Biologie Vegetale* 39 (1): 45-52
- Endress R. 1994. Plant cell biotechnology. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany. Pp 354.
- Gómez R. 1998. Cultivo de células y tejidos, Capítulo 2. En : Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Perez-Ponce J. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. Pp 390.
- Granados-Sanchez D. y Castañeda-Perez A.D. 1988. SÁBILA, *Aloe barbadensis* Mill. Planta agroindustrial (medicinal) del desierto. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. México. Pp 50.
- Grindlay D. and Reynolds T. 1986 The *Aloe vera* phenomenon : A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117-151.
- Groenewald E. G., Koeleman A. y Wessels D.C.J. 1975. Callus formation and plant regeneration from seed tissue of *Aloe pretorensis*, Pole Evans. *Z. Pflanzenphysiol* 75: 270-272
- Gui Y., Xu T., Gu S., Liu S., Zhang Z., Sun G., Zhang Q. 1990. Studies on

- stem tissue culture and organogenesis of *Aloe vera*. *Acta-Botanica-Sinica* 32: 8, 606-610
- Hart L., Kuis L., Dijk H-Van, Labadie R., Van-den-Berg-A., Van-Dijk H. 1989. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. *Planta-Medica* 55: 6, 509-512
- Hirimburegama K. y Gamage N. 1995. In vitro multiplication of *Aloe vera* meristem tips for mass propagation. *Horticultural-Science* 27 (3-4):15-18.
- Hutter J.A., Salman M., Stavinoha W.B., Satsangi N., Williams R.F., Streeper R.T. y Weintraub S.T. 1996. Antiinflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products* 59(5): 541-543.
- Jiménez-Magallanes L., Sumano-López H. y Mateos-Trigos G. 1995. Uso de Sábila (*Aloe vera*) para el tratamiento de laceraciones y grietas en tetas de vacas lecheras. *Veterinaria Mexicana* 26 (3): 271-272
- Keijzer C.J. y Cresti M. 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. *Annals of Botany* 59: 533-542.
- Litz R.E. y Jarret R.L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali, Colombia. Cap. 7, p.143.
- Meyer H. y Van Staden J. 1991. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant-Cell,-Tissue-and-Organ-Culture* 26 (3) :167-171.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Natali L., Castorena-Sanchez I. y Cavallini A. 1990. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 71-74.
- Parnar N.S, Tariq M., Al-Yahya M.A., Ageel A.M, Al-Said M.S .1986. Evaluation of

- Aloe vera* leaf exudate and gel for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Fitoterapia*. 57:5, 380-383.
- Pérez J.N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. Ediciones Geo. Pp 390.
- Archí M.L. 1988. Using in vitro culture to study the biosynthesis of secondary products in *Aloe ferox*. *Rivista-di-Agricoltura Subtropicale- e-Tropicale* 82 (4): 707-714.
- Reynolds T. y Dweck A.C. 1999. Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 68:3-37.
- Richwine A.M; Tipton J.L., Thompson G.A. 1995 Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. *HortScience* 30 (7): 1443-1444.
- Roy S y Sarkar A. 1991. *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia-Horticulturae* 47 (1-2) 107-113
- Saks Y. Barkaigolan R. 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology & Technology* 6 (1-2): 159-165.
- Stafford A. and Warren G. 1991. Plant cell tissue culture. Open University Press. Buckingham, Great Britain. Pp 251
- Udupa S.L., Udupa A.L., Kulkarni D.R. 1994. Anti-inflammatory and wound healing properties of *Aloe vera*. *Fitoterapia* 65: 2, 141-145.
- Valdez M., Garro G., Espinoza A. M. 1997. Establishment of morphogenic rice cell suspension cultures (*Oryza sativa*) in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 44 (3)/45 (1): 593-595.
- Vasil I. and Thorpe T. 1994. Plant cell tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 592.
- Weiserma J.H. 1998. USDA. ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm

**Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm**

**Resources laboratory, Beltsville, Maryland.**

**[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41)**

**TEMA 3:**

**Estudios de reproducción sexual en *Aloe barbadensis*,  
Miller (Aloaceae).**

## Estudios de fructificación en *Aloe barbadensis*, Miller

(Aloeaceae)

Garro Giovanni<sup>1</sup> y Valdez Marta<sup>1</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

[ggarro@itcr.ac.cr](mailto:ggarro@itcr.ac.cr), [mvaldez@biologia.ucr.ac.cr](mailto:mvaldez@biologia.ucr.ac.cr)

### RESUMEN

El presente trabajo informa acerca de los estudios realizados en la descripción de algunos eventos de fructificación en la especie *A. barbadensis* Miller. Se observó la producción de cápsulas tricarpelares (1.0-1.5 cm) con dehiscencia longitudinal. Estas producen semillas con aproximadamente 20-25 en cada uno de sus carpelos. Las semillas son de entre 6-9 mm de largo y color café oscuro. Las mismas no fueron capaces de germinar en condiciones de cultivo *in vitro* (medio MS).

**Palabras clave:** *Aloe barbadensis*, semilla, descripción, infrutescencia, inflorescencia, reproducción sexual.

## INTRODUCCIÓN

El género *Aloe* pertenece a la familia *Aloaceae* (Weiserma 1998). Su centro de origen se ubica en Sudáfrica y ha sido ampliamente cultivado en el norte de Africa y el mediterráneo en países como Grecia y el sur de Italia. La palabra “*Aloe*” deriva del griego “*Als*” o “*Alos*” que significa *sal*, el cual quizá se relacione con el sabor “acre” que presenta el zumo que se extrae de estas plantas (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

El género comprende más de 350 especies identificadas, siendo así el más grande de la tribu *Aloinea*, que comprende además los géneros *Gasteria*, *Haworthia*, *Astroloba*, *Poelnitzia*, *Chamaealoe*, *Chortolirium*, *Lomathophilum*, *Leptaaloe* y *Guillauminia* (Granados y Castañeda 1988). Las plantas del género *Aloe* fueron introducidas por los españoles en el continente Americano y en general, se encuentran ampliamente distribuidas en muchas partes del mundo en zonas desérticas y áridas (Grindlay y Reynolds 1986).

La especie presenta principalmente reproducción vegetativa por medio de múltiples brotes en la base de la planta y a nivel de rizomas que se extienden y producen brotes. A pesar de que se ha mencionado la reproducción sexual dentro del género, y ésta se describe como típica dentro del grupo de los liliales (Montiel 2000), se conocen muy pocos informes que describan el evento en esta especie.

Las plantas del género *Aloe* poseen hojas típicas de las plantas suculentas, con forma de espada, duras, gruesas, muy grandes y carnosas, dispuestas en grandes rosetas y con una espina en sus extremos, armadas de otras espinas marginales más pequeñas. Pueden ser de color vetado de verde y blanco como *A. vulgaris* o verde ceniza plateado (*A. barbadensis*). En la mayoría de especies sin tallo, las hojas se encuentran dispuestas en

pisos sucesivos, en forma alterna dos a dos, como en el caso de *A. saponaria* variedad *variegata*, tres a tres como el *A. barbadensis* var. *mitriformis*, o en rosetas radiales de cuatro o más hojas, alternando los ángulos de modo que todas ellas puedan acceder a la luz solar, como en el caso de *A. vulgaris* (Sajeva y Costanzo 1994).

La floración se da en varias épocas del año, dependiendo de la especie, pero sobre todo durante los meses de verano (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988). La floración por tanto es un evento usual dentro de este grupo. No obstante, por su importancia medicinal en algunos casos, las flores son cortadas antes de su madurez con el fin de evitarle a la planta el gasto energético que conlleva la madurez de la flor. Así mismo, en muchas especies se puede observar como las inflorescencias no completan el ciclo reproductivo, llegando a secarse sin producir fruto.

En Costa Rica, a pesar del alto uso ornamental y medicinal de las plantas de *Aloe*, no se conocen informes de los procesos de reproducción sexual o de fenología de las especies presentes en el país. En este trabajo se hace una referencia preliminar de los eventos de floración y fructificación en la especie *A. barbadensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas adultas (2-3 años) de *A. barbadensis* fueron obtenidas de plantaciones de las Empresas Sábila Industrial y Rancho Bagaces en Guanacaste. El material fue desinfectado y posteriormente cultivado por espacio de 2 años en condiciones de campo en la zona de Banderilla, Cartago a 1300 m.s.n.m.

Diez de las plantas se cultivaron a una distancia entre sí de 1 m. y se mantuvieron en suelos con buena proporción de nutrientes, sin proporcionar ningún agroquímico y sin eliminar sus brotes ni hojas durante el cultivo. En estas plantas se realizaron observaciones de los procesos de floración y fructificación.

Por otro lado se realizó la inducción *in vitro* del proceso de germinación. Las semillas fueron sembradas en medios de cultivo a partir del medio básico MS y complementados

con reguladores de crecimiento como 2.5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP en el medio MSC-15 y 400 mg/L de Caseína hidrolizada, 200 mg/L de extracto de malta y 4.0 mg/L de BAP en el medio R-4. En ambos medios se utilizó Phitagel® como gelificante al 2% y un pH de 5.6. Los explantes se mantuvieron en condiciones de fotoperíodo de 8 horas luz en un cuarto de crecimiento a 24-25°C. Los cultivos se mantuvieron durante 12 semanas con sub-cultivos cada 3 semanas.

## RESULTADOS

### **Descripción de la Floración**

A los dos años de cultivo, 8 de las 10 plantas presentaron inflorescencias típicas de la especie en la época de verano (enero 2001) de la misma manera como lo describe Byrd (1970). Las inflorescencias están formadas por un raquis de 1 a 1.35 m, son superiores, terminales y una base de 8 a 10 cm. La inflorescencia es terminal y ramificada, desnuda y lisa con racimos que forman el 50% de la longitud total de la misma (Fig.1 ).

Las flores son de color amarillo de 6 mm de largo, con listas verdosas dirigidas hacia abajo y acompañadas de una bractea membranosa lanceolada de color blanco con líneas oscuras (Fig. 2). Poseen pedúnculos curvos de 4 mm, perianto cilíndrico, curvo. Poseen seis estambres hipogineos y con filamentos aleznados, anteras oblongas dorsijas, ovario sésil, oblongo-triangular, con varios óvulos en cada cavidad, de estilo filiforme y estigma pequeño.



Figura 1. Ilustración de inflorescencia terminal en *A. barbadensis*, que muestra la ramificación superior del raquis (Ilustración realizada por Adriana Blanco).



Figura 2. Ilustración de un corte longitudinal de flor de *A. barbadensis*, se pueden notar el ovario y los 6 estambres hipogíneos. (Ilustración realizada por Adriana Blanco)



Figura 3. Planta “ecotipo” *A. barbadensis*, observada en las inmediaciones sur de San José. Se observa el color naranja de las flores y la ramificación del raquis superior.

En el material colectado en las inmediaciones de San José se pudo observar la aparición de una coloración atípica en las flores de *A. barbadensis*, así como en la forma de la inflorescencia (fig 3). Esta planta presenta coloración naranja en sus flores y la ramificación en su raquis es mayor (hasta 6) que la observada en las especies de *A. barbadensis* (2-3). Esto difiere de lo informado en la literatura (Weiserma 1998, Hawaii Botany Garden 2004), en que las flores son de color amarillo para esta especie.

### Descripción de fructificación

En la segunda floración obtenida (febrero 2002) se pudo observar la formación de los frutos a partir de las inflorescencias. Se obtuvieron cápsulas de color verde oscuro, que en su inicio se encontraban cubiertas por las brácteas presentes en las flores (fig 4). Estas cápsulas son alargadas de 1,0 a 1,5 cm de largo y 0,5-0,7 cm de diámetro. Presentan líneas de dehiscencia de tipo longitudinal (fig 5). La cápsula posee tres carpelos engrosados (fig 5). La placentación es de tipo axilar (fig 6). Las semillas se encuentran agrupadas en 20-25 semillas por carpelo. La forma de las semillas es de tipo ovalada (fig. 7) con ornamentaciones y extremos ligeros para facilitar la dispersión por viento. Las semillas son de color negro, duras y de textura ondulada.

### Inducción de germinación

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos en la inducción de germinación *in vitro* de las semillas. Como puede notarse no se obtuvieron resultados positivos en estos tratamientos a pesar de que el subcultivo fue prolongado por un período de 12 semanas.

**Cuadro 1.** Inducción de germinación *in vitro* de semillas de *A. barbadensis*.

Nº Semillas	Medio cultivo	Semanas de cultivo	% Germinación
36	R-4	12	0
32	MSC-15	12	0



Figura 4. Ilustración de infrutescencia de *A. barbadensis*, se pueden notar las bracteas aún presentes en la base de las cápsulas (Ilustración realizada por Adriana Blanco).



Figura 5. Infrutescencia de *A. barbadensis* en etapa inmadura, se notan las brácteas y la coloración verde oscura de los frutos.



Figura 6. Ilustración de las cápsulas dehiscentes observadas en plantas de *A. barbadensis*, se puede notar las líneas dehiscentes longitudinales en cada uno de los frutos (Ilustración realizada por Adriana Blanco).



Figura 7. Fotografía de infrutescencia de *A. barbadensis* que muestra los frutos maduros que se abren en forma longitudinal.



Figura 8. Ilustración de corte longitudinal de la cápsula de *A. barbadensis*. Nótese la placentación de tipo axilar (Ilustración realizada por Adriana Blanco).



Figura 9. Ilustración de semillas de *A. barbadensis*. Se observa la ornamentación en los extremos y la textura ondulada (Ilustración realizada por Adriana Blanco).



Figura 10. Fotografía de una semilla de *A. barbadensis*. Las semillas se encuentran en grupos de 20-25 semillas por carpelo.

## DISCUSIÓN

En esta investigación se describen algunos eventos de floración y fructificación para la especie *A. barbadensis* en condiciones de campo. Los eventos del ciclo reproductivo de las especies del género *Aloe* han sido muy poco documentados, debido quizá a su baja frecuencia y a la alta capacidad de las especies para reproducirse de forma vegetativa.

Las observaciones presentadas indican que la especie puede llegar a la producción de los gametos masculinos y femeninos, dando lugar posteriormente a embriones sexuales, incluso en condiciones climatológicas que no son las idóneas para el cultivo de las plantas. Estos resultados pueden ser debidos a que las plantas fueron mantenidas sin la eliminación periódica de hojas a diferencia de lo que ocurre en las plantaciones comerciales donde las plantas son sometidas a “podas” sucesivas. De hecho muchas plantas de follaje son mantenidas con “corta de floraciones” (eliminación de flores) con el fin de evitar que la planta invierta energía en este proceso y produzca menos follaje.

No obstante la obtención de semillas, estas no fueron capaces de germinar ni siquiera en condiciones artificiales. En efecto, se realizaron ensayos de cultivo *in vitro* con el fin de inducir la germinación y ésta no fue posible (cuadro I). Quizá deben realizarse varios ensayos con el fin de encontrar las condiciones de cultivo ideales para la respuesta de germinación. Por otro lado se debe tomar en cuenta condiciones endógenas de la semilla como el tipo de latencia presente en esta especie. A este respecto se deben realizar ensayos que permitan superar la latencia presente en las semillas de forma adecuada para lograr una germinación eficiente.

En relación con la variante observada dentro de la especie *A. barbadensis*, de inflorescencias con coloración naranja, cabe señalar que este tipo de eventos suele suceder con frecuencia dentro del género. Se ha descrito la hibridación entre especies del género con cierta regularidad (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988, Grindlay y Reynolds 1986). Sin embargo la baja diversidad del género en Costa Rica, con unas 4-

5 especies solamente, puede incidir en una baja probabilidad de cruces entre estas especies. Por lo anterior resulta de gran interés llevar a cabo estudios exhaustivos que aporten mayor información para tener un criterio mas fundamentado sobre la generación de estas variantes.

## REFERENCIAS

- Byrd A. 1970. Exotic 3. Pictorial cyclopedia of exotic plants. Rettus Company. USA.
- Garuda International, Inc. 1999.  
[www.garudaint.com/www.milkcalcium.com/diavalog1.htm](http://www.garudaint.com/www.milkcalcium.com/diavalog1.htm)
- Granados-Sanchez D. y Castañeda-Perez A.D. (1988) SÁBILA, *Aloe barbadensis* Mill. Planta agroindustrial (medicinal) del desierto. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. México. pp 50.
- Grindlay D. y Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. Journal of Ethnopharmacology 16: 117-151.
- Hawaii Botany Garden. 2004. [www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/aloe.html](http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/aloe.html)
- Montiel M. 2000. Introducción a la Flora de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 3 ed. San José, Costa Rica. Pp 345.
- Reynolds T. y Dweck A.C. 1999. *Aloe vera* leaf gel: A Review Update. Journal of Ethnopharmacology 68: 3-37.
- Sajeva M. y Costanzo M. 1994. Succulents. The illustrated dictionary. Cassell. London, UK.
- Weiserma J.H. 1998. USDA.ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm Resources laboratory, Beltsville, Maryland.  
[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41)

## **TEMA 4:**

**Detección de compuestos de interés farmacológico en  
callos de *Aloe barbadensis*, Miller. (Aloaceae)**

Detección de compuestos de interés farmacológico en callos de *Aloe barbadensis*, Miller. (Aloaceae)

Garro Giovanni<sup>1</sup>, Romero Rosaura M.<sup>2</sup> y Valdez Marta<sup>1</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

[vgarro@ucr.ac.cr](mailto:vgarro@ucr.ac.cr), [mvaldez@biologia.ucr.ac.cr](mailto:mvaldez@biologia.ucr.ac.cr)

2. Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

[rromero@qca.ui.ucr.ac.cr](mailto:rromero@qca.ui.ucr.ac.cr)

## RESUMEN

Compuestos de interés farmacológico como Acemannan y antraquinonas fueron detectados por primera vez en callos de *Aloe barbadensis*. En el caso de Acemannan se utilizó la técnica de HPLC y para el caso de antraquinonas se utilizó TLC. El contenido de Acemannan encontrado en los callos fue de entre 0.7 y 2.1 mg/100 mL. Este resultado fue mucho mas bajo que la concentración usual encontrada en las hojas frescas (85 mg/100 mL) de la planta. Este informe representa un primer paso para la producción *in vitro* de los compuestos de uso farmacéutico en *A. barbadensis*.

**Palabras clave:** Acemannan, callogénesis somática, *A. barbadensis*, cultivo *in vitro* HPLC.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Aloe* (Aloeaceae), han sido ampliamente utilizadas de forma terapéutica a lo largo de la historia de culturas como la Egipcia y la Romana. *Aloe barbadensis*, Miller (Weiserma 1998) ha sido la más estudiada de este género debido a su gran capacidad de producción de compuestos con actividad biológica. Las células del parénquima de las hojas contienen varios compuestos de uso medicinal, cuyos principios activos son utilizados en la fabricación de numerosos productos comerciales, tanto médicos como cosméticos (Grindlay y Reynolds 1986).

Tradicionalmente, los estudios de la actividad biológica de las especies de *Aloe* se han centrado en las propiedades de cicatrización de heridas y propiedades anti-inflamatorias, en el efecto sobre problemas gástricos y los efectos restauradores posteriores a las quemaduras en la piel así como su efecto anti-micótico (Grindlay y Reynolds 1986, Udupa *et al.* 1994, Saks y Barkaigolan 1995, Hutter *et al.* 1996). Compuestos tales como los polisacáridos con unidades de manosa (“mannans”) acetilados, los c-glucósidos, las antraquinonas (aloesina, barbaloína, emodina), son los más frecuentemente mencionados en los estudios de actividad terapéutica (Saleem *et al.* 1997, Reynolds y Dweck 1999).

Uno de los compuestos más importantes encontrado en el gel de las hojas de *A. barbadensis* es el polisacárido Acemannan (Carrasyn <sup>™</sup>), descrito por Carrington Laboratories (Texas) como un poli-mannan acetilado, mencionado como un estimulador del sistema inmune (McDaniel y McAnalley 1987). Este polisacárido acetilado de cerca de 80.000 Da., ha sido ampliamente estudiado y se le relaciona también con una serie de propiedades inmunológicas (Hart *et al.* 1989, Reynolds y Dweck 1999).

El compuesto Acemannan se extrae del gel de las hojas de *A. barbadensis* que se cultivan de forma tradicional. Las plantaciones comerciales de la especie son muy numerosas en las zonas cálidas de Norteamérica (Texas, Arizona, Nuevo México) y en países centroamericanos como Guatemala, El Salvador y Costa Rica (Granados-Sanchez y Castañeda-Perez 1988).

Debido a su baja tasa de reproducción sexual (casi desconocida), las plantas se reproducen de forma vegetativa para su cultivo. Algunos estudios mencionan el cultivo por técnicas *in vitro* (Castronera-Sánchez *et al.* 1988, Meyer y Van Staden 1991, Cavallini *et al.* 1993) para otras especies tales como *A. ferox* en que se han llevado a cabo estudios ulteriores sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios (Racchi 1988). Para la especie *A. barbadensis* aún no se ha informado de estudios *in vitro* sobre la presencia de compuestos de interés en cultivos celulares. Resulta entonces de gran importancia buscar el establecimiento y optimización de estos cultivos, tanto para la multiplicación masiva y la regeneración de plantas, así como para el desarrollo de líneas celulares que permitan la obtención de los productos de uso terapéutico. Los métodos controlados del cultivo *in vitro* en efecto, garantizan una alta productividad, así como la asepsia y pureza de los compuestos obtenidos. En comparación con los sistemas convencionales de producción, se podría incrementar los rendimientos por la reducción de fungicidas y bactericidas en los primeros estadios de las plantas, así como la obtención de productos más limpios que cumplan mejor los requerimientos sanitarios para el mercado farmacéutico.

En este estudio se analizaron muestras de callos somáticos, derivados de bases de hojas de *A. barbadensis*, por técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la identificación del polisacárido Acemannan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas jóvenes (2-3 meses) de *A. barbadensis* (Miller) cultivadas en condiciones de invernadero. Ellas fueron utilizadas para la inducción de callogénesis somática a partir de explantes provenientes de la base de hojas. Se utilizó un primer medio de cultivo semi-sólido modificado a partir del medio MS básico establecido por Murashige y Skoog (1962) con tiamina 0.5 mg/L como vitamina y los siguientes reguladores de crecimiento: 2,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2.0 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP) y 40 mg/L de Adenina. Se utilizó Phitagel™ como gelificante al 3 % y sacarosa 40 g/L. La inducción de los callos se llevó a cabo en condiciones de oscuridad a una temperatura de 24-25 grados Celsius. Los callos inducidos después de 8 semanas de cultivo, fueron transferidos a un segundo medio de cultivo semi-sólido para su mantenimiento. Su formulación corresponde a una modificación del medio MS básico que contiene tiamina 0.5 mg/L como vitamina y los siguientes reguladores de crecimiento: 1,5 mg/L de 2,4-D, 1.0 mg/L de BAP y 80 mg/L de Adenina. Se utilizó Phitagel™ al 3% como gelificante y sacarosa 40 g/L.

Para identificar el polisacárido Acemannan, se escogieron muestras de callos (Fig 1) de apariencia poco acuosa y coloración amarillenta. Se tomó un gramo (peso fresco) de callo de cada caja Petri. Luego se mezclaron varias muestras hasta completar una

cantidad de 5 a 6 gramos, la cual se colocó en envases plásticos para ser liofilizados y pulverizados. Posteriormente, las muestras se disolvieron en una solución acuosa de azida de sodio (0.5%) con agitación constante durante 8 horas. La solución resultante fue filtrada en filtros Nalgen™ 0,22 µm. La identificación se realizó por cromatografía de exclusión por tama, utilizando un aparato (HPLC) marca Shimatzu modelo: SIL10-AS con controlador y un auto inyector, IR -LC 6 AS, con lámpara UV y columnas Toso Haaas PW 50=00. El análisis de los espectros de absorción se llevó a cabo por medio de comparaciones con los espectros de estándares Acemannan (0,2%) y muestras de gel puro de hojas frescas, proporcionadas y preparadas según los procedimientos establecidos por la empresa Carrington Laboratories Inc. (Sábila Industrial, Guanacaste, Costa Rica). Esta empresa suministró además el apoyo técnico para identificar el tiempo de retención del Acemannan que es cercano a los 5.382 minutos en un cromatograma típico de hojas frescas. Las muestras se analizaron por duplicado en alícuotas de 50 µl en cada caso.

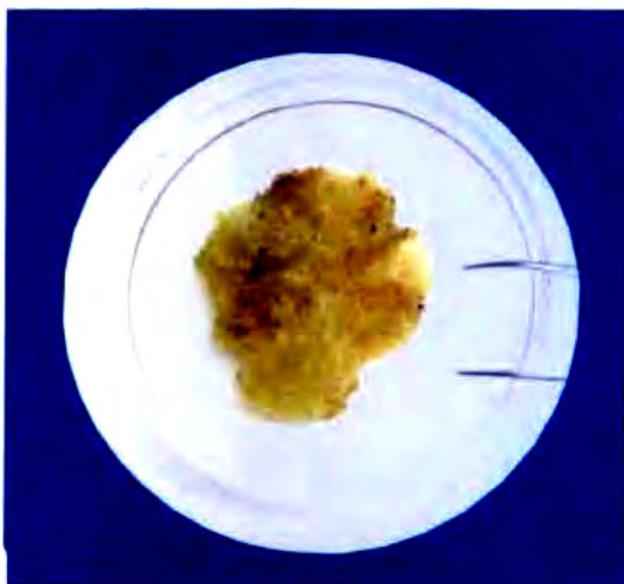
Los análisis cualitativos de presencia de antraquinonas en los cultivos de callos se realizaron haciendo uso de la técnica de cromatografía de capa fina (TLC).

Se utilizó sílica gel 60 F<sub>254</sub> como fase estacionaria y dos solventes: i) acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10), ii) hexano-acetato de etilo-ácido fórmico (75:25:1). El revelador utilizado fue KOH/Etanol

## RESULTADOS

### 1. Presencia y contenido de Acemannan

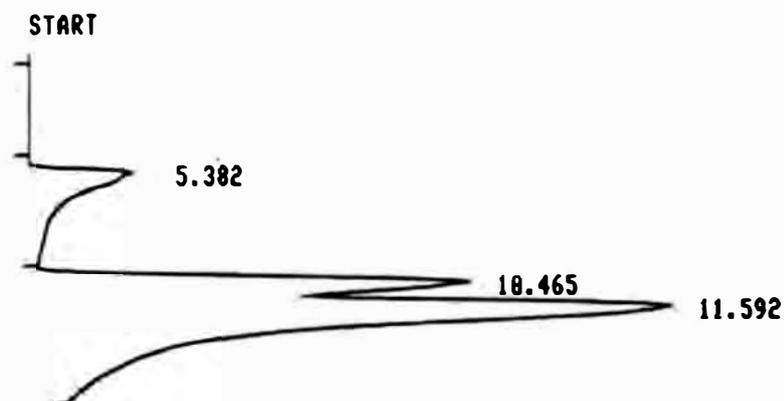
La presencia del polisacárido Acemannan, se puede detectar a nivel del gel de hojas frescas con un tiempo de retención cercano a 5.382 unidades (fig. 2). Estas hojas fueron cultivadas en plantaciones comerciales y poseen contenidos de Acemannan (70-100 mg/100mL) que se encuentran dentro de los parámetros aceptables para se utilizadas en procesos farmacológicos.



**Figura 1:** Callos somáticos de *A. barbadensis* de doce semanas de cultivo utilizados en la detección de *Acemannan* por técnicas de HPLC.

MUESTRA DE GEL 03-05-VIII-03 RA 445/ SL 020003 08-06--2.

START



CHROMATOPAC C-R6A

SAMPLE NO 0

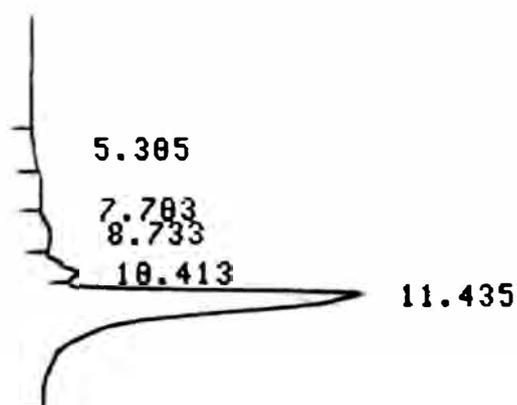
REPORT NO 13748

FILE 0

METHOD 21

PKNO	TIME	AREA	NK	IDNO	CONC	NAME
1	5.382	704983			9.6926	
2	10.465	1801283			24.7654	
3	11.592	4767122	V		65.542	
TOTAL		7273388			100	

**Figura 2.** Espectro de absorción típico de una muestra de gel puro de *A. barbadensis*, Miller. El tiempo de retención de 5.382 corresponde al grupo de polisacáridos llamado Acemannan.



CHROMATOPAC C-R6A  
 SAMPLE NO 8  
 REPORT NO 13762

FILE  
 METHOD

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC
1	5.305	18342			1.1816
	7.703	21952	Y		1.4141
	8.733	56558	Y		3.6433
	10.413	108081	Y		6.9624
	11.435	1347422	Y		86.7986
TOTAL		1552354			100

**Figura 3.** Espectro de absorción encontrado en la muestra 1 de callos somáticos de *A. barbadensis*. El tiempo de retención de 5.385 corresponde al compuesto Acemannan.

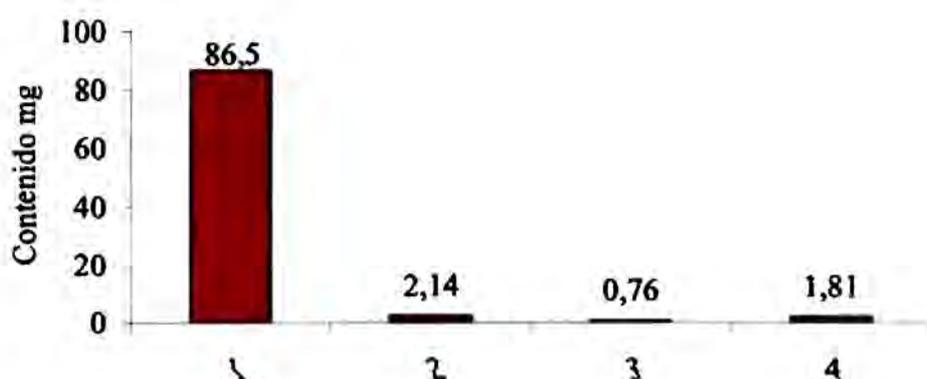
Las comparaciones entre las muestras analizadas provenientes de callos y las muestras de gel de hojas frescas indican que el nivel de contenido de Acemannan encontrado en los callos (figura 2) es unas ochenta veces menos (fig 4) que el encontrado en el gel puro que se extrae de las hojas frescas de la planta.

En el cuadro 1 y la Figura 4, se muestra la diferencia en contenido del polisacárido comercial Acemannan, tanto en los callos cultivados, como en una muestra control de gel

proveniente de hojas frescas de la planta. Se puede notar que la variación en la concentración del polisacárido entre las muestras de callos no es muy alta (0.7- 2.1 mg/100 mL)

Cuadro 1. Tiempos de retención de Acemannan en gel de hojas frescas de *A. barbadensis* y en muestras de callos somáticos, analizados por medio de la técnica de HPLC.

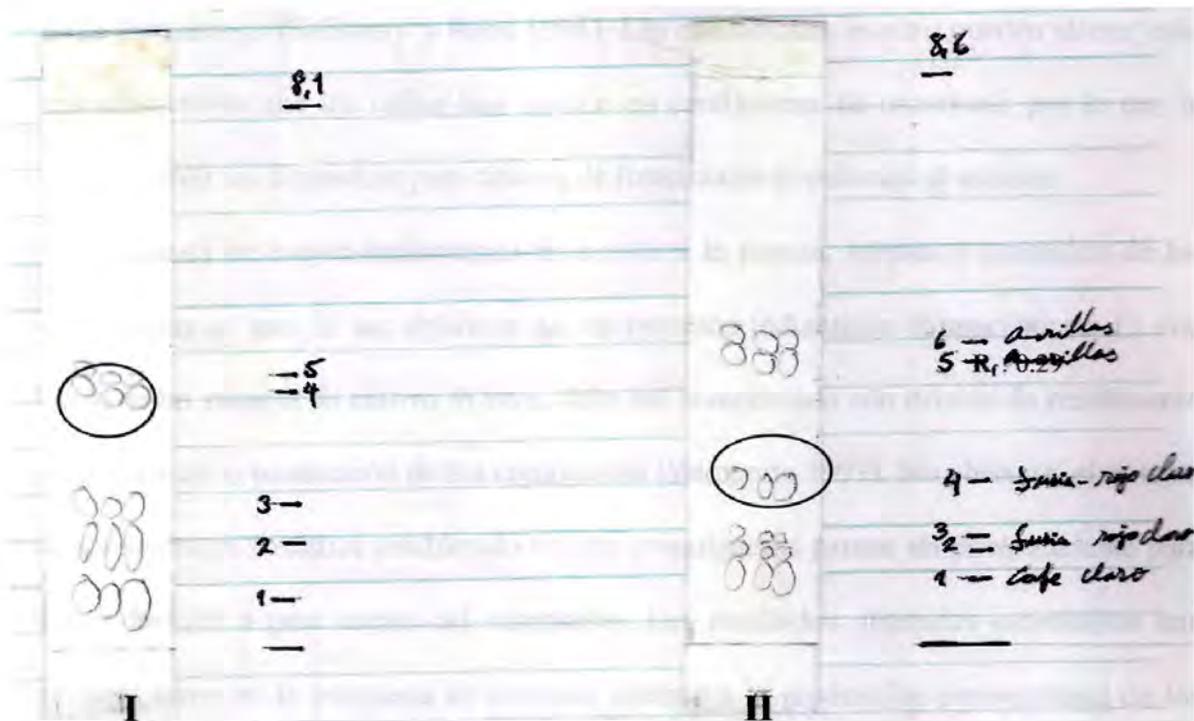
Muestra	Tiempo de retención (Minutos)	Área graficada en cromatograma
Gel- hojas frescas	5.382	698533
Muestra callo 1	5.317	17273
Muestra callo 2	5.332	6154
Muestra callo 3	5.265	14623



**Figura 4.** Concentración (mg/100mL) de Acemannan en muestras de gel de hojas frescas (1) y en muestras de callos somáticos (2, 3, 4) de *Aloe barbadensis*, analizados por HPLC.

## 2. Detección cualitativa de antraquinonas

Al utilizar la técnica de TLC, con los callos de *A. barbadensis*, fue posible detectar grupos de antraquinonas, las cuales aparecen en ambos tratamientos realizados (fig. 5). Sin embargo la identificación de los grupos o compuestos específicos no fue realizada debido a limitaciones de tiempo para la aplicación de las técnicas respectivas.



**Figura 5:** Detección cualitativa de antraquinonas por medio de la técnica de cromatografía de capa fina (TLC) en callos de *A. barbadensis*. Los círculos muestran el lugar de migración de las antraquinonas. Los solventes utilizados fueron: I-Acetato de etilo: metanol: agua y II-Hexano: acetato de etilo: ácido fórmico

## DISCUSIÓN

La baja concentración de polisacáridos complejos encontrados en los callos de *A. barbadensis* (Fig 4) no es adecuada para utilizar este sistema como una fuente abundante, para su extracción desde el punto de vista comercial. Acemannan es un polisacárido formado de unidades de manosa, una hexosa de gran importancia fisiológica en la planta. La síntesis de estos compuestos está muy ligada a los mecanismos bioquímicos propios de la fotosíntesis (Salisbury y Roos 1994). Las condiciones *in vitro* pueden alterar esos mecanismos ya que los callos han crecido en condiciones de oscuridad, por lo que la energía lumínica disponible para síntesis de fotosintatos es reducida al mínimo.

La búsqueda de mayor rendimiento en cuanto a la pureza, asepsia y contenido de los compuestos es uno de los objetivos de los procesos industriales farmacéuticos. El alto costo de un sistema de cultivo *in vitro*, debe ser compensado con niveles de rendimiento muy altos en la producción de los compuestos (Verpoorte 1999). No obstante, el sistema de callogénesis somática establecido en esta investigación parece ser poco eficiente para la producción a gran escala del compuesto. Los resultados obtenidos constituyen una primera etapa en la búsqueda de sistemas alternos a la producción convencional de los compuestos como el Acemannan en esta especie. La producción *in vitro* de órganos vegetales tales como meristemos o raíces (Gui *et al.* 1990), en los cuales no se inhiba la actividad fotosintética de los tejidos, podría ser una mejor alternativa que la callogénesis somática, para la producción de los polisacáridos complejos de interés farmacológico de *A. barbadensis*. Es importante hacer notar que la detección de antraquinonas a nivel de los callos (fig. 5) puede afectar directamente las intenciones de uso de este sistema con fines de producción a gran escala del polisacárido. Sin embargo debido a que las

antraquinonas son un componente importante de los compuestos de la planta, se debe realizar análisis cuidadosos con el fin de determinar los contenidos de estos compuestos en los callos y determinar si éste es significativo según los requerimientos y especificaciones para productos a base de *A. barbadensis*. Cualquiera de estas alternativas debe ser analizada en términos de su ventaja comparativa con los sistemas tradicionales de producción y extracción de los compuestos de interés.

## REFERENCIAS

- Castronera-Sánchez I., Natali L., y Cavallini A. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis*, Mill. Morphogenetic ability and nuclear DNA content. *Plant-Science* 55 (1): 53-59.
- Cavallini A., Natali L., Cionini G., Sassoli O. y Castorena-Sanchez I. 1993 *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. Quantitative DNA variations in regenerated plants. *Plant-Science* 91 (2): 223-229.
- Granados-Sanchez D. y Castañeda-Perez A. 1988. SÁBILA, *Aloe barbadensis* Mill. Planta agroindustrial (medicinal) del desierto. Universidad Autónoma Chapingo. Primera edición. México. Pp 50.
- Grindlay D. y Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117-151.
- Gui Y.L., Xu T.Y., Gu S.R., Liu S.Q., Zhang Z., Sun G.D., Zhang Q. 1990. Studies on stem tissue culture and organogenesis of *Aloe vera*. *Acta Botanica Sinica* 32 (8): 606-610
- Hart L., Kuis L., Labadie R.P., Van-den Berg A. y Van Dijk H. 1989. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. *Planta-Medica* 55 (6): 509-512

- Hutter J.A., Salman M., Stavinoha W., Satsangi N., Williams R., Stroeper R. y Weintraub S. 1996. Antiinflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products* 59(5):541-543.
- McDaniel H.R. y McAnalley B.H. 1987. Evaluation of poymannoacetate (Carrasyn) in the treatment of AIDS. *Clinical Research* 35: 483A.
- Meyer H. y Van Staden J. 1991. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ-Culture* 26 (3):167-171.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Racchi M.L. 1988. Using *in vitro* culture to study the biosynthesis of secondary products in *Aloe ferox*. *Rivista-di-Agricoltura Subtropicale- e-Tropicale* 82 (4): 707-714.
- Reynolds T. y Dweck A. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 3-37
- Saks Y. y Barkaigolan R. 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology & Technology* 6 (1-2):159-165.
- Saloem R., Faizi S., Deeba F., Shaheen B. y Husain Qazi M. 1997. Anthrones from *Aloe barbadensis*. *Phytochemistry* 45: (6)1279-1282
- Salisbury F. y Roos C. 1994. *Fisiología Vegetal*. Ed. Iberoamericana. México. Pp 759.
- Udupa S.L., Udupa A.L., Kulkarni D.R 1994. Anti-inflammatory and wound healing properties of *Aloe vera*. *Fitoterapia* 65: 2, 141-145.
- Verpoorte R., Van der Heijden R., Hoopen H.J.G. y Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21:467-479.

Weiserma J.H. 1998. USDA.ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm Resources laboratory, Beltsville, Maryland. [www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?41)

**TEMA 5:**

**Estudios moleculares de ADN en especies del género**

*Aloe* en Costa Rica

## Estudios moleculares de ADN en especies del género

### *Aloe* en Costa Rica

Garro Giovanni<sup>1</sup>, Rocha Oscar<sup>1</sup> y Valdez Marta<sup>1</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

[garro@itcr.ac.cr](mailto:garro@itcr.ac.cr), [orocha@biologia.ucr.ac.cr](mailto:orocha@biologia.ucr.ac.cr), [mvaldez@biologia.ucr.ac.cr](mailto:mvaldez@biologia.ucr.ac.cr)

#### RESUMEN

Este trabajo presenta resultados preliminares en la escogencia de procedimientos adecuados para el estudio y caracterización molecular de especies del género *Aloe* presentes en el país. En este sentido se logró la escogencia del material vegetal adecuado para la extracción de ADN, lo cual permitió seleccionar los ápices de las hojas más jóvenes de las plantas. Además se logró escoger dos procedimientos eficientes para la extracción de ADN en cantidades y calidad satisfactoria para llevar a cabo análisis moleculares de amplificación azarosa de segmentos de ADN polimórfico (RAPDs). Se obtuvo amplificaciones de ADN, utilizando imprimadores del código OPK (19) y OPA (07) de la casa comercial Operón, en cinco especies de *Aloe* colectadas en el área metropolitana. De esta forma, este trabajo representa el primer informe sobre estudios moleculares y caracterización genética de especies de *Aloe* en el país.

**Palabras clave:** *Aloe barbadensis*, amplificación azarosa de ADN polimórfico (RAPD).

## INTRODUCCIÓN

El género *Aloe* pertenece a la familia Alocaceae, con un centro de origen localizado en Sudáfrica. Este género posee cerca de 350 especies y las plantas son principalmente herbáceas y de hojas suculentas. Las células del parénquima de las hojas contienen varios compuestos de uso medicinal, cuyos principios activos han sido utilizados en la fabricación de gran cantidad de productos comerciales, tanto médicos como cosméticos. Recientemente, numerosos estudios han asociado la planta con actividad antimicótica, cicatrización de heridas, curación de problemas gástricos y propiedades anti-inflamatorias (Grindlay y Reynolds 1986, Udupa *et al.* 1994, Hutter *et al.* 1996).

En Costa Rica no se tiene información acerca de la distribución de las especies del género. En general se cree que las plantas han sido introducidas y su cultivo ha sido sobre todo de tipo ornamental. Hasta hace unos pocos años se han establecido empresas dedicadas al cultivo de la especie mejor conocida a nivel mundial, *Aloe barbadensis*.

Dada la importancia comercial de la especie por sus múltiples usos terapéuticos, es importante llevar a cabo un estudio sistemático que aporte información sobre las especies presentes en el país, su localización y la existencia de eco-tipos que pueden presentar variación en cuanto al contenido de los compuestos activos. Estos estudios permitirían contar con perfiles genéticos de las especies presentes en el país tal que se pueda hacer un uso adecuado del recurso fitogenético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron plantas de cinco especies del género *Aloe* en el Valle Central y se cultivaron en condiciones de invernadero. La identificación morfológica de las plantas se realizó con la ayuda de taxónomos del Herbario Nacional y de literatura disponible

(Byrd 1970, Sajeve y Costanzo 1994, Weiserma 1998). En el anexo 1 se adjuntan fotografías de 4 de las plantas identificadas y utilizadas en el presente estudio.

Para los análisis moleculares, se utilizaron los protocolos de extracción de ADN de uso rutinario en los laboratorios de biología molecular (Dellaporta *et al.* 1983, Caetano-Anollés y Gresshoff 1997), así como el sistema de extracción con columnas “*Wizard® PCR Preps DNA purification system*” de la casa comercial Promega. Para la amplificación de los fragmentos de ADN polimórfico, se utilizaron los protocolos publicados por Harris (1998) y Caetano-Anollés y Gresshoff (1997). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador (*RapidCycler*) de enfriamiento por aire, de la marca IDAHO TECHNOLOGY™. Los imprimadores (“primers”) utilizados para la amplificación al azar de los fragmentos de ADN vegetal fueron de la casa Operón Technologies, con los códigos OPK del 1 al 19. Se utilizó la enzima “*taq*” polimerasa de la casa PROMEGA™. Los electroforegramas de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en geles de agarosa (SIGMA™) al 1,5%. Ellos fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

## RESULTADOS

### Material vegetal

Se colectaron plantas en el Valle Central y en algunos centros de cultivo de plantas medicinales. En el cuadro 1 se muestran las plantas colectadas y su identificación morfológica. La identificación taxonómica se realizó según Sajeve y Costanzo (1994), Byrd A. (1970), Jardín Botánico de Hawaii ([www.botan\\_hawaii.edu](http://www.botan_hawaii.edu)), y el Proyecto de

Librería Digital de la Universidad de California, Berkeley. Se contó también con la ayuda de los curadores del Herbario del Museo Nacional de Costa Rica

**Cuadro 1:** Código de muestras de especies de *Aloe* colectadas para análisis genético por marcadores de ADN (RAPDs) en el Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Biología, UCR.

CÓDIGO	LOCALIDAD DE COLECTA	ESPECIE
1	Bagaces, Guanacaste. Rancho Aloe	<i>Aloe barbadensis</i>
2	Liberia, Guanacaste. Sábila Industrial	<i>Aloe barbadensis</i>
3	(Cañas Dulces) Liberia, Guanacaste. Sábila industrial	<i>Aloe barbadensis</i>
4	Cartago centro. Jardín particular	<i>Aloe saponaria</i>
5	San Pedro, San José. Alrededor de la Escuela de Biología, UCR.	<i>Aloe saponaria</i>
6	San José, Jardines del Museo Nacional	<i>Aloe saponaria</i>
7	Barba de Heredia, Jardín Particular	<i>Aloe arborescens</i>
8	Paraiso, Cartago, Costado este del Estadio	<i>Aloe arborescens</i>
9	San José, Jardines del Museo Nacional	<i>Aloe arborescens</i>
10	Barrio Córdoba, San José	<i>Aloe spinosissima</i>
11	Barva de Heredia, Jardín Particular	<i>Aloe spinosissima</i>
12	Las Colinas, Guápiles	<i>Aloe barbadensis</i> , variedad ?
13	Las Colinas, Guápiles	<i>Aloe barbadensis</i> , variedad ?

Nota: De esta colecta se escogieron la muestra 1, 4, 7, 10 y 12 para realizar los análisis moleculares

#### Extracción de ADN total.

Para llevar a cabo los análisis moleculares de las especies se escogió un procedimiento eficiente para la extracción de ADN total de alta calidad. Debido a la naturaleza del material vegetal que presenta hojas crasulentas, así como una alta cantidad de agua y de sustancias mucilaginosas, se escogieron las hojas más jóvenes de las plantas. Así, se obtuvo mejor material que permitió la eliminación total del gel (mucílago) y de otras sustancias, que no interfirieran en la pureza del ADN extraído. En las hojas más jóvenes de la planta (3-5 cm) se cortaron segmentos apicales de aproximadamente 2 cm. Con este material se llevó a cabo varios ensayos con los procedimientos usados en el laboratorio, y así encontrar un procedimiento adecuado que permitiera una extracción de

ADN total limpio y en la gran cantidad. El procedimiento convencional escogido para la extracción de ADN total a partir de hojas jóvenes de *Aloe* se muestra en el Cuadro 2. Este ha dado resultados satisfactorios en términos de calidad del ADN obtenido (fig. 1).

**Cuadro 2.** Procedimiento utilizado en la extracción de ADN de hojas jóvenes de *Aloe* para análisis genético por "RAPDs", según Dellaporta *et al.* (1983).

Paso	Procedimiento	Vol- Peso	Tiempo	Temp.	R.P.M
1	Depositar tejido en tubo de 1,5 mL	1 cm <sup>2</sup>			
2	Agregar buffer de extracción	700 µl			
3	Macerar tejido con un pistilo de vidrio				
4	Incubar		30min.		
5	Dejar enfriar				
6	Agregar cloroformo octanol		2 min.		
7	Mezclar suavemente		2 min		
8	Centrifugar				6000
9	Extraer sobrenadante y pasar tubo 1,5 mL	700 µl			
10	Repetir pasos 6 a 8				
11	Agregar NaCl 5 M y mezclar	0,5vol			
12	Agregar etanol 95% frío y mezclar (0,6v isopropanol)	2 vol			
13	Incubar		noche	5 °C	
14	Centrifugar		10 min.		10000
15	Descartar sobrenadante				
16	Lavar precipitado con etanol 70%	750 µl			
17	Secar		40-60min	40 °C	
18	Resuspender en TE	100 µl			
19	Agregar 1 µl de Rnasa (opcional)				

En la figura 1 se muestra el electroforegrama en gel de agarosa al 1,0% con las extracciones de ADN para cada una de las muestras colectadas. Se puede notar la alta cantidad de ADN que se pudo extraer con el procedimiento seleccionado.



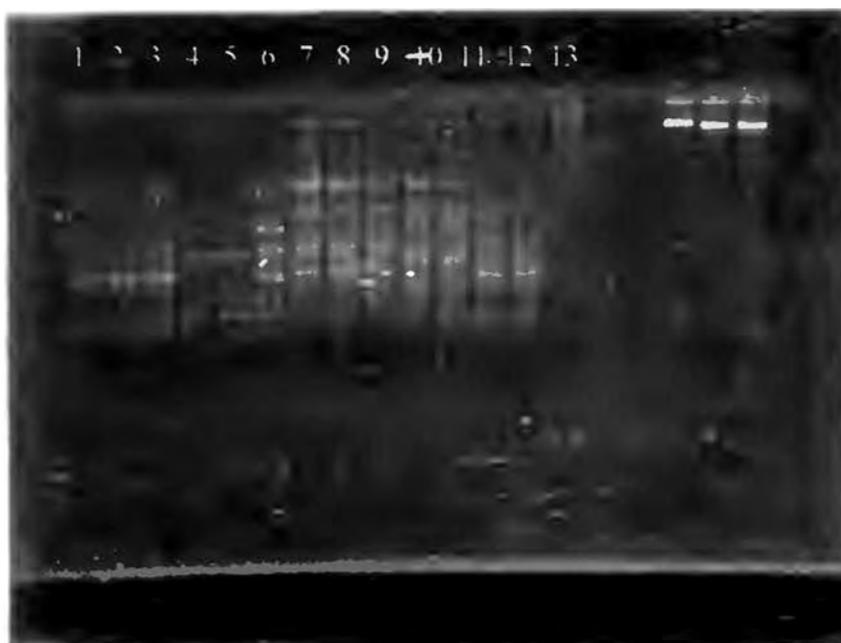
**Figura 1.** Electroforegrama que muestra la migración del ADN total extraído a partir de hojas jóvenes de plantas de *Aloe*. La codificación del 1-13 corresponde a las muestras de cinco diferentes especies del género *Aloe* en Costa Rica, según el cuadro 1. El análisis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1,5%.

**Nota:** El pozo 14 muestra un control positivo y los 15,16 y 17 corresponden a muestras no relacionadas con el presente trabajo.

Por otro lado se realizó la extracción de ADN siguiendo el procedimiento del sistema *Wizard*® (Promega), el cual mostró resultados satisfactorios con respecto a la calidad y cantidad del ADN obtenido. Se observó un resultado muy similar al encontrado con el procedimiento convencional antes descrito.

### **Estandarización de condiciones para amplificación de fragmentos de ADN.**

Las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo utilizando imprimadores (primers) de ADN de la casa Operón. Se utilizaron 21 imprimadores y se trabajó con las condiciones de temperatura, tiempo de reacción en PCR, concentración de ADN, así como programas de amplificación de ADN, siguiendo lo recomendado por Dellaporta *et al.* (1983), Rafalski (1997), Erlich (1989) y Harris (1998). La figura 2 muestra el electroforegrama de todas las muestras en una dilución 1/10 para el ADN, con el imprimador OPK 19 (Cuadro 4) en la reacción de PCR. Se puede notar un alto polimorfismo en el patrón de bandas generado con este imprimador. Sin embargo, las bandas son un poco difusas por lo que se debe mejorar el procedimiento.



**Figura 2.** Electroforegrama de las 13 muestras y de un control negativo (14) en dilución 1/10 al utilizar el imprimador OPK 19. El gel de agarosa utilizado fue al 1,5%.

**Nota:** Los pozos 16,17 y 18 corresponden a nuevas extracciones de ADN total para las muestras 1,2 y 4.

Se realizaron diversos ensayos para encontrar las condiciones óptimas de trabajo con el termociclador. Se examinaron diferentes temperaturas de hibridación (“annealing”) así como varios programas generales para la reacción en cadena de la polimerasa. Esos ensayos permitieron la escogencia de un procedimiento que mejoró los resultados en términos de su repetibilidad. El procedimiento mencionado se detalla en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Procedimiento utilizado en el termociclador IDAHO TECHNOLOGY™ para la reacción de PCR con muestras de *Aloe*, con imprimadores OPK.

Procedimiento de PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización. inicial	98 C	5 seg	1 ciclo
Desnaturalización 2	94C	5 seg.	30 ciclos
Annealing	34C	7 seg	" "
Extensión	72 C	70 seg	" "
Extensión final	72C	4 minutos	1 ciclo

Con el procedimiento presentado en el cuadro 3 y se logró obtener los resultados que se muestran en el electroforegrama de la figura 3. Este gel corresponde a una migración de todas las muestras con el imprimador OPK 19, luego de haber realizado una limpieza del ADN con un sistema (Kit) comercial de limpieza “*Wizard*®” (Promega), que permite eliminar impurezas en el ADN y así aumentar su calidad.



**Figura 3.** Electroforegrama que muestra la amplificación de fragmentos polimórficos al azar de ADN de 13 muestras de *Aloe* con el imprimador OPK 19 de la casa OPERON. Se utilizó un gel de agarosa al 1,5%.

**Nota:** El pozo 14 corresponde a una muestra de ADN total.

En la figura 3, se puede notar el polimorfismo de las muestras con el imprimador OPK19. En algunos de esos ensayos no se obtuvieron buenos resultados debido a que la intensidad de las bandas fue muy difusa.

**Cuadro 4.** Secuencias de los imprimadores OPK 19 y OPA 07 (Operón) utilizados en el análisis de amplificación azarosa de ADN polimórfico de especies de *Aloe*.

Imprimador	Secuencia
OPK 19	CACAGGCGGA
OPA07	GAAACGGGTG

Además de la serie de 20 imprimadores OPK, se trabajó con algunos de la serie OPA, 07, y 13. Para estos se observó amplificación polimórfica con el OPA 07 (Cuadro 4). Sin embargo, en los ensayos realizados, aún no se ha logrado un electroforegrama con una migración clara de las bandas.

## DISCUSIÓN

Existen muy pocos informes en la literatura sobre trabajos a nivel de ADN en plantas de *Aloe*. Toothman (1999) informa acerca de métodos para la caracterización genética de algunas especies de *Aloe* al utilizar marcadores moleculares de ADN. En este sentido, la presente investigación representa un aporte novedoso al conocimiento de las técnicas para el estudio molecular de la especie de interés, *Aloe barbadensis*, así como para algunas otras representantes del género en Costa Rica. Se logró establecer las condiciones adecuadas para la extracción de ADN en cantidades altas y con pocas impurezas, a partir de las hojas jóvenes de las plantas de *Aloe*

Una de las mayores dificultades para obtener ADN de alta pureza fue la presencia de un "gel mucilaginoso" encontrado en la epidermis de las plantas. En él, se encuentran los principales compuestos activos de la planta y su cantidad es muy alta en las hojas (Grindlay y Reynolds 1986). Ese problema fue resuelto al utilizar segmentos apicales de las hojas más jóvenes de la planta, con los cuales los métodos de extracción antes mencionados dieron resultados satisfactorios.

Se han establecido las condiciones de trabajo en la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación azarosa de fragmentos de ADN, de tal forma que de los 21 imprimadores estudiados, se logró obtener productos de amplificación de ADN de las plantas de *Aloe*, con los imprimadores OPK 19 (figs. 2 y 3) y OPA 07 (no mostrado).

Los perfiles térmicos utilizados en el programa del termociclador (IDAHO TECHNOLOGY™), aún no permiten observar una estabilidad del patrón de bandas de los diversos análisis llevados a cabo. No obstante se continuará con los ensayos para tener resultados estables y así obtener la información necesaria para la elaboración de un dendograma que permita obtener los perfiles genéticos de las especies bajo estudio.

## REFERENCIAS

- Byrd A. 1970. Exotic 3. Pictorial cyclopedia of exotic plants. Rettus Company. USA.
- Castorena-Sanchez I, Natali L., Cavallini A. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis*, Mill. Morphogenetic ability and nuclear DNA content. Plant-Science,-Irish-Republic., 55: 1,53-59.
- Cavallini A., Natali L., Cionini G., Sassoli O., y Castorena-Sanchez I. 1993 *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Quantitative DNA variations in regenerated plants. Plant-Science. 91: 2, 223-229.
- Caetano-Anollés y Gresshoff P.1997. DNA Markers. Protocols, Applications and overviews. Wiley-Liss Inc. USA. Pp 364.
- Dellaporta S.L., Wood J and Hichs J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version 11. Plant Molecular biology Reporter 1 (14): 19-21.
- Erlich H. 1989. PCR TECHNOLOGY. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press. United States of America.
- Grindlay D. y Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. Journal of Ethnopharmacology 16: 117-151.
- Harris E. 1998. A Low-Cost Approach to PCR. Appropiade transfer of biomolecular techniques. Oxford University Press. New Cork
- Hawaii Botany Garden. 2004. [www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/aloe.html](http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/aloe.html)
- Hutter J.A., Salman M., Stavinoha W., Satsangi N., Williams R., Streeper R. y Weintraub S. 1996. Antiinflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. Journal of Natural Products 59(5):541-543.
- Rafalski J.A. 1997. En: Caetano-Anollés y Gresshoff.1997. Capítulo 5. DNA Markers. Protocols, Applications and overviews. Wiley-Liss Inc. USA. . pp 364.

Sajeva M. and Costanzo M. 1994. Succulents. The illustrated dictionary. Cassell.  
London, UK. 457 p.

Toothman P. 1999. Method of identifying Aloe using PCR. Univera Pharmaceuticals  
Inc. US Patent & Trademark Office. United States Patent 6,001,572.

University of California, Berkeley. 2004. Digital Library project.

<http://elib.cs.berkeley.edu/photos/flora/sci-A.html>.

Weiserma, J.H. 1998. USDA.ARS. National Genetic Resources Program. Germoplasm  
Resources Information Network.(GRIN). Online database. National Germoplasm  
Resources laboratory, Beltsville, Maryland.  
[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?4](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?4)

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Se ha desarrollado un procedimiento para la inducción de callogénesis a partir de dos fuentes de explantes: base de hoja y semillas
2. En los callos provenientes de base de hojas, se realizó la detección de compuestos de interés farmacológico:
  - 2.1 Detección cuantitativa de *Acemanan*(HPLC)
  - 2.2 Detección cualitativa de antraquinonas (TLC).
  - 2.3 Este es un primer informe de detección del polisacárido *Acemannan* en cultivos celulares de esta especie.
  - 2.4 El sistema desarrollado, podría utilizarse como base para estudio posteriores que tengan como objetivo la inducción de mayor producción del compuesto (precursores, nutrientes limitados)
3. En los callos obtenidos a partir de semillas, se logró:
  - 3.1 Inducción de callogénesis somática
  - 3.2 Se observaron eventos de embriogénesis somática. Sin embargo estos resultados deben ser confirmados por análisis histológicos
  - 3.3 Este es el primer informe sobre inducción de callogénesis y eventos de embriogénesis somática a partir de semillas en *A. barbadensis*.
4. Se llevó a cabo la descripción de eventos de reproducción sexual para la especie bajo las condiciones de cultivo utilizadas.
  - 4.1 Este es un primer informe para eventos de reproducción sexual en la especie *A. barbadensis*
5. Se han desarrollado las condiciones de trabajo iniciales para el estudio molecular de la especie.
  - 5.1 Se escogió un material vegetal adecuado para la extracción de ADN
  - 5.2 Se escogieron métodos de extracción de ADN (convencional y *Wizard*®)
  - 5.3 Se establecieron perfiles térmicos para la reacción de PCR e imprimadores que muestran amplificación positiva (OPK 19, OPK 07).
  - 5.4 Este es el primer informe sobre estudios preliminares moleculares y de caracterización genética de especies del género *Aloe* presentes en el país.

## PERSPECTIVAS DE TRABAJOS FUTUROS.

El trabajo realizado en esta tesis ha permitido investigar una serie de aspectos en relación con el cultivo *in vitro* de *A. barbadensis*, su biología reproductiva, la identificación de compuestos de importancia farmacológica en cultivos celulares, así como aspectos de caracterización genética de la especie. Debido a la diversidad de temas sobre los cuales se trabajó, algunos de éstos han sido estudios preliminares, por lo cual se han abierto varias líneas de investigación para trabajos posteriores. Tal es el caso de los estudios de contenido de Acemannan en los callos provenientes de bases de hojas, en donde se podría realizar nuevos tratamientos para inducir la producción de altos contenidos del polisacárido. Por otro lado se podrían realizar análisis de contenido del compuesto en callos provenientes de semillas. Estos trabajos podrían generar nuevos conocimientos acerca del metabolismo del polisacárido, los que en algún momento permitirían contar con sistemas de alta producción en condiciones *in vitro*.

Además sería importante continuar con el estudio molecular de las especies del género *Aloe* presentes en el país. Estos estudios permitirían contar con perfiles genéticos de la especie, los cuales sería muy útiles en términos de certificar el material vegetal obtenido de las plantaciones nacionales, así como sus derivados. La colecta e identificación de especies de *Aloe* presentes en el país sería de gran ayuda para el conocimiento del recurso fitogenético y así, poseer alternativas para posibles eventos de mejoramiento genético de la especie *A. barbadensis*.

## ANEXO 1



Figura 1. Plantas adultas de *Aloe barbadensis* Miller, cultivadas en campo durante el período de floración. Se observa las hojas largas (0.5-0.7 m), anchas (5-12 cm) y gruesas (2.5 cm) con espinas en el borde, crecimiento en roseta, caulescente.



Figura 2. A y B, Planta de *Aloe spinosissima* Hort. en floración creciendo a la orilla de una calle (Barrio Córdoba). Se puede notar el crecimiento erecto y la inflorescencia con un solo racimo de flores. Las hojas son delgadas (0.5-1.0 cm), angostas (2-3 cm) con alta cantidad de espinas en el borde.



Figura 3. Plantas de *Aloe saponaria* Haw., que crecen en invernadero durante su floración



Figura 4. Plantas de *Aloe saponaria* Haw., que crecen junto a otras de *Aloe barbadensis* en condiciones de invernadero. Se puede observar el crecimiento en roseta, caulescente y hojas delgadas (0.5-1.0 cm), angostas (5-8 cm) con espigas en los bordes y manchas blancas.



Figura 5. Planta de *Aloe arborescens* que crecen en los jardines de los Tribunales de Justicia en Cartago. Se puede notar la gran longitud de hojas (1.0-1.2 m) e inflorescencia (1.5 m) . Las hojas son gruesas (1.5-2.5 cm) y anchas (7-15 cm).



Figura 6. Inflorescencia de *Aloe arborescens* que muestra 5 ramificaciones con racimos terminales y gran número de flores (45-55/ racimo).

## ANEXO 2

PRIMERS RAPDS				
IDENTIF. DEL PRIMER	LONGIT. (nt)	concentracion en OD s	uM	SECUENCIA
OPK-1	10	0,5	5,0	CATTCGAGCC
2	10	0,5	5,0	GTCTCCGCAA
4	9	0,5	5,6	CCGCCAAAC
5	10	0,5	5,0	TCTGTGAGG
6	9	0,5	5,6	CACCTT*CC
7	10	0,5	5,0	AGCGAGCAAG
8	10	0,5	5,0	GAACACTGGG
9	10	0,5	5,0	CCCTACCGAC
11	10	0,5	5,0	AATGCCCCAG
12	10	0,5	5,0	TGGCCCTCAC
13	10	0,5	5,0	GGTTGTACCC
14	10	0,5	5,0	CCCGCTACAC
15	10	0,5	5,0	CTCCTGCCAA
16	10	0,5	5,0	GAGCGTCGAA
17	10	0,5	5,0	CCCAGCTGTG
18	10	0,5	5,0	CCTAGTCGAG
19	10	0,5	5,0	CACAGGCGGA
20	10	0,5	5,0	GTGTCGCGAG

Figura 1: Secuencias y concentración original de los imprimadores del código OPK (OPERON Technologies), utilizados en el estudio molecular de las especies de *Aloe*.