

Durabilidad de la capacidad germinativa del polen en *Aloe vera* (L.) Burm. f. y *A. saponaria* Haw.

Durability of the pollen germinative capacity in *Aloe vera* (L.) Burm.f. and *A. saponaria* Haw.

José del Valle Imery Buiza* y Yaritza Cárdenas Ramírez

Laboratorio de Genética Vegetal, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela. Apdo. 245. E-mail: jimery@sucre.udo.edu.ve * Autor para correspondencia

Recibido: 21/09/2006

Fin de arbitraje: 25/10/2006

Revisión recibida: 06/11/2006

Aceptado: 14/11/2006

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta germinativa de los granos de polen (GP) de *Aloe vera* y *A. saponaria* a diferentes tiempos después de la antesis (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). Se cultivaron GP sobre medios a base de agar (4 g.l⁻¹) y sacarosa (0,06 mol.l⁻¹), para determinar el porcentaje de germinación y el tiempo hasta alcanzar al menos el 1 % de germinación. Una muestra de polen colectada en antesis, fue cultivada durante 60 min y se observaron tubos polínicos de 106,7±24,8 µm en *A. vera* y 165,6±22,5 µm en *A. saponaria*. Los GP disminuyeron su capacidad de germinación inicial (51 % en *A. vera*; 45 % en *A. saponaria*) y aumentaron el tiempo hasta la emisión de sus tubos polínicos (11 min en *A. vera*; 14 min en *A. saponaria*), a medida que transcurrían las horas de almacenamiento bajo condiciones de laboratorio. El polen de *A. saponaria* resultó más sensible a los efectos del envejecimiento, inhibiéndose su germinación (0 %) entre 72 y 96 h; mientras que en *A. vera*, esta incapacidad de germinación se observó entre 120 y 144 h. El tiempo máximo hasta germinación de los GP fue de 27 min (120 h) en *A. vera* y 57 min (72 h) en *A. saponaria*. La escasa durabilidad de la capacidad germinativa del polen de ambas especies, sugiere que para la mutagénesis de estas células reproductivas, se realicen los tratamientos durante las primeras 24 h después de la antesis.

Palabras clave: *Aloe*, polen, tubo polínico, viabilidad *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the germinative response of the pollen grains (PG) from *Aloe vera* and *A. saponaria*, to different times after anthesis (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h). PG on agar (4 g.l⁻¹) and sucrose (0.06 mol.l⁻¹) means were cultivated, to determine germination percentage and the time until the germination reached 1 % at least. A sample of pollen collected at anthesis was cultivated *in vitro*. After 60 min, pollen tubes from *A. vera* reached a length of 106.7±24.8 µm compared with a length of 165.6±22.5 µm from *A. saponaria*. Initial germinative capacity of the PG (51 % in *A. vera*; 45 % in *A. saponaria*) diminished, and germination time until pollen tubes emission (11 min in *A. vera*; 14 min in *A. saponaria*) increased with time of storage in laboratory conditions. *A. saponaria* pollen was more sensitive to the aging effects, being germination inhibited (0 %) at 72-96 h; while in *A. vera*, this germination inability was observed at 120-144 h. 57 min and 27 min were the maximum times until the germination of the GP stored during 120 h and 72 h in *A. vera* and *A. saponaria*, respectively. Low durability of the pollen germinative capacity in both species, suggests that the treatments for mutagenesis of these reproductive cells, may be carried out during the first 24 hours after anthesis.

Kew words: *Aloe*, pollen, pollen tube, *in vitro* viability.

INTRODUCCIÓN

La viabilidad de los granos de polen *ex situ*, usualmente es determinada empleando métodos de tinción con colorantes como acetocarmín, yoduro de potasio, azul de metileno y fucsina básica, orceína, búfalo black, etc. (Singh, 2003). En estas pruebas, se consideran granos de polen viables a los intensamente coloreados y estériles a los menos coloreados o acromáticos (Marks, 1954; Cequea, 1985). No obstante, la mayoría de estos métodos se basan en la afinidad de las células por determinadas sustancias

colorantes, que generalmente sobrestiman la fertilidad del polen y escasamente pueden determinar el poder germinativo real de los granos de polen o la capacidad de extensión de los tubos polínicos (Jahier, 1996). Para evaluar con mayor precisión la fertilidad masculina de numerosas especies vegetales se han establecido procedimientos *in vitro* que hacen posible la germinación del polen bajo condiciones controladas (Hodgkin, 1983; Heslop-Harrison, 1987; Schoper *et al.*, 1987; Steer y Steer, 1989; Pierson y Cresti, 1992; Singh, 2003).

La familia Aloaceae comprende a los géneros *Aloe*, *Gasteria*, *Haworthia*, *Lomatophyllum*, *Chortolirion*, *Poellnitzia* y *Astroloba*, con casi 700 especies, nativas de África, Madagascar, Arabia e islas del Océano Índico (Carter, 1994; Rowley, 1997; Smith y Steyn, 2004). Dentro de este grupo vegetal, *Aloe vera* (L.) Burm.f. (= *A. barbadensis* Mill.), conocida popularmente como sábila o zábila, se destaca como una de las especies de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a sus múltiples propiedades medicinales (Añez y Vásquez, 2005). En América, esta planta fue introducida durante la ocupación española y actualmente se cultiva desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, explotándose principalmente en la industria de cosméticos, fármacos, alimentos y bebidas terapéuticas (Davis, 1997; Judd *et al.*, 1999).

La creciente incidencia de bacteriosis en plantaciones de *A. vera* localizadas en Aruba (De Laet *et al.*, 1994), México (Aranda y Fucikovsky, 1999) y Venezuela (González *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 1999, 2001; Lugo, 1999; Contreras *et al.*, 2001; Lugo y Medina, 2001; Guevara *et al.*, 2002; Guevara, 2004), han promovido la realización de investigaciones que conduzcan a la obtención de variedades promisorias. Los alcances del programa de mejoramiento que se desarrolla en el laboratorio de genética vegetal de la Universidad de Oriente (Cumaná-Venezuela), comprenden la evaluación inicial de variabilidad genética entre las poblaciones locales (Albornoz y Imery, 2003), inducción de mutaciones (Imery, 2000; Imery y Cequea, 2001a; Imery, 2006b), evaluación de estabilidad cromosómica en tetraploides artificiales (Imery y Cequea, 2001b), hibridación y caracterización de progenies con diferentes niveles de ploidía (Imery, 2006a) y otros estudios complementarios, como el reconocimiento de congéneres que puedan ser utilizados como donadores de la tolerancia a *Erwinia chrysanthemi* (Salmerón y Imery, 2004, 2005), anomalías reproductivas (Imery, 2001, 2002, 2004; Imery y Cequea, 2002; Velásquez y Imery, 2004, 2005) y determinación de cruzabilidad interespecífica (Imery, 2005).

La necesidad de continuar generando variabilidad genética en *A. vera* y en una de sus potenciales donadoras (*A. saponaria*), conlleva a considerar el tratamiento de granos de polen con radiaciones ionizantes, antes de ejecutar futuros cruzamientos intra e interespecíficos. No obstante, para el traslado de estas células reproductivas hacia

los centros de irradiación, se requiere de tiempo y condiciones de almacenamiento, que hasta ahora se desconocen. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar (*in vitro*) los efectos del tiempo de almacenamiento post-antesis sobre la capacidad germinativa del polen de *A. vera* y *A. saponaria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Todas las plantas empleadas en este trabajo se conservan en la colección *in vivo* de especies suculentas (UDO-Biología), bajo los registros 104/0096 (*A. saponaria*) y 129/0187 (*A. vera*). Los especímenes fundadores provenían originalmente de viveros comerciales (*A. saponaria*) y de una población ubicada a 10°36'34" N, 64°07'18" O (*A. vera*), los cuales fueron identificados morfológicamente según Carter (1994) y Van-Wyk y Smith (1996). En diciembre de 2004, se seleccionaron 20 plantas de cada especie, libres de enfermedades y con presencia de inflorescencias prominentes en inicio de floración. Al momento de la colecta (6:30 a 7:15 a.m.), se eligieron flores que presentaran una o más anteras sin abrir. Estas flores fueron depositadas en frasco seco y trasladadas inmediatamente al laboratorio para monitorear la dehiscencia del resto de las anteras y coleccionar el polen. Se emplearon pinceles suaves para remover todo el contenido de las anteras y depositarlo dentro de cápsulas de Petri. Las cápsulas fueron selladas con parafilm y almacenadas durante 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h, en lugar oscuro y fresco (a 24 ° C, dentro de estantes cerrados y esterilizados con hipoclorito de sodio 1,5 % v/v), antes de realizar los cultivos *in vitro*. En esta investigación la antesis fue definida como el momento en el cual abre el perianto y expone las anteras (Badillo *et al.*, 1985). Por otra parte, tomando en cuenta que el polen colectado provenía de flores en antesis, los tiempos de almacenamiento del polen fueron identificados como tiempos después de antesis (TDA).

Microcultivos

Se siguió la metodología propuesta por Sunderland y Roberts (1977), con algunas modificaciones estandarizadas por los autores. Se preparó una mezcla homogénea de agua de grifo, agar-agar (4 g.l⁻¹) y sacarosa (0,06 mol. l⁻¹), la cual fue esterilizada en autoclave a 15 atm por 15 min y vertida sobre portaobjetos horadados minutos antes de

iniciar el cultivo. Se dispersó el polen sobre los medios de cultivo, cuantificando el tiempo desde el contacto con esta superficie hasta la germinación de al menos 1 % de los granos de polen, observados en un campo microscópico fijo. Se dejaron a ambiente de laboratorio por 60 min (sobre el mesón a 24 ° C y cubiertos por cápsula de Petri para evitar la desecación y contaminación). Se evaluaron las láminas a 100X, bajo contraste de luz en un microscopio Bausch y Lomb PBV-4B, considerando a un grano de polen como germinado cuando su eje polar resultaba menor o igual a la longitud del tubo polínico emitido (Kalinganire *et al.*, 2000). Como ensayo preliminar, se evaluó el crecimiento del tubo polínico durante 60 min de cultivo *in vitro*, en una muestra fija de granos de polen colectados al momento de la antesis. Esta evaluación se realizó cada 5 min en 10 láminas por especie. El recuento de granos de polen germinados (GPG) y no germinados (GPNG) se utilizó para calcular el porcentaje de germinación en cada campo de observación ($\%G = GPG / (GPG + GPNG)$). Todos los materiales y utensilios utilizados en este trabajo fueron debidamente esterilizados en autoclave antes de su utilización.

Diseño experimental

El experimento se planificó originalmente bajo un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones y arreglo factorial entre especies y TDA. De esta manera se analizó el porcentaje de germinación del polen; sin embargo, el agotamiento de la respuesta germinativa en una de las especies dificultó la determinación de posibles efectos de interacción de ambos factores sobre el tiempo de germinación del polen, razón por la cual esta variable fue examinada bajo un diseño de bloques al azar, en donde las combinaciones especie-TDA fueron consideradas de forma integral como tratamientos. El procesamiento estadístico incluyó ANOVA, regresión y prueba de ámbitos múltiples de Duncan a un nivel de significación del 5 % (Sokal y Rohlf, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación, el medio de cultivo a base de agar y sacarosa ofreció suficiente consistencia, concentración y suministro de minerales para promover la germinación *in vitro* de los granos de polen de *A. vera* y *A. saponaria* (Figura 1). Durante la primera hora de cultivo, los tubos polínicos emitidos por algunos granos de polen

colectados al momento de la antesis, se extendieron hasta $106,7 \pm 24,8 \mu\text{m}$ en *A. vera* y $165,6 \pm 22,5 \mu\text{m}$ en *A. saponaria* (Figura 2). En muchas angiospermas, la velocidad del crecimiento del tubo polínico *in vitro* varía de 60 a 20000 $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Bryndum y Hedegart, 1969; Hoekstra, 1983). Esto es aproximadamente el 10 % de lo observado *in vivo* (Brewbaker y Majumdar, 1961); sin embargo, es un estimador útil de la viabilidad del polen en experimentos comparativos. En base a esto, las observaciones realizadas durante la primera hora de cultivo, sugieren que *A. saponaria* presenta inicialmente un mayor potencial reproductivo, debido al crecimiento superior de sus tubos polínicos, que se traduce en mayores expectativas de transportar con éxito los gametos masculinos. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la existencia de algunas anomalías genéticas en la microsporogénesis de *A. vera* (Imery, 2002, 2004), lo cual incide sobre la fertilidad del polen (Jackson, 1976, 1985; Cequea, 1985; Cequea *et al.*, 2003) y, por consiguiente, debe afectar también su respuesta germinativa bajo las condiciones experimentales de este trabajo.

La determinación de los efectos del almacenamiento, se realizó en 3497 ± 406 granos de polen en cada combinación de especie-TDA. La capacidad germinativa de estas células reproductivas, manifestó una considerable dependencia con respecto al TDA en ambas especies de *Aloe* (Figura 3). El porcentaje de germinación en *A. vera*, se redujo

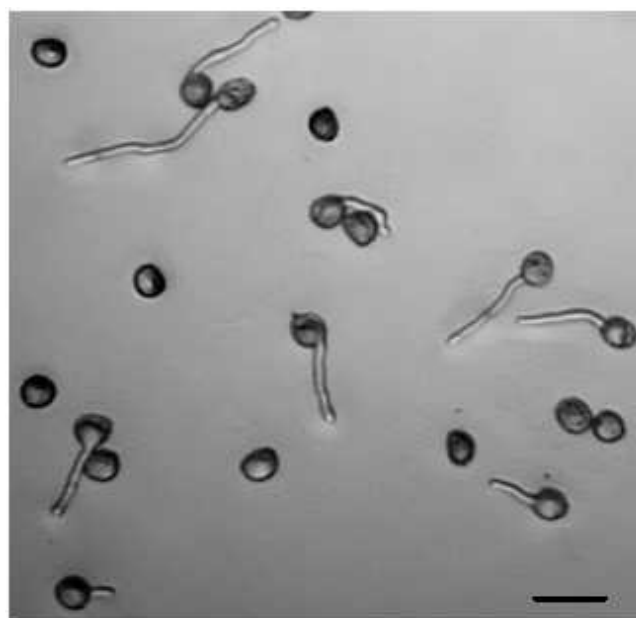


Figura 1. Granos de polen de *Aloe saponaria* almacenados durante 12 h y cultivados en medio a base de agar y sacarosa. Barra = 50 μm .

progresivamente desde 51 %, al momento de la antesis (0 h), a 46 % durante las primeras 24 h y luego declinó aceleradamente hasta su inhibición completa entre las 120 y 144 h. En *A. saponaria*, esta tendencia fue aún más acentuada, descendiendo la germinación por debajo del 40 % a partir de las 12 h, con inhibición completa entre 72 y 96 h (Figura 3a). Esta variabilidad intrínseca de las especies y su interacción con los TDA fue reflejada en el análisis de varianza (cuadro 1) y detallada por la comparación de promedios (cuadro 2). De igual manera, el tiempo de germinación también manifestó diferencias significativas entre los tratamientos (cuadros 3 y 4), aumentando proporcionalmente entre las 0 a 12 h de almacenamiento en ambas especies, continuando así con ligeras variaciones en *A. vera*; mientras aumenta abruptamente en *A. saponaria*, haciéndose más notable a las 48 y 72 h (Figura 3b). Ninguna de las especies de *Aloe* registró germinación de polen por encima de las 144 h después de la antesis.

En general, el crecimiento del tubo polínico estuvo afectado negativamente por el tiempo de almacenamiento del polen antes del cultivo *in vitro*. Esto puede ser provocado por numerosos factores, entre ellos, el agotamiento de las proteínas de reserva en el grano de polen (Tanaka y Wakabayashi, 1992), o el cese de actividades enzimáticas encargadas de la elongación de la pared del tubo polínico (Li y Linskens, 1983; Geitmann *et al.*, 2000). En

angiospermas, la germinación y desarrollo del tubo polínico está ya predeterminado en el grano de polen, al tiempo que son liberados en la antesis. Los ribosomas, ARNm y ARNt, requeridos para la germinación, son sintetizados durante la maduración del polen y persisten hasta que son empleados para el proceso germinativo. Esta germinación y el rápido desarrollo del tubo polínico, así como, la presíntesis de ARNm y síntesis de proteínas, varían entre las especies vegetales (Mascarenhas, 1975, 1978). La alteración de estos procesos bioquímicos durante el almacenamiento del polen, debe contribuir en la respuesta diferencial observada en las especies de *Aloe*, siendo el polen de *A. saponaria* el más sensible a los efectos perjudiciales del envejecimiento.

Otras especies vegetales como *Crotalaria retusa* (Shivanna *et al.*, 1990, 1991) y *Malus domestica* (Bellani *et al.*, 1984), han conservado el poder germinativo de sus granos de polen, aún luego del almacenamiento durante 30 y 365 días, respectivamente. Obviamente, la longevidad del polen en estas especies deber estar asociada a una mayor capacidad de latencia y a la protección proporcionada por una cubierta mucho más impermeable y robusta que la presente en *Aloe* (Steyn *et al.*, 1998).

Finalmente, desde el punto de vista de la aplicación de estos resultados, es recomendable realizar cualquier tratamiento mutagénico durante las

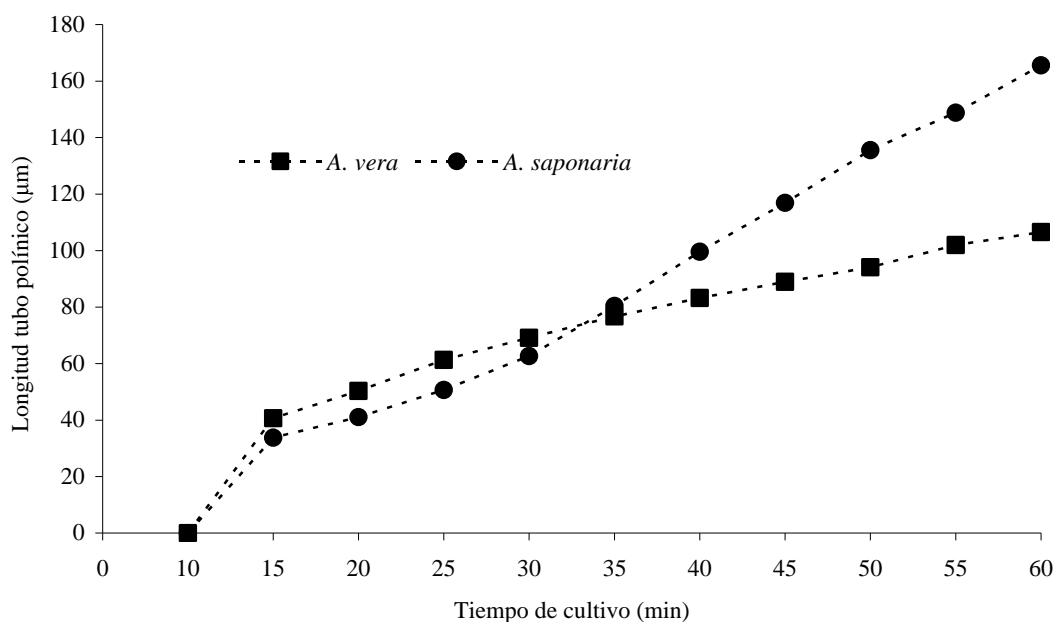


Figura 2. Crecimiento del tubo polínico (µm) en granos de polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*, colectados al momento de la antesis y evaluados durante 60 min de cultivo *in vitro*.

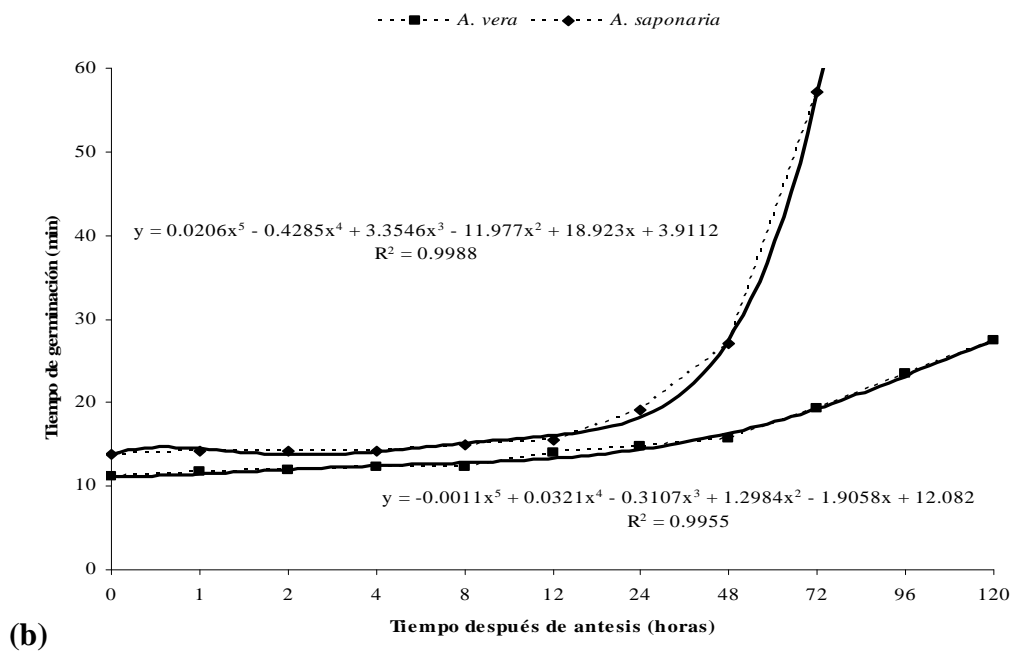
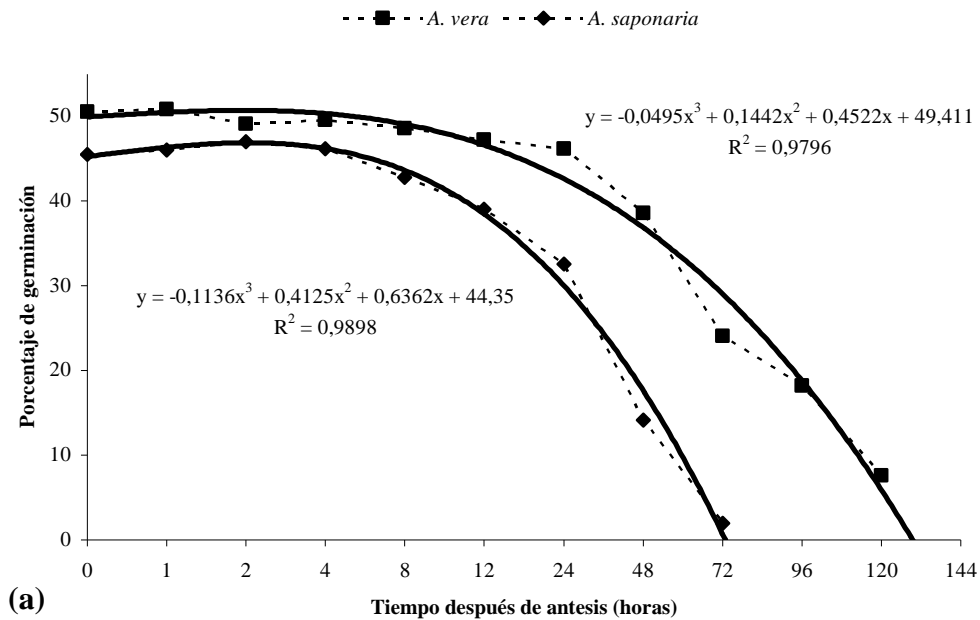


Figura 3. Porcentaje (a) y tiempo (b) de germinación del polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*, bajo condiciones *in vitro* y a diferentes tiempos después de la antesis. Líneas continuas indican modelos de regresión con sus respectivas fórmulas.

primeras 24 horas después de haber colectado el polen en antesis y ejecutar los cruzamientos lo más rápido posible, a fin de garantizar la germinación del polen y obtención de progenies. Por otra parte, debe tomarse en cuenta, que además de los efectos nocivos

del tiempo, las irradiaciones u otros procedimientos que conlleven a la mutagénesis de estas células, seguramente reducirán también su capacidad germinativa, por lo cual se deberá emplear el polen inmediatamente después del tratamiento.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo a base de agar-agar (4 g.l⁻¹) y sacarosa (0,06 mol.l⁻¹) resultó adecuado para evaluar la germinación *in vitro* del polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*. La capacidad germinativa del polen,

bajo condiciones *in vitro*, alcanzó la inhibición completa entre 120 a 144 h después de la antesis en *A. vera* y entre 72 a 96 h en *A. saponaria*. Para la inducción de mutaciones, se recomienda realizar los tratamientos durante las primeras 24 h después de la colecta del polen en antesis.

Cuadro 1. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación del polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*, bajo condiciones *in vitro* y diferentes tiempos después de la antesis.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	4	0,00011	0,000028	1,01 ns
Especies (A)	1	0,68483	0,684830	24468,57 *
TDA (B)	11	8,96249	0,814772	29111,44 *
A * B	4	0,63804	0,058004	2072,45 *
Error Experimental	92	0,00257	0,000028	
Total	119	10,28805		

TDA: Tiempo después de antesis. Resultados a partir de datos transformados con $\arcsen\sqrt{x/100}$.

*: Significativo ($p \leq 0,05$) ns: no significativo ($p > 0,05$).

Cuadro 2. Prueba de promedios para el porcentaje de germinación del polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*, bajo condiciones *in vitro* y diferentes tiempos después de la antesis.

TDA	<i>A. vera</i>	Ámbitos †	<i>A. saponaria</i>	Ámbitos †
0	50,57	a	45,50	c
1	50,85	a	46,04	b
2	49,14	bc	47,01	a
4	49,55	b	46,20	b
8	48,63	c	42,83	d
12	47,25	d	39,06	e
24	46,19	e	32,58	f
48	38,57	f	14,16	g
72	24,06	g	1,92	h
96	18,17	h	0,00	i
120	7,59	i	0,00	i
144	0,00	j	0,00	i

TDA: Tiempo después de antesis (horas). Los valores representan promedios de cinco repeticiones.

† Prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$), a partir de datos transformados con $\arcsen\sqrt{x/100}$.

Letras iguales indican promedios estadísticamente similares dentro de cada especie.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el tiempo de germinación del polen (*in vitro*) entre las combinaciones de tratamientos (especies de *Aloe*-tiempos después de la antesis).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	4	0,025	0,006	2,32 ns
Combinaciones	19	90,395	4,758	1769,93 *
Error Experimental	76	0,204	0,003	
Total	99	90,624		

Resultados a partir de datos transformados con \sqrt{x} .

*: Significativo ($p \leq 0,05$) ns: no significativo ($p > 0,05$).

Cuadro 4. Prueba de promedios para el tiempo de germinación (min) del polen de *Aloe vera* y *A. saponaria*, bajo condiciones *in vitro* y diferentes tiempos después de la antesis.

TDA	<i>A. vera</i>	Ámbitos †	<i>A. saponaria</i>	Ámbitos †
0	11,11	a	13,88	d
1	11,70	b	14,16	de
2	11,90	bc	14,17	de
4	12,34	c	14,11	d
8	12,39	c	15,03	fg
12	13,97	d	15,49	gh
24	14,69	ef	19,20	i
48	15,66	h	27,10	k
72	19,32	i	57,19	l
96	23,52	j		
120	27,47	k		

TDA: Tiempo después de antesis (horas). Los valores representan promedios de cinco repeticiones.

† Prueba de ámbitos múltiples de Duncan ($p < 0,05$), a partir de datos transformados con \sqrt{x} .

Letras iguales indican promedios estadísticamente similares entre todos los tratamientos.

LITERATURA CITADA

- Albornoz, A. R. y J. Imery. 2003. Evaluación citogenética de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. de la península de Araya-Venezuela. *Ciencia (LUZ)* 11: 5-13.
- Añez, B. y J. Vásquez. 2005. Efecto de la densidad de población sobre el crecimiento y rendimiento de la zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 22: 1-12.
- Aranda, S. y L. Fucikovsky. 1999. *Erwinia chrysanthemi* causante de la pudrición de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.). <http://colpos.mx/ifit/entarcar/avances/019.html>. Última visita: 09 de diciembre de 2005.
- Badillo, V. M.; L. Schnee y C. Benítez. 1985. Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela. 7^{ed}. Espasande, S.R.L. Eds. Caracas, Venezuela. 270 p.
- Bellani, L.; A. Tagliassacchi and S. Sanchavinis. 1984. Viability of stored pollen grains of *Malus domestica*. Borhk as evaluated by the incorporation of labeled nucleic acid precursor. *Caryologia* 37: 323-330.
- Brewbaker, J. and S. Majumdar. 1961. Incompatibility and the pollen grain. *Recent Adv. Bot.* 2: 1503-1508.
- Bryndum, K. and T. Hedegart. 1969. Pollination of teak (*Tectona grandis* L. f.). *Silvae Genet.* 18: 77-80.
- Carter, S. 1994. Flora of tropical east Africa, Aloaceae. Royal Botanic Garden, Kew, U.K. 61 p.
- Cequea, H. 1985. Estudio citogenético de los autotetraploides de cinco especies de *Machaeranthra* (Compositae). *Acta Cient. Venez.* 36: 375-380.
- Cequea, H.; D. Díaz; J. Imery and M. Nirchio. 2003. Cytogenetic study of paracentric inversions in *Tridax procumbens* (Compositae). *Cytologia* 68: 329-333.
- Contreras, N.; N. Vargas; N. Gómez y A. Carrasco. 2001. Plantas de zábila afectadas por *Erwinia chrysanthemi* en los estados Falcón y Lara. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay, Venezuela.
- Davis, R. H. 1997. *Aloe vera*: a scientific approach. Vantage Press. NY, USA. 321 p.
- De Laat, P.; J. Verhoeven and J. Janse. 1994. Bacterial leaf rot of *Aloe vera* L. caused by *Erwinia chrysanthemi* biovar 3. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 81-84.
- Geitmann, A.; B. N. Snowman; A. M. C. Emons and V. E. Franklin-Tong . 2000. Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by

- the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant Cell* 12: 1239-1251.
- González, A.; J. Salomón; Z. Lugo; Y. Hernández y G. Trujillo. 1998. Bacteriosis en zábila (*Aloe vera*) causada por *Erwinia* sp. XLIV Reunión Anual de la Sociedad de Horticultura Tropical. Barquisimeto, Venezuela.
- Guevara, J. 2004. Diagnóstico de enfermedades bacterianas en cultivos de *Aloe vera* L. de la península de Araya-Venezuela. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente. 41 p.
- Guevara, J.; J. Imery; G. Trujillo y Y. Hernández. 2002. Incidencia de enfermedades bacterianas en plantaciones de *Aloe vera* L. de la península de Araya-Venezuela. LII AsoVAC. Barquisimeto, Venezuela.
- Hernández, R.; Y. Romero; J. Velázquez; M. Griman; N. Contreras y N. Vargas. 2001. Problemática fitopatológica de la zábila (*Aloe vera*) en el sector Las Ventosas del Municipio Colina del Estado Falcón. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay, Venezuela.
- Hernández, Y.; G. Trujillo y C. Muñoz. 1999. Pudrición bacteriana de plantas de zábila (*Aloe vera*). XVI Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, Venezuela.
- Heslop-Harrison, J. 1987. Pollen germination and pollen-tube growth. *Rev. Cytol.* 107: 1-18.
- Hodgkin, T. 1983. A medium for germinating *Brassica* pollen *in vitro*. *Eucarpia, Cruciferae Newsletter* 8: 62-63.
- Hoekstra, F.A. 1983. Physiological evolution in angiosperm pollen: possible role of pollen vigour. In: Mulcahy, D. L. (Eds.). *Pollen: Biology and implications for plant breeding*. NY Elsevier Sci. 240 p.
- Imery, J. 2000. Inducción de tetraploidía en *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). Tesis de Maestría. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 73 p.
- Imery, J. 2001. Protandria y autoincompatibilidad en *Aloe vera* L. LI AsoVAC. San Cristobal, Venezuela.
- Imery, J. 2002. Anormalidades cromosómicas en la microsporogénesis de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae) Trab. Asc. Agregado. Universidad de Oriente. 61 p.
- Imery, J. 2004. Anormalidades premeióticas en *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). LIV AsoVAC. Valencia, Venezuela.
- Imery, J. 2005. Cruzabilidad unidireccional en *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). LV AsoVAC. Caracas, Venezuela.
- Imery, J. 2006a. Caracterización genética de parentales e híbridos diploides [VS] y triploides [VVS] entre *Aloe vera* (L.) Burm.f. [2V, 4V] y *Aloe saponaria* Haw. [2S] (Aloaceae). Tesis doctoral. Postgrado en Botánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 163 p.
- Imery, J. 2006b. Radiosensibilidad y variaciones genéticas inducidas por rayos gammas en *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). VI Congreso Científico de la Universidad de Oriente. Pto. La Cruz, Venezuela.
- Imery, J. and H. Cequea. 2001a. Colchicine-Induced autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66: 409-413.
- Imery, J. y H. Cequea. 2001b. Evaluación citogenética de la generación M_1V_2 de tetraploides experimentales en sábila (*Aloe vera* L.). *Rev. UDO Agr.* 1: 29-33.
- Imery, J. y H. Cequea. 2002. Anormalidades cromosómicas en la microsporogénesis de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). *Acta Bot. Venez.* 25: 143-152.
- Jackson, R. C. 1976. Evolution and systematic significance of polyploidy. *Ann. Rev. Ecol.* 7: 209-234.
- Jackson, R. C. 1985. Genomic differentiation and its effect on gene flow. *Syst. Bot.* 10: 391-404.
- Jahier, J. 1996. *Techniques of plant cytogenetics*. Sci. Pub., Inc. New Hampshire, USA. 180 p.
- Judd, W. S.; C. S. Campbell; E. A. Kellogg and P. F. Stevens. 1999. *Plant systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer Ass., Inc. Massachusetts, USA. 548 p.
- Kalinganire, A.; C. E. Harwood; M. U. Slee and A. J. Simons. 2000. Floral structure, stigma receptivity

- and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (*Grevillea robusta* A. Cunn.). Ann. Bot. 86: 133-148.
- Li, Y. Q. and H. F. Linskens. 1983. Wall-bound proteins of pollen tubes after self- and cross pollination in *Lilium longiflorum*. Theor. Appl. Genet. 67: 11-16.
- Lugo, Z. 1999. Zábila: enfermedades y control. Rev. Fonaiap Divulga 63: 20-21.
- Lugo, Z. y R. Medina. 2001. Diagnóstico preliminar de enfermedades en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) en los municipios Colina, Federación, Miranda, Falcón y Sucre del estado Falcón. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay, Venezuela.
- Marks, G. E. 1954. An aceto-carmin glycerol jelly for use in pollen fertility counts. Stain Tech. 29: 277-283.
- Mascarenhas, J. 1975. The biochemistry of angiosperm pollen development. Bot. Rev. 41: 259-263.
- Mascarenhas, J. 1978. Ribonucleic acids and proteins in pollen germination. Palynology 1: 400-406.
- Pierson, E. and M. Cresti. 1992. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. Rev. Cytol. 140: 73-100.
- Rowley, G. D. 1997. A history of succulent plant. Strawberry Press. California, USA. 409 p.
- Salmerón, Y. y J. Imery. 2004. Caracterización de la sintomatología causada por *Erwinia chrysanthemi* en 22 especies de *Aloe* (Aloaceae). LIV AsoVAC. Valencia, Venezuela.
- Salmerón, Y. y J. Imery. 2005. Caracterización de la tolerancia a *Erwinia chrysanthemi* en 22 especies de *Aloe* (Aloaceae). XVI Congreso Venezolano de Botánica. Maturín, Venezuela. Saber 17(Supl. 1): 74-76.
- Schooper, J.; R. Lambert and B. Vasilas. 1987. Pollen viability, pollen shedding in maize. Crop Sci. 27: 27-31.
- Shivanna, K.; H. Linskens and M. Cresti. 1990. Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability *in vitro* and *vivo*. Sex. Plant Reprod. 2: 130-140.
- Shivanna, K.; H. Linskens and M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigor. Theor. Appl. Genet. 81: 38-42.
- Singh, R. J. 2003. Plant cytogenetics. 2^{ed}. CRC Press. Boca Ratón, USA. 463 p.
- Smith, G. F. and E. M. A. Steyn. 2004. Taxonomy of Aloaceae. In: Aloes, the genus *Aloe*. Reynolds, T. (Ed.). CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 15-36.
- Sokal, J. y J. Rohlf. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Edic. Madrid, España. 832 p.
- Steer, M. and J. Steer. 1989. Pollen tube tip growth. New Phytol. 111: 323-358.
- Steyn, E.; G. Smith; S. Nilsson and E. Grafstrom. 1998. Pollen morphology in *Aloe* (Aloaceae). Grana 37: 23-27.
- Sunderland, N. and M. Roberts. 1977. New approaches to pollen culture. Nature 270: 236-238.
- Tanaka, I. and T. Wakabayashi. 1992. Organization of the actin and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination. An analysis using cultured pollen protoplast of *Lilium longiflorum*. Planta 186: 473 – 482.
- Van-Wyk, B. E. and G. Smith. 1996. Guide to aloes of South Africa. Briza Edic. Pretoria, South Africa. 302 p.
- Velásquez, R. y J. Imery. 2004. Estudio fenológico reproductivo de *Aloe vera* (L.) Burm.f. y *Aloe saponaria* Haw. (Aloaceae) en condiciones de vivero. LIV AsoVAC. Valencia, Venezuela.
- Velásquez, R. y J. Imery. 2005. Biología reproductiva de *Aloe vera* (L.) Burm.f. y *Aloe saponaria* Haw. (Aloaceae). XVI Congreso Venezolano de Botánica. Maturín, Venezuela. Saber 17(Supl.1): 120-122.