

**EFFECTOS DE LA INDUCCIÓN ARTIFICIAL
DE LA POLIPLOIDÍA EN PLANTAS DE *ALOE VERA*(L.)**

TAMARA MOLERO-PAREDES¹ Y ÁNGELA MATOS²

¹*Departamento de Biología, Facultad de Humanidades y Educación,
Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A,
Estado Zulia, Venezuela
taymarajo@cantv.net*

²*Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A,
Estado Zulia, Venezuela
angi69@cantv.net, citogeneticavegetal@yahoo.com*

Resumen. Se determinó el efecto de la inducción artificial de la poliploidía sobre la estructura cromosómica y la morfología de plantas de *Aloe vera*, con el objetivo de emplear esta técnica en la mejora genética de la especie. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Genética y el Vivero de la Facultad de Humanidades, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Se aplicaron tratamientos a distintas concentraciones de colchicina (0,10% y 0,15%), diferentes tiempos de exposición (12 h y 24 h) y a temperaturas de 25 °C y 35 °C. Se empleó la técnica del aplastamiento de los tejidos para el estudio mitótico. Las características morfológicas estudiadas fueron: número de hojas, longitud, ancho, espesor y volumen foliar, número y longitud de dientes laterales, relación dientes laterales/ancho foliar y distancia entre dientes. La mayor cantidad de células poliploides se obtuvo con una combinación de 0,15% de colchicina por 24 h a 35 °C. La duplicación cromosómica en las células poliploides causó un incremento en la altura de las plantas y en la longitud, ancho, espesor y volumen foliar con respecto a las plantas diploides y quimeras, por lo que se estima que la poliploidización podría constituir una alternativa para aumentar la producción de biomasa celular en esta especie. *Recibido: 09 octubre 2007, aceptado: 19 marzo 2008.*

Palabras clave. *Aloe vera*, colchicina, poliploidía, estructura cromosómica, morfología.

EFFECTS OF ARTIFICIAL INDUCTION
OF POLYPLOIDY IN *ALOE VERA* (L.) PLANTS

Abstract. We determined the effect of artificial induction of polyploidy on chromosome structure and morphology in *Aloe vera* plants, with the objective of using this technique to better the genetic quality of the species. The investigation was done at the Cellular Biology and Genetics Laboratory and Greenhouse of the Humanities Faculty, University of Zulia, Maracaibo, Venezuela. Treatments included distinct concentrations of colchicine (0.10% and 0.15%), different exposure times (12 h and 24 h), and at temperatures of 25 °C and 35 °C. The standard squash technique was used on tissues for the mitotic study, and the morphological characteristics determined were: leaf number, length, width, thickness, and foliage volume, number and length of lateral teeth, lateral tooth/foliage width ratio, and inter-tooth distance. The largest quantity of polyploid cells was obtained with a combination of 0.15% colchicine at 24 h and 35 °C. Chromosome duplication in polyploid cells caused an increase in plant height, and in length, width, thickness and foliage volume, compared to diploid and chimera plants. For this reason, the technique of producing polyploidy in *Aloe vera* may constitute an alternative for increasing the cellular biomass production in this species. *Received: 09 October 2007, accepted: 19 March 2008.*

Key words. *Aloe vera*, colchicine, polyploidy, chromosome structure, morphology.

INTRODUCCIÓN

La zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f. = *Aloe barbadensis* Mill.] es una especie nativa de la costa noroccidental de África, la cual está siendo cultivada ampliamente por sus propiedades curativas y por la elaboración de subproductos para la industria medicinal y cosmetológica. Hoy se cultiva principalmente en África del Sur, América Latina y el Caribe (Imery-Buiza y Cequea-Ruíz 2001b, Vega *et al.* 2005).

Aloe vera es una planta de hojas alargadas, carnosas y ricas en agua, alcanza una altura de 50 a 70 cm; las hojas están agrupadas hacia el extremo, con tallos de 30 a 40 cm de longitud, poseen el borde espinoso dentado; las flores son tubulares, colgantes y amarillas. Esta planta es xerófila, lo que le permite adaptarse en áreas de poca disponibilidad de agua (Vega *et al.* 2005).

Muchas propiedades han sido atribuidas a esta planta, por ejemplo su acción desinfectante, antiviral, antibacteriana, antimicótica, laxante, protección contra la radiación, antiinflamatoria e inmunostimuladora. Ayuda en los

desórdenes intestinales tales como estreñimiento atribuyéndosele acción antidisentérica, antihemorroidal y cicatrizante (Reynolds y Dweck 1999, Choi y Myung-Hee 2003, Bozzi *et al.* 2007).

Las propiedades medicinales que posee esta planta se debe en parte a la presencia de compuestos fenólicos considerados metabolitos secundarios. Dentro de ellos la aloína (también llamada barbaloina), la isobarbaloina, aloesina y aloe-emodina poseen probadas propiedades medicinales y cosméticas, por lo que han sido usadas desde hace mucho tiempo para la industria farmacéutica, en la alimentaria, como aditivos, saborizantes, colorantes y en elaboración de fragancias. Además estos compuestos están implicados en los mecanismos de defensa frente a agresiones del medio ambiente y de herbívoros (Matos 2005, Esteban *et al.* 2001).

Una alternativa para aumentar la producción de estos metabolitos secundarios es la inducción artificial de poliploidía. Algunos compuestos químicos, como por ejemplo la colchicina, han logrado incrementar la producción de metabolitos secundarios por la duplicación cromosómica que produce en las células y por los cambios en la morfología de las plantas (Broeckling *et al.* 2005).

En *Valeriana wallichii* D.C., la colchicina incrementó seis veces más la producción de valepotriatos, además que generó la producción de nuevos compuestos no presentes en los parentales (Becker y Chavadej 1985). Tetraploides de *Artemisia annua* ($2n = 36$) fueron obtenidas con este mismo inhibidor mitótico por Wallaart *et al.* (2000) y la producción de artemisina, un metabolito secundario útil en el tratamiento de la malaria, se incrementó en un 0,46% en peso seco con respecto al 0,33% de sus parentales diploides. De Jesús-Gonzalez y Weathers (2003) también obtuvieron tetraploides estables en cultivos *in vitro* de *Aloe annua* con colchicina logrando producciones de artemisina de 3 a 6 veces mayores que las logradas por los clones diploides y mejor desarrollo y crecimiento. Varias especies del género *Scoparia* fueron reproducidas en cultivo *in vitro* enriquecido con diferentes concentraciones de colchicina lo que permitió lograr la obtención de tetraploides estables y algunas plantas quimeras. Las plantas modificadas presentaron diferencias significativas en el tamaño de las flores, hojas y el diámetro del tallo con respecto a las plantas control (Escandón *et al.* 2005).

A pesar de las aplicaciones que ha tenido este alcaloide en la mejora de plantas de interés medicinal, pocas especies del género *Aloe* han sido sometidas a la acción de la colchicina para inducir mayor producción de

metabolitos secundarios o para someterlas a programas de mejoramiento genético. El primer estudio genético en esta planta fue realizado en la India por Sutaria (1932), quien identificó por primera vez el cariotipo de *A. vera* formado por 14 cromosomas distribuidos en dos grupos claramente diferenciados por su tamaño y morfología. Sapre (1978) realizó estudios cariomorfométricos en poblaciones de la misma región caracterizando a cada par de homólogos de acuerdo a la longitud de sus brazos y por la presencia y ubicación de constricciones secundarias y satélites.

Los estudios citogenéticos realizados en zábila indican que el número básico de esta especie fue de $x = 7$ cromosomas, distribuido en cuatro cromosomas acrocéntricos grandes (L1-L4) de 12 a 18 μm y tres cromosomas submetacéntricos pequeños (S1-S3) de 4 a 6,5 μm (Brandham 1971). Algunos autores señalan que este grupo vegetal es un modelo de estabilidad cariológica, en función de la similitud en el número y la morfología de sus cromosomas mitóticos.

En Venezuela se han realizado varios estudios citogenéticos en zábila. Matos y Molina (1997) indicaron el complemento somático de esta planta compuesto por 14 cromosomas (8L + 6S), todos de tipo submetacéntrico, con longitudes que varían entre 5,55 y 17,76 μm . Albornoz-Aguilera e Imery-Buiza (2003) observaron cariotipos bimodales con 8 cromosomas grandes y 6 pequeños ($2n = 14 = 8L + 6S$) y la determinación del índice cromosómico permitió el reconocimiento de recursos fitogenéticos en plantas de zábila en el oriente de Venezuela.

Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001a, b) en el estado Sucre, fueron los primeros en aplicar diversos tratamientos de colchicina en zábila con el objeto de inducir poliploidía y se obtuvieron plantas autotetraploides con un cariotipo constante de $2n = 4x = 28$.

Tradicionalmente la producción de los metabolitos secundarios en zábila se ha obtenido a partir de plantas que crecen silvestres o en plantaciones, pero esto ha implicado que algunas de estas plantaciones hallan sido sometidas a estudio de nutrientes y una laboriosa selección de plantas a lo largo de varios años, para conseguir, en algunos casos, rendimientos mayores que el rendimiento conseguido a partir de una planta silvestre (Matos 2005). Aunado a esto, la reproducción vegetativa de zábila hace que la tasa de propagación sea muy lenta como para suplir la creciente demanda comercial de los productos y subproductos de esta planta tanto a nivel nacional e internacional (Piña 2005). Esto ha originado que la cantidad de metabolitos secundarios

obtenidos de plantas silvestres casi siempre sea muy baja, lo que ha hecho necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan incrementar la producción de los metabolitos secundarios en plantas reproducidas naturalmente, así como también el desarrollo de investigaciones que conlleven al reconocimiento de recursos fitogenéticos y la estimulación de variabilidad genética.

La inducción artificial de la poliploidía constituye una alternativa de utilidad que podría mejorar la producción de metabolitos secundarios en zábila, debido a la tendencia que presentan los autopoliploides de mostrar un mayor crecimiento de sus partes vegetativas en comparación a sus progenitores diploides, por lo que se puede lograr el aprovechamiento de la mayor cantidad de biomasa producida en la parte vegetativa de interés de esta planta, como son las hojas, de donde se extraen la mayor cantidad de metabolitos secundarios (Cubero 2003). La poliploidización está a menudo acompañada por un incremento en el tamaño de las células y cambios en la producción de metabolitos secundarios (Lavania 2005).

En este trabajo se desea determinar el efecto de la inducción artificial de la poliploidía sobre la estructura cromosómica y la morfología de plantas de *Aloe vera* a fin de evaluar su aplicación en la mejora genética de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL MATERIAL

Las plantas fueron obtenidas de un vivero comercial del municipio Maracaibo, Venezuela. Para minimizar la variabilidad, todos los hijuelos se escogieron de una misma planta (constituyendo, por lo tanto, un clon), de 4 meses de edad aproximadamente y una altura que osciló entre 10 a 15 cm. Luego de limpiar cuidadosamente el rizoma de los hijuelos, se indujo el crecimiento de las raíces por inmersión de bulbo radical en agua destilada hasta que se observó la formación de nuevos brotes. El bulbo se mantuvo en agua hasta que las nuevas raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm aproximadamente.

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Genética y el vivero de la Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Maracaibo, zona caracterizada por ser un bosque muy seco con una temperatura media anual promedio de 30 °C, una humedad relativa del 79% y una precipitación media anual de 500 mm (Ewel y Madrid 1976).

Para determinar el efecto de la concentración y tiempo de exposición a la colchicina se siguió la metodología empleada por Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001a). De esta manera, los bulbos con las nuevas raíces se sumergieron en una solución acuosa de colchicina a dos concentraciones de 0,10% y 0,15% (p/v) por un período de 12 ó 24 h. Adicionalmente, se consideró el factor temperatura, a 25 °C ó 35 °C. De las combinaciones de los niveles de estudio de cada factor, se obtuvieron ocho tratamientos que se especifican en la Tabla 1, con tres repeticiones cada uno. De igual manera se llevó el registro de las plantas controles. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo en cámara oscura con termómetros incorporados para controlar la temperatura. Las plantas tratadas y no tratadas se transplantaron en bolsas de polietileno de 1 kg que contenían una mezcla de suelo y abono orgánico en proporción 2:1 respectivamente, y luego se cultivaron en el vivero de la Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia.

Tabla 1. Tratamientos de *Aloe vera* con colchicina durante dos tiempos de inmersión y bajo diferentes temperaturas para inducir tetraploides.

Tratamiento	Concentración de Colchicina (%)	Tiempo de Exposición a la Colchicina (Horas)	Temperatura (°C)
1	0,10	12	25
2	0,10	24	25
3	0,10	12	35
4	0,10	24	35
5	0,15	12	25
6	0,15	24	25
7	0,15	12	35
8	0,15	24	35

ESTUDIO CITOGENÉTICO

El procesamiento del tejido radical para el estudio citogenético se realizó según lo descrito por Matos y Molina (1997) con algunas modificaciones. Este estudio se llevó a cabo en dos oportunidades: inmediatamente después de aplicar los tratamientos y cuatro meses luego de aplicado los tratamientos. Para este último estudio se seleccionaron las raíces desarrolladas a partir de los bulbos sumergidos en colchicina.

Se empleó el método de aplastamiento de los tejidos o “squash” para la preparación de las láminas microscópicas. Después de aplicado cada tratamiento, se procedió al corte del ápice radical entre las 0700 h y 0800 h. Se tomaron 3 raíces por planta, en total 9 raíces por tratamiento. Estas fueron colocadas en NaCl al 0,03% por 20 min y se fijaron en Carnoy (etanol: ácido acético glacial 3:1) por 24 h. Posteriormente se hidrolizó la pared celular con HCl al 18% durante 10 min. Para la tinción del tejido se empleó orceína al 2% (p/v) por 4 min. Las láminas microscópicas fueron estudiadas con objetivo de 40X y de inmersión (100X) en un microscopio Marca Olympus CX31 con cámara digital Olympus DP12. Se estudió un promedio de 2.740 células en cada raíz, de las cuales se escogieron 450 células metafásica/raíz y se tomaron aproximadamente 50 fotografías por cada raíz procesada, con un aumento de 1.000X. Se contaron y midieron los cromosomas mediante el programa Olympus Camedia y la determinación del número de cromosomas se realizó usando el número modal. La descripción de la morfología de los cromosomas se basó en la posición del centrómero establecida por Levan *et al.* (1964).

ESTUDIO MORFOLÓGICO

Transcurridos cuatro meses después de los tratamientos con colchicina, se realizó el estudio de la morfología de las plantas siguiendo la metodología empleada por Imery-Buiza (2006) con algunas modificaciones y Hernández-Cruz *et al.* (2002), donde se consideró: la altura de la planta; número de hojas (NH); longitud foliar (LH) en cm; ancho (AH) en cm; espesor foliar (EH) en cm; volumen foliar (VF), determinado a partir de las dimensiones de la hoja en cm^3 , empleando la fórmula $V = \pi \cdot LH \cdot AH \cdot EH / 12$; número de dientes laterales (NDL); longitud de dientes laterales (LDL) en cm; relación dientes laterales/ancho foliar (LD/AH), con la fórmula $R = 2 \cdot LDL / (2 \cdot LDL + AH) \cdot 100$, y distancia entre dientes mediante el cociente $DED = LH / NDL$ en cm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el cálculo del número de células metafásicas se empleó la fórmula: $n = Z^2_{\alpha/2} \cdot S^2 / e^2$, de Snedecor y Cochran (1984), donde $Z^2_{\alpha/2}$ tiene un valor de 1,96 según la estadística tabulada de la normal estándar, y S^2 , que significa la varianza muestral, es de 13,66. El error del muestreo (e^2) es de 0,05. Según esta fórmula, 50 células/raíz/campo microscópico a 100X es el valor mínimo de células que se deben analizar para obtener resultados estadísticamente confiables. El diseño experimental para el estudio de características morfológicas fue de bloques aleatorios con 3 repeticiones para cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el Programa SPSS, a través

de la cual se determinó la media de cada característica estudiada, el análisis de varianza con un solo criterio de clasificación y la prueba de Tukey ($P = 0,05$), para determinar deferencias significativas entre los tratamientos realizados.

RESULTADOS

ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

En el estudio citogenético llevado a cabo en las células meristemáticas del tejido radical de *Aloe vera* se pudo demostrar que las plantas tratadas con soluciones de colchicina al 0,10%, a diferentes tiempos de exposición y a diferentes temperaturas, presentaron pocos cambios citogenéticos siendo la mayoría de ellas diploides ($2n = 2x = 14$), con porcentajes menores al 25% de células poliploides (Fig. 1a, Tabla 2).

Las células de las plantas tratadas con concentraciones de 0,15% por 12 h a diferentes temperaturas exhibieron tanto células diploides ($2n = 14$) como tetraploides ($2n = 4x = 28$), es decir fueron quimeras (Fig. 1b), mientras que las plantas tratadas con esta misma solución de colchicina por 24 h a diferentes temperaturas presentaron mayores porcentajes de sus células con un número cromosómico de 28 (Fig. 1c), siendo menor en los tejidos tratados a 25 °C que a 35 °C (Tabla 2). Esto indica que el factor temperatura pudo influir en la eficiencia de los tratamientos para producir cambios en el número cromosómico.

La mayor eficiencia en la duplicación de los cromosomas se logró con la inmersión de los bulbos y las raíces en soluciones de colchicina a 0,15% por 24 h y a 35 °C (tratamiento 8), donde todas sus células mostraron ser tetraploides.

La estabilidad de las células poliploides en las raíces de las plantas tratadas se evaluó cuatro meses después de la aplicación de los tratamientos con colchicina en las plantas donde se observaron raíces con células diploides y poliploides (quimeras) y raíces con células poliploides (Tabla 3). Por lo tanto, sólo se consideraron las plantas de los tratamientos 2, 4, 6 y 8, que fueron las que dieron lugar a poliploides. En la Tabla 3, se muestra que las pocas células poliploides encontradas en plantas del tratamiento 2 rápidamente perdieron esta condición, debido a que todas las células analizadas presentaron un número de 14 cromosomas. En las raíces de las plantas con los tratamientos 4 y 6 se mantuvo la condición de quimeras, encontrándose tanto células con 14 y 28 cromosomas. Sólo en las células de las plantas tratadas en soluciones de colchicina a 0,15% por 24 h y a 35 °C se mantuvo la condición de tetraploide.

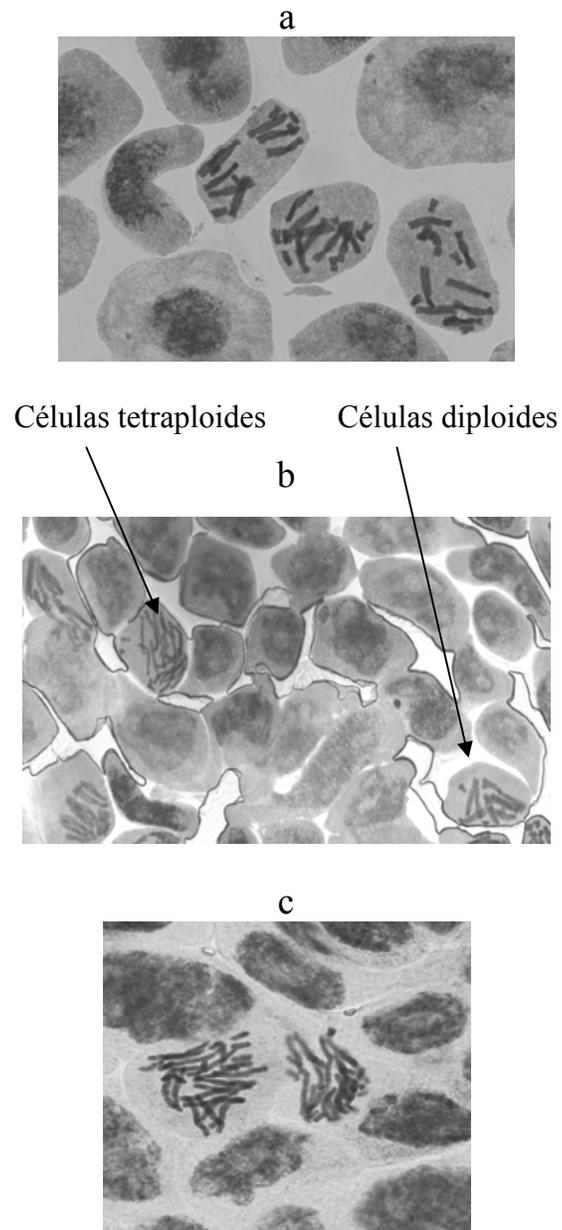


Figura 1. Número de cromosomas en las células meristemáticas de la plasta de *Aloe vera* tratadas con colchicina: a) células diploides $2n = 2x = 14$, b) quimeras: células diploides $2n = 2x = 14$ y tetraploides $2n = 4x = 28$, c) células tetraploides $2n = 4x = 28$.

Tabla 2. Número de cromosomas en *Aloe vera* luego del tratamiento con colchicina.

Tratamiento	No. de Células Diploides	% Células Diploides	No. de Células Tetraploides	% Células Tetraploides
1	450	100	-	0
2	409	90,88	41	9,11
3	450	100	-	0
4	350	77,77	100	22,22
5	450	100	-	0
6	281	62,44	169	37,55
7	450	100	-	0
8	0	0	450	100

Tabla 3. Número de cromosomas en *Aloe vera* cuatro meses después de tratadas con colchicina.

Tratamiento	No. de Células Diploides	% Células Diploides	No. de Células Tetraploides	% Células Tetraploides
2	450	100	-	0
4	313	69,5	137	30,4
6	252	56	198	44
8	-	0	450	100

El cariotipo de las células diploides estuvo conformado por 7 pares de cromosomas (14 cromosomas), de los cuales 4 fueron grandes (L) con respecto a los otros 3 pares que mostraron ser pequeños (S) (Fig. 2a). El cariotipo quedó constituido por 8 cromosomas subtelocéntricos y 6 submetacéntricos y la fórmula cromosómica fue: 8 Lst + 6 Ssm (Fig. 3). La longitud total de los cromosomas varió entre 3,01 y 13,45 μm (Tabla 4); siendo el rango de longitud para los grandes de 9,45 a 13,45 μm y para los pequeños osciló de 3,01 a 4,20 μm . Se observaron constricciones secundarias en el par L1 y L4.

Las células tetraploides presentaron un cariotipo bimodal constituido por $2n = 4x = 28$ cromosomas (14 pares), de los cuales 8 pares fueron cromosomas grandes y medianamente grandes (L) con longitudes variables entre 5,9 y 11,3 μm y 6 pares pequeños (S) con longitudes entre 2,3 y 3,85 μm (Tabla 5, Fig. 2b). El cariotipo quedó así conformado por 14 cromosomas largos subtelocéntricos, 2 medianamente largos submetacéntricos, 10 cromosomas

cortos submetacéntricos y 2 cortos subtelocéntricos, representado en la siguiente fórmula cariotípica: $14 \text{ Lst} + 2 \text{ Lsm} + 10 \text{ Sst} + 2 \text{ Ssm}$ (Fig. 4). La longitud total de los cromosomas osciló entre 2,3 y 11,3 μm .

a



b



Figura 2. a) Célula diploide en plantas de *Aloe vera*. Los círculos indican constricciones secundarias en los pares L1 y L4. b) Célula tetraploide en plantas de *Aloe vera*.

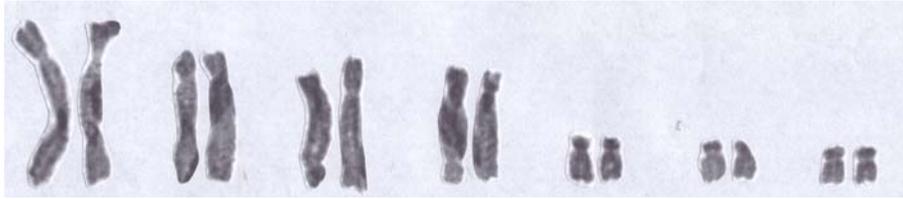


Figura 3. Cariotipo de célula diploide en plantas de *Aloe vera*.

Tabla 4. Cromosomas de *Aloe vera* ($2n=14$).

Par Cromo.	Cromo-soma	P. L. Total (μ)	P. Long. B. Largo (μ)	P. Long. B. Corto (μ)	P. Valor r Lar/Cor	Posición Centrómero
1	1	13,45	10,71	2,74	3,90	<i>st</i>
	2	12,97	10,20	2,77	3,68	<i>st</i>
2	3	12,17	9,51	2,65	3,58	<i>st</i>
	4	11,70	9,20	2,50	3,68	<i>st</i>
3	5	11,15	8,65	2,50	3,46	<i>st</i>
	6	10,77	8,17	2,71	3,01	<i>st</i>
4	7	10,17	7,72	2,44	3,16	<i>st</i>
	8	9,48	7,45	2,02	3,67	<i>st</i>
5	9	4,20	3,03	1,16	2,60	<i>sm</i>
	10	4,25	3,06	1,19	2,56	<i>sm</i>
6	11	3,61	2,32	1,28	1,81	<i>sm</i>
	12	3,72	2,72	1,00	2,72	<i>sm</i>
7	13	3,21	2,00	1,21	1,65	<i>sm</i>
	14	3,01	1,98	1,03	1,92	<i>sm</i>

Cromo. = Cromosómico, P. L. Total = Promedio Longitud Total, P. Long. B. Largo = Promedio Longitud Brazo Largo, P. Long. B. Corto = Promedio Longitud Brazo corto, P. Valor r Lar/Cor = Promedio del Valor r Brazo Largo/Brazo Corto, *st* = subtelocéntrico, *sm* = submetacéntrico.

Tabla 5. Cromosomas de *Aloe vera* ($2n = 28$).

Par Cr.	Cro.	Largo Total (μm)	Long. B. Largo (μm)	Long. B. Corto (μm)	Valor r Lar/Cor	P. Cen.
1	1	11,30	8,85	2,45	3,61	<i>st</i>
	2	10,95	9,00	1,95	4,61	<i>st</i>
2	3	10,95	9,15	1,80	5,08	<i>st</i>
	4	10,30	8,35	1,95	4,28	<i>st</i>
3	5	10,30	8,50	1,80	4,72	<i>st</i>
	6	10,30	8,65	1,65	5,24	<i>st</i>
4	7	10,30	8,00	2,30	3,47	<i>st</i>
	8	9,95	8,00	1,95	4,10	<i>st</i>
5	9	9,65	7,65	2,00	3,82	<i>st</i>
	10	9,65	7,70	1,95	3,94	<i>st</i>
6	11	9,00	7,35	1,65	4,45	<i>st</i>
	12	9,00	7,35	1,65	4,45	<i>st</i>
7	13	8,30	7,00	1,30	5,38	<i>st</i>
	14	7,30	5,50	1,80	3,05	<i>st</i>
8	15	6,30	4,65	1,65	2,81	<i>sm</i>
	16	5,90	3,75	2,15	1,74	<i>sm</i>
9	17	3,85	2,85	1,00	2,85	<i>sm</i>
	18	3,65	2,50	1,15	2,17	<i>sm</i>
10	19	3,30	2,35	0,95	2,47	<i>sm</i>
	20	2,95	2,00	0,95	2,10	<i>sm</i>
11	21	2,95	2,00	0,95	2,10	<i>sm</i>
	22	2,95	2,15	0,80	2,68	<i>sm</i>
12	23	2,95	2,00	0,95	2,10	<i>sm</i>
	24	2,95	2,00	0,95	2,10	<i>sm</i>
13	25	2,95	2,25	0,70	3,21	<i>st</i>
	26	2,45	1,85	0,60	3,08	<i>st</i>
14	27	2,30	1,50	0,80	1,87	<i>sm</i>
	28	2,30	1,60	0,70	2,28	<i>sm</i>

Cr. = Cromosómico, Cro. = Cromosoma, P. L. Total = Promedio Longitud Total, P. Long. B. Largo = Promedio Longitud Brazo Largo, P. Long. B. Corto = Promedio Longitud Brazo Corto, P. Valor r Lar/Cor = Promedio del Valor r Brazo Largo/Brazo Corto, P. Cen. = Posición del Centrómero, *st* = subtelocéntrico, *sm* = submetacéntrico.

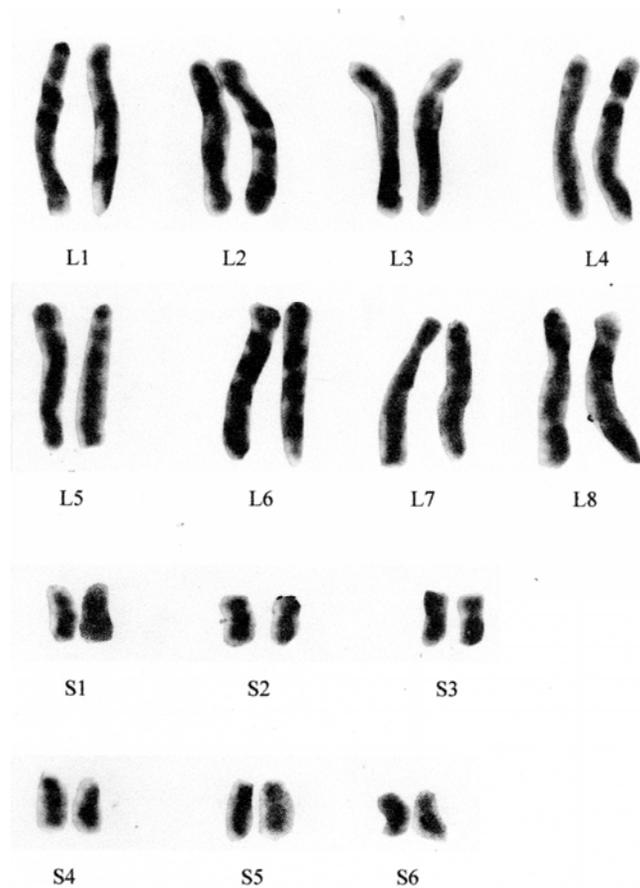


Figura 4. Cariotipo de célula poliploide en plantas de *Aloe vera*.

ESTUDIO MORFOLÓGICO

En el estudio de las características morfológicas se detectó que el tratamiento con solución de colchicina por 24 h causó efectos diferenciales con respecto a las plantas tratadas por 12 h y a las plantas control o no tratadas. Los resultados se muestran en la Tabla 6. La prueba de Tukey reveló que las características de NH, NDL, LDL, LD/AH y DED no permitieron detectar diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que las características de altura de la planta, LH, AH, EH y VF fueron significativamente ($P < 0,05$) diferentes entre los tratamientos aplicados.

Tabla 6. Características morfológicas de *Aloe vera* tratada con colchicina.

Tratamiento	Altura planta	NH	LH (cm)	AH (cm)	EH (cm)
0	31,27 ± 2,42	6,3 ± 0,94	21,58 ± 5,73	1,65 ± 0,57	3,75 ± 1,35
1	31,27 ± 2,48	6,0 ± 1,41	20,79 ± 5,43	1,63 ± 0,35	4,33 ± 0,82
2	35,10 ± 0,83	7,6 ± 1,25	23,53 ± 7,00	1,77 ± 0,57	4,69 ± 1,26
3	30,27 ± 2,74	6,3 ± 1,25	20,87 ± 5,79	1,48 ± 0,47	4,23 ± 0,98
4	30,27 ± 1,02	5,6 ± 2,30	21,58 ± 4,85	1,74 ± 0,41	4,35 ± 0,85
5	31,53 ± 3,59	6,3 ± 0,94	21,84 ± 5,46	1,64 ± 0,49	4,30 ± 0,89
6	35,20 ± 0,16	7,6 ± 2,49	22,99 ± 7,40	1,51 ± 0,41	4,41 ± 1,19
7	33,47 ± 1,41	5,3 ± 0,94	22,51 ± 5,36	1,83 ± 0,40	4,74 ± 0,96
8	38,70 ± 1,94*	7,0 ± 2,16	30,47 ± 5,51*	2,27 ± 0,42*	5,91 ± 0,78*

	VF (cm ³)	NDL	LDL (cm)	LD/AH (%)	DED (cm)
0	45,00 ± 38,06	20,1 ± 8,87	1,24 ± 0,68	55,73 ± 14,5	1,05 ± 0,37
1	43,27 ± 24,59	21,7 ± 9,90	1,58 ± 0,64	60,15 ± 21,7	0,81 ± 0,33
2	63,87 ± 50,62	22,6 ± 9,51	1,31 ± 1,10	49,69 ± 20,5	1,00 ± 0,28
3	41,79 ± 32,29	18,7 ± 10,58	1,21 ± 0,60	56,54 ± 19,8	1,01 ± 0,43
4	47,22 ± 27,04	23,9 ± 9,84	1,42 ± 0,56	58,37 ± 15,9	1,04 ± 0,98
5	46,91 ± 30,38	19,3 ± 7,01	1,04 ± 0,29	55,71 ± 6,86	1,23 ± 0,42
6	49,34 ± 36,66	16,6 ± 9,39	1,20 ± 0,63	54,69 ± 21,9	1,18 ± 0,59
7	57,18 ± 30,34	23,8 ± 10,51	1,28 ± 0,64	53,50 ± 17,3	0,89 ± 0,29
8	112,8 ± 46,47*	26,1 ± 6,73	1,24 ± 0,56	50,08 ± 10,4	1,22 ± 0,28

*Valores altamente significativos ($P = 0,05$). Los valores indican promedio ± desviación estándar.

Las plantas tratadas con la mayor concentración de colchicina (0,15%) y por 24 h de exposición al agente antimitótico presentaron la mayor altura (38,7 cm), con respecto al resto de los tratamientos. En cuanto a las características foliares, las hojas de las plantas de los tratamientos 2 y 8 fueron las que presentaron mayores longitudes y anchos foliares en comparación con las plantas de los otros tratamientos. En el cálculo del espesor foliar se destacaron las plantas del tratamiento 8 con un promedio de 5,91 cm. El volumen foliar es una de las características más interesantes desde el punto de vista de la producción de metabolitos y las plantas que presentaron mayores valores fueron las del tratamiento 8 con un promedio de 112,8 cm³ llegando a alcanzar volúmenes de 234,52 cm³.

En resumen, las plantas tratadas con solución de colchicina al 0,15% por 24 h a 35 °C (tratamiento 8) fueron las que alcanzaron los mayores valores de altura de la planta, longitud, ancho, espesor y volumen foliar, presentando valores altamente significativos ($P < 0,05$) con respecto al resto de los tratamientos (Figs. 5, 6 y 7). Estas características se corresponden con las plantas que presentaron todas las células poliploides en sus tejidos radicales luego de cuatro meses de aplicado el tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los tratamientos aplicados a las plantas de *A. vera* con soluciones de colchicina con mayor concentración (0,15%) y a mayor tiempo de exposición (24 h) produjo cambios en la estructura genética de las plantas tratadas duplicando el número de cromosomas que causó un incremento en los valores de características morfológicas de las plantas con células poliploides con respecto a las plantas diploides.

Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001b) indicaron que la escasa acumulación de biomasa y la gran permeabilidad de los primordios foliares en las yemas laterales de *A. vera*, favorecen la penetración del alcaloide hasta las capas celulares en actividad mitótica. Este efecto es más evidente al prolongar el período de inmersión hasta 24 h, aumentando así tanto el número de células meristemáticas en contacto con la colchicina como el tiempo de exposición al alcaloide. De este modo, se alcanza un nivel mayor de tetraploidía transmisible vegetativamente mientras que a tiempos cortos de exposición, el efecto directo sobre las células meristemáticas se reduce, debido a la poca acción sobre las capas superficiales y al contacto con células interfásicas en las que la colchicina no ejerce ninguna actividad antimitostática.

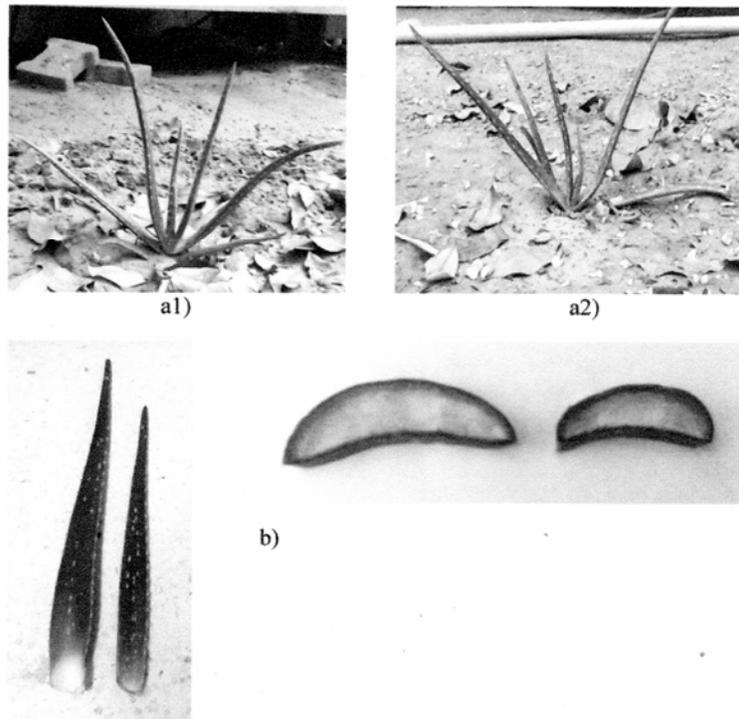


Figura 5. Características morfológicas entre plantas de *Aloe vera* cuatro meses después de tratadas con colchicina: a) altura de la planta, a1) diploide, a2) autotetraploide, b) longitud, ancho y espesor de la hoja en plantas autotetraploides (izquierda) y diploides (derecha).

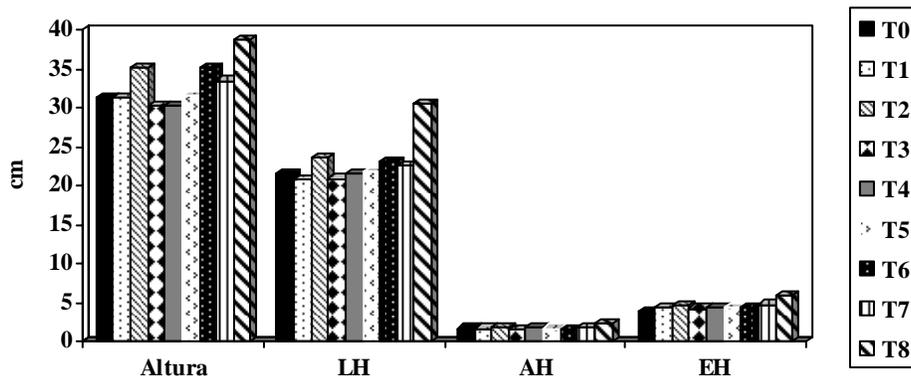


Figura 6. Altura de la planta, longitud, ancho y espesor foliar de plantas de *Aloe vera* tratadas con colchicina cuatro meses después del tratamiento.

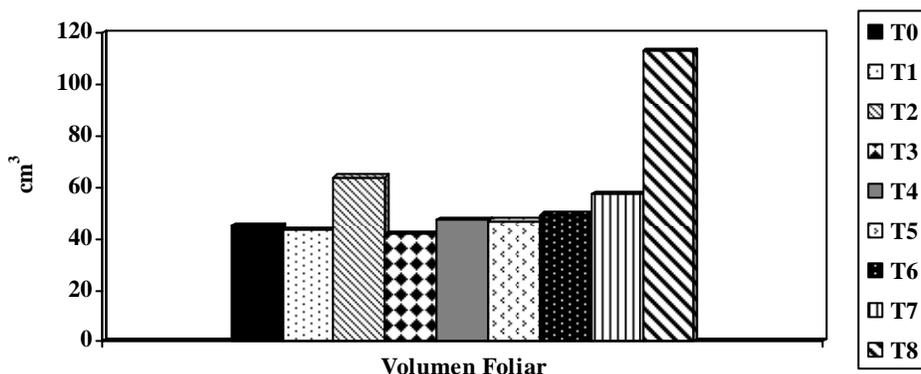


Figura 7. Volumen foliar de plantas de *Aloe vera* después de cuatro meses tratadas con colchicina.

En las investigaciones realizadas por Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001a, b), en las cuales se indujo la formación de plantas autotetraploides de *A. vera*, sólo se tomaron en consideración los factores concentración y tiempo de exposición del agente antimitótico. Sin embargo, en este trabajo se incluyó la evaluación del factor temperatura debido a que autores como Ganapathi y Kargi (1990) y Namdeo (2007) indicaron que, además de la concentración y el tiempo de exposición, hay otros factores exógenos que influyen en la efectividad de la colchicina como la etapa del cultivo y la temperatura. Al aumentar la temperatura se activa el trabajo del protoplasma lo que produce una elevación en la velocidad de crecimiento y en la tasa de división celular, producto de la aceleración de los procesos metabólicos en la planta (Santamarina *et al.* 2005).

En este trabajo se encontró que las raíces sometidas al tratamiento 8 presentaron tejidos con todas sus células en condición autotetraploide con respecto al porcentaje de células obtenido con el mismo tratamiento pero a 25 °C (37,5%) confirmando que el factor temperatura es importante al establecer la técnica más acertada para la inducción de la poliploidía en las plantas.

Es importante destacar que aproximadamente una semana después de aplicados los tratamientos, las plantas mostraron palidez y decaimiento generalizado producto posiblemente del tratamiento con el antimitótico o por el stress del trasplante del laboratorio al vivero, pero pronto estas características mejoraron al término de 15 días. Este fenómeno se ha observado en otros poliploides inducidos artificialmente, comportamiento que

ha sido atribuido a numerosos factores como reducción en la tasa de división celular, bajo crecimiento hormonal y una reducción del metabolismo (Patel y Verma 1999). Vandecandelaere *et al* (1997) explicaron que cuando las plantas son sometidas a efectos prolongados de un agente antimitótico en concentraciones altas pueden producirse disturbios funcionales los cuales ocurren por la inhibición en el ensamblaje de los monómeros de tubulina en los microtubulos lo que afecta temporalmente la movilidad y topografía de los componentes de las membranas y las funciones celulares en general.

Varios investigadores han estudiado los cariotipos de la familia Aloaceae (Brandham 1971, Sapre 1978, Matos y Molina 1997, Brandham y Doherty 1998, Imery-Buiza y Caldera-Andara 2002, Albornoz-Aguilera e Imery-Buiza 2003) reiterando que este grupo de plantas es un ejemplo de gran estabilidad cromosómica, debido a la observación de un cariotipo bimodal constante, $2n = 14$, con 8 cromosomas grandes y 6 pequeños, lo que coincide con lo encontrado en este trabajo.

En las células diploides, la clasificación de los cromosomas largos coincidió con los trabajos de Albornoz-Aguilera e Imery-Buiza (2003) quienes indicaron que estos cromosomas tienen una tendencia de un 75,0 a un 93,6% de tener centrómeros ubicados en la región subterminal (*st*). Estos mismos investigadores indicaron que los cromosomas cortos presentaron una tendencia variable de ser submetacéntrico (*sm*) para el par S1 y los pares S2 y S3 presentaron frecuencias de 51,3 a 60,6% para la clasificación metacéntrico (*m*); 38,7 a 46,8% *sm* y 0,6 a 1,9% *st*. En este trabajo, todos los pares de cromosomas cortos fueron submetacéntricos, lo que se ajusta a lo reportado por Imery-Buiza y Caldera-Andara (2002) quienes reportaron que los tres pares cortos son *sm*, pero en cuanto a los cromosomas largos encontraron un par largo *sm* y 3 pares largos *st*. Matos y Molina (1997) también indicaron que todos los cromosomas pequeños mostraron ser *sm* al igual que los cromosomas largos.

En general, las longitudes en los cromosomas de las células diploides encontrados en este trabajo (3,01 a 13,45 μm) son inferiores a los reportados por Albornoz-Aguilera e Imery-Buiza (2003), Imery-Buiza y Caldera-Andara (2002) y Matos y Molina (1997). En el primer caso, informaron longitudes variables entre 5,11 a 18,24 μm , los segundos autores indicaron longitudes de 4,3 a 18 μm y los terceros reportaron valores de 5,5 a 17,7 μm . Es probable que estas diferencias se deban al estadio de condensación de los cromosomas en las metafases analizadas en esta investigación o a otros factores tales como la temperatura, la disponibilidad de determinados nutrientes, la técnica

empleada en el tratamiento de las células y el tiempo de exposición de las células al antimitótico o a las diferencias entre sub-poblaciones de la especie, entre otros factores (Valdéz 1997).

En este trabajo, se observó un par de constricciones secundarias en los cromosomas 1, 2, 7 y 8 del cariotipo correspondiendo a los pares L1 y L4 (Fig. 2). Los trabajos reportados por Albornoz-Aguilera e Imery-Buiza (2003) y Imery-Buiza y Caldera-Andara (2002) confirman la presencia de constricciones secundarias en los pares L1 y L4 en *Aloe vera*. Otros trabajos indican la posición de constricciones secundarias en los brazos largos de los cromosomas de las plantas de la familia Aloaceae constituyendo una característica cariológica distintiva entre las diferentes especies del género *Aloe* (Brandham 1971, Sapre 1978, Imery-Buiza y Caldera-Andara 2002).

La longitud cromosómica encontrada en las células autotetraploides fue menor (2,3 y 11,3 μm) a la encontrada en las plantas diploides. Los trabajos realizados por Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001a, b) describieron el número de cromosomas obtenidos luego de aplicados los tratamientos con colchicina, y en ambos casos, se observó un número tetraploide de 28 cromosomas considerando que el número original de la especie fue de 7. En el presente trabajo, se amplía la información citogenética debido a que se calculó la longitud de los cromosomas y la fórmula cariológica con 8 pares de cromosomas largos y 6 pares pequeños, lo que corresponde a un proceso de duplicación cromosómica de células diploides.

Las técnicas de laboratorio para la inducción de la poliploidía son una representación de lo que ocurre naturalmente. En este sentido, Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001b) indujeron a la poliploidización de plantas de *A. vera* y demostraron que las características morfológicas y citológicas en las plantas poliploides presentaron valores superiores a los de las plantas diploides en cuanto anchura y espesor de la hoja, tamaño y frecuencia de brotes foliares juveniles, peso de la planta y tamaño de las células epidérmicas y radicales. De igual manera, los resultados del presente estudio revelaron que las plantas que presentaron todas las células del tejido radical poliploides, luego de cuatro meses de aplicado el tratamiento, se destacaron por presentar los mayores valores de altura de la planta, longitud, ancho, espesor y volumen foliar, es decir sus hojas fueron más suculentas con respecto a las plantas que presentaron células diploides o que fueron quimeras. En el trabajo realizado por Imery-Buiza y Cequea-Ruíz (2001b), el parámetro de longitud de la hoja no fue una característica distintiva entre los tratamientos aplicados, mientras que los resultados estadísticos de este estudio revelaron que este aspecto permitió diferenciar las plantas estudiadas.

El mayor desarrollo de las características foliares de las plantas autotetraploides de *A. vera* pudiera estar asociado con alta productividad de los compuestos químicos presentes en las hojas de esta planta, donde se incluyen los metabolitos secundarios como la aloína, aloesina y aloe-emodina, útiles en la fabricación de productos medicinales y dermatológicos.

CONCLUSIONES

Los efectos producidos por la inducción artificial de la ploidía en *Aloe vera* sobre la estructura cromosómica y en la acumulación de biomasa es una alternativa interesante para obtener variedades de esta planta para ser utilizadas en programas de mejoramiento genético con miras de obtener cultivares con mayor producción de metabolitos secundarios que cubra la actual demanda de la industria farmacéutica y cosmetológica a nivel nacional e internacional.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean expresar su agradecimiento al personal y autoridades del Laboratorio de Biología Celular y Genética y el vivero de la Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Maracaibo, donde fue realizada esta investigación.

LITERATURA CITADA

- ALBORNOZ-AGUILERA, A. Y J. IMERY-BUIZA. 2003. Evaluación citogenética de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. de la Península de Araya-Venezuela. *Ciencia* 11(1): 5–13.
- BECKER, H. Y S. CHAVADEJ. 1985. Valepotriate production of normal and colchicine-treated cell suspension cultures of *Valeriana wallichii*. *J. Natural Products* 48(1): 17–21.
- BOZZI, A., C. PERRIN, S. F. AUSTIN Y F. ARCE-VERA. 2007. Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. *Food Chemistry* 103: 22–30.
- BRANDHAM, P. E. 1971. The chromosomes of the Liliaceae: 2. Polyploidy and karyotype variation in the Aloineae. *Kew Bull.* 25(3): 381–389.
- BRANDHAM, P. E. Y M. J. DOHERTY. 1998. Genomic size variation in the Aloaceae, of *Aloe barbadensis* Mill. (Liliales: Liliaceae). *Philippine-Agriculturist. Philippines* 74(2): 261–264.
- BROECKLING, C., D. HUHMANN, M. FARAG, J. SMITH, G. MAY, P. MENDES, R. DIXON Y L. SUMNER. 2005. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J. Experimental Botany* 56(410): 323–336.

- CHOI, S. Y C. MYUNG-HEE. 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine* 1(1): 53–62.
- CUBERO, J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal (2 ed.). Ediciones Mundi-Prensa, España, pp. 325–351.
- DE JESÚS-GONZÁLEZ, P. Y J. WEATHERS. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Reports* 21(8): 809–813.
- ESCANDÓN, A., I. MIYAJIMA, M. ALDERETE, J. C. HAGIWARA, G. FACCIUTO, D. MATA Y S. M. SOTO. 2005. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*. *Plant Biotechnology* 8(2): 415–423.
- ESTEBAN, A., M. LÓPEZ, J. ZAPATA, B. SABATER Y M. MARTÍN. 2001. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: posible involvement in defence reactions. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 521–527.
- EWEL, J. Y A. MADRID. 1976. Zonas de vida en Venezuela. Memorias explicativas sobre el mapa ecológico. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), Caracas, 264 pp.
- GANAPATHI, G. Y F. KARGI. 1990. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *J. Experimental Botany* 41: 259–267.
- HERNÁNDEZ-CRUZ, L. R., R. RODRÍGUEZ-GARCÍA, R. D. JASSO Y J. L. ANGULO-SÁNCHEZ. 2002. *Aloe vera* response to plastic mulch and nitrogen. Pp. 570–574, en J. Janik y A. Whipkey (eds.), *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, Virginia, USA.
- IMERY-BUIZA, J. 2006. Caracterización genética de parentales e híbridos de diploides (VS) y triploides (VVS) entre *Aloe vera* (L.) Burm. f. (2V, 4V) y *Aloe saponaria* Haw. (2S) (Alolaceae). Seminario de Avance de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Postgrado de Botánica, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 147 pp.
- IMERY-BUIZA, J. Y H. CEQUEA-RUIZ. 2001a. Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66: 409–413.
- IMERY-BUIZA, J. Y H. CEQUEA-RUIZ. 2001b. Evaluación citogenética se la generación M_{1V_2} de tetraploides experimentales en Sábila (*Aloe Vera* L.). *Revista Científica UDO Agrícola* 1(1): 29–33.
- IMERY-BUIZA, J. Y T. CALDERA-ANDARA. 2002. Estudio cromosómico comparativo de cinco especies de *Aloe* (Alolaceae). *Acta Botánica de Venezuela* 25(1): 47–66.
- LEVAN, A., K. FREDGA Y A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 206–218.
- LAVANIA, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources* 3: 170–177.
- MATOS, A. 2005. Producción de aloesina, aloina A y B y aloe-emodina en cultivos in Vitro de *Aloe vera* L. Tesis de Doctorado, Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, 233 pp.
- MATOS, A. Y J. MOLINA. 1997. Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* 14: 173–182.

- NAMDEO, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69–79.
- PATEL, O. P. Y R. C. VERMA. 1999. Cytomorphology of induced tetraploid en *Cajanus xajan* y *Vigna unguiculata*. *Citología* 64: 29–36.
- PIÑA, H. 2005. Perfil preliminar del mercado de la zábila (*Aloe vera*) en el Estado Falcón, Venezuela. *Bioagro* 17(2): 85–92.
- REYNOLDS, T. Y A. C. DWECK. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacology* 68: 3–37.
- SANTAMARINA, M. P., F. J. GARCÍA, V. VILELLA Y J. L. ROSELLÓ. 2005. Biología y botánica. Vol. 1. Departamento de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología, Universidad Politécnica de Valencia, Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 59–69.
- SAPRE, A. 1978. Karyotype of *Aloe barbadensis* Mill: A reinvestigation. *Cytologia* 43: 237–241.
- SNEDECOR, G. Y W. COCHRAN. 1984. Métodos estadísticos (10 ed.). Editorial Continental S. A. de C. V., México, 464 pp.
- SUTARIA, R. N. 1932. Somatic cell divisions en *Aloe vera* L. *J. Indian Botany Society* 21(1): 132–133.
- VALDÉZ, B. 1997. Caracteres citotaxonómicos: citología y citogenética. Pp. 133–154, en J. Izco (ed.), *Botánica*. McGraw Hill Interamericana, Madrid, España.
- VANDECANDELAERE, A., S. R. MARTIN Y Y. ENGELBORGH. 1997. Response of microtubules to the addition of colchicine and tubulin-colchicine: evaluation of models for the interaction of drugs with microtubules. *Biochemistry J.* 323: 189–196.
- VEGA, A., N. AMPUERO, L. DIAZ Y R. LEMUS. 2005. El *Aloe vera* (*Aloe Barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición* 32(3): 208–214.
- WALLAART, T. E., N. PRAS, A. C. BEEKMAN Y W. J. QUAX. 2000. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Medica* 66: 57–62.