

Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] *in vivo*

Ángela Matos Acurero

Universidad del Zulia

E-mail: civefecluz@gmail.com

Resumen

En los hijuelos de las plantas tratadas con colchicina 0,10% durante 48 horas (T6) se indujo un 56% de células aneuploides y se logró un incremento estadísticamente significativo en la altura de las plantas, longitud de las hojas y volumen foliar al comparar con las plantas controles y con las del resto de los tratamientos de 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el uso de la colchicina es de gran valor para la obtención de plantas de zábila con mayor biomasa, lo que permite aumentar el rendimiento para la elaboración de productos cosméticos y medicinales.

Palabras clave: *Aloe vera* L., citogenética, morfología, aneuploidía.

The Effect of Different Concentrations and Time Exposures of Colchicine on Live Aloe Vera Plants [*Aloe vera* (L.) Burm. f.]

Abstract

On plant shoots treated with 0.10% colchicine for 48h (T6), 56% aneuploid cells were induced and a statistically significant increase in plant height, length of leaves and leaf volume was achieved compared to control plants and plants with other colchicine treatments of 24 and 48 hours. Results obtained from this study demonstrate that the use of colchicine has a great value for obtaining plants with increased biomass, augmenting their use for cosmetic and medicinal products.

Keywords: *Aloe vera* L., cytogenetics, morphology, aneuploidy.

Introducción

La zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.], es una planta de amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, con enorme importancia económica y medicinal [17, 26]. Posee múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria [3, 10, 13, 16, 29]. Es un cultivo de gran importancia en Venezuela pues se adapta a las zonas áridas y semiáridas del país, que no presenta grandes exigencias y permite obtener productos de calidad que son cotizados a nivel internacional [7].

No obstante, el crecimiento lento de la planta y la baja tasa de propagación de ésta no cubren la demanda actual del mercado nacional e internacional. Los productores tradicionales deben esperar hasta 3 años para que la planta alcance la madurez y pueda ser vendida. Ello ha impulsado el desarrollo de alternativas para la obtención de mayores volúmenes de producción, a través de programas de selección y mejoramiento genético [20].

En este sentido, la inducción de poliploidía es una alternativa utilizada para incrementar la producción de biomasa en zábila, debido a la tendencia que presentan las plantas poliploides 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 [15]. De hecho, se ha observado que las plantas poliploides presentan mayor vigor y tejidos que pueden duplicar la biomasa de las plantas originales [8, 24].

La gran importancia económica que posee la explotación de *A. vera* en el mundo y en Venezuela, ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas con la finalidad de obtener cultivares con mayores volúmenes de producción, siendo la inducción de poliploidía en *A. vera*, mediante el uso de colchicina, una opción relativamente rápida para lograr plantas que posean hojas con mayor biomasa, permitiendo altos márgenes de producción a los productores.

De acuerdo con lo anterior, se llevó a cabo una caracterización morfológica y citogenética de las plantas tratadas con colchicina a diferentes concentraciones (0,05% y 0,10%) y tiempos de exposición (24 y 48 horas) con el propósito de evaluar el uso potencial de la misma en la obtención de plantas con mayor volumen y grosor foliar y, por tanto, con mayor biomasa producida en la parte vegetativa de interés de esta planta, es decir, las hojas.

Metodología

Métodos

Para minimizar la variabilidad, la planta parental empleada para esta investigación se obtuvo de un vivero comercial del municipio Maracaibo (Venezuela). Todas las plantas sometidas a tratamiento fueron hijos de esta planta; de 4 meses de edad aproximadamente con una altura entre 10 a 15 cm. Las plantas [tanto la parental, como las tratadas (madres) y los hijuelos de éstas] fueron mantenidas en los alrededores del Departamento de Biología, Bloque A1 de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, edo. Zulia, Venezuela; ca-

racterizado por ser una zona de bosque muy seco con temperatura media anual promedio de 30°C, humedad relativa del 79% y precipitación media anual de 500 mm/año [5].

Para determinar el efecto de la concentración y tiempo de exposición a la colchicina se siguió la metodología empleada por Imery y Cequea [8]. Cuando las raíces de las plantas alcanzaron una longitud de 1,5 a 2 cm, se sumergieron los rizomas de las plantas de *A. vera* en solución acuosa de colchicina a concentraciones de 0,05% y 0,10% p/v y a dos tiempos de exposición, 24 y 48 horas (Tabla 1). Los tratamientos se llevaron a cabo en cámara oscura. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, incluyendo plantas controles (sumergidas en agua destilada) para un total de 60 plantas. Las plantas tratadas y las controles se sembraron en bolsas de polietileno de 1 kg con tierra desinfectada y abono orgánico.

1. Estudio citogenético

El estudio citogenético se realizó según lo descrito por Matos y Molina (14). Se seleccionaron hijuelos de 5 meses de edad provenientes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, los cuales fueron desenterrados y llevados al laboratorio. Se estudiaron tres raíces por planta, empleando el método de aplastamiento de los tejidos o “squash” para la preparación de las láminas microscópicas. Se determinó el número de cromosomas y la descripción de la morfología de éstos se realizó basándose en la metodología establecida por Levan *et al.* [11].

2. Estudio morfológico

El estudio morfológico se llevó a cabo pasados los cinco meses después de los tratamientos con colchicina, siguiendo la metodología empleada por Imery [9] considerándose características como: altura de la planta (AP), longitud foliar (LH), ancho (AH) y espesor foliar (EH), volumen foliar, empleando la fórmula $V = \pi \cdot LH \cdot AH \cdot EH / 12$.

3. Análisis estadístico

Para los datos provenientes del estudio morfológico se evaluaron diferencias entre tratamientos mediante una comparación de variable en conjunto con un análisis de variables (ANOVA). Las diferencias entre medias se verificaron a través de la comparación pareada de muestras independientes con $p \leq 0,05$, utilizando el programa estadístico SPSS, versión 19.0.

Los datos del estudio citogenético se ilustraron mediante el uso de gráficas de barras, resaltando los porcentajes de las células obtenidas con una comparación de proporciones para resaltar las diferencias significativas entre los tratamientos, con un 95% de confiabilidad.

Para el cálculo del número, estadísticamente representativo, de células metafásicas a estudiar, se empleó la fórmula: $n = Z^2_{\alpha/2} \times S^2/e^2$, de Snedecor y Cochran (27), don-

Tabla 1. Tratamientos de *Aloe vera* con colchicina durante dos tiempos de inmersión y bajo diferentes concentraciones.

| Tratamientos | Concentraciones de colchicina | Tiempo de exposición de colchicina (h) |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------------|
| 1 | Control | 24 |
| 2 | 0,05% | 24 |
| 3 | 0,10% | 24 |
| 4 | Control | 48 |
| 5 | 0,05% | 48 |
| 6 | 0,10% | 48 |

de $Z^2_{\alpha/2}$ tiene un valor de 1,96 según la estadística tabulada de la normal estándar y S^2 , que significa la varianza muestral, la cual es de 13,66. El error del muestreo (e^2) será de 0,05. En base a esta fórmula se estudiaron 50 células/raíz microscópico a 100X, lo cual expresó el valor mínimo de células que se deben analizar para obtener resultados confiables.

Resultados

Caracterización morfológica

De acuerdo con el análisis estadístico, el tratamiento con colchicina 0,10% por 48 horas causó incrementos significativos en altura de las plantas (AP), longitud de las hojas (LH) y volumen foliar de los hijuelos, con respecto al grupo control y a las plantas tratadas por 24 y 48 horas.

En la Figura 1, pueden observarse los resultados de la caracterización morfológica de las plantas madres tratadas con colchicina, con dos concentraciones y dos tiempos de inmersión. No se observaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en los grupos de 24 horas, como en los de 48 horas.

La Figura 2 muestra la caracterización morfológica en los hijuelos de las plantas tratadas con colchicina. Puede observarse que el tratamiento con colchicina 0,10% por 48 horas (T6) indujo incrementos estadísticamente significativos en altura de la planta (AP) y longitud de la hoja (LH), con respecto a los controles y el resto de los tratamientos de 48 horas (Figura 2B). Sin embargo, a pesar de que T6 mostró resultados diferenciales al compararlo con el resto de los tratamientos en hijuelos, los promedios de AP y LH son menores a los observados en plantas madres (Figura 1).

De igual manera, los hijuelos de las plantas tratadas con 0,10% de colchicina por 48 horas (T6), presentaron diferencias estadísticamente significativas de volumen foliar,

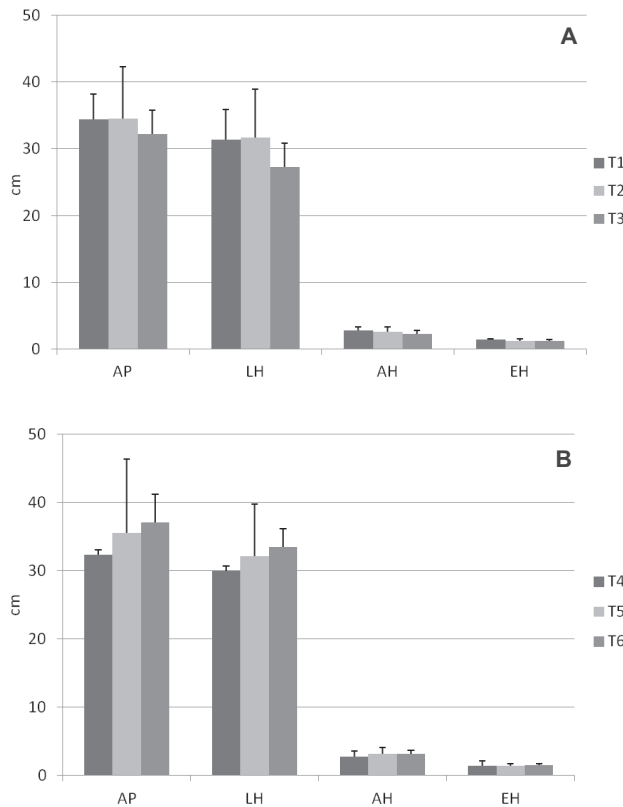


Figura 1. Altura de la planta (AP), longitud foliar (LH), ancho y espesor de la hoja (AH y EH), de plantas madres de *Aloe vera* L. tratadas con colchicina (0,05% y 0,10%).

con 10,42 cm³ (Figura 3D), especialmente al comparar con el grupo control y el resto de los tratamientos durante 24 y 48 horas.

Caracterización citogenética

Los tratamientos T1 y T4, correspondientes a los grupos controles, presentaron los valores más altos de células diploides ($2n=14$), tal como se esperaba, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 4). En los tratamientos con diferentes concentraciones de colchicina se observaron altos porcentajes de células con un cariotipo $n = 7 \pm 1$, es decir, aneuploides. En ningún caso se observaron células triploides o tetraploides, por lo cual, no pueden considerarse poliploides. Los más altos porcentajes de células aneuploides se observaron en T6 (0,10%, 48 horas) con 56%.

Discusión

Estudio morfológico

Los valores obtenidos en este estudio demuestran que una mayor concentración de colchicina y un periodo más largo de inmersión permitieron cambios a nivel morfológico en los hijuelos de las plantas tratadas. Aunque los valo-

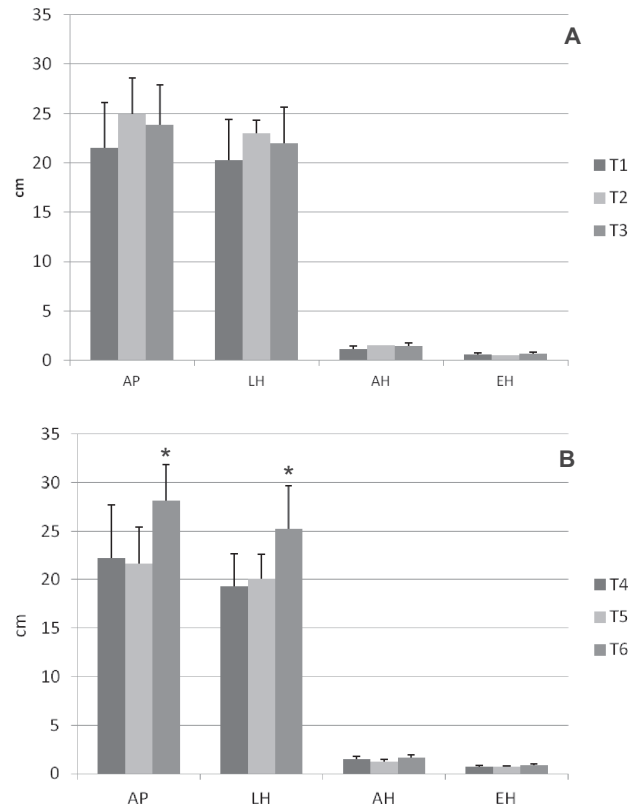


Figura 2. Altura de la planta (AP), longitud foliar (LH), ancho y espesor de la hoja (AH y EH), de hijuelos de plantas de *Aloe vera* L. tratadas con colchicina. A) 24 horas y B) 48 horas. T1 y T4 (Controles), T2 y T5 (0,05%), T3 y T6 (0,10%). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar.

res promedios de los hijuelos fueron menores a los encontrados en las plantas madres que recibieron los tratamientos con diferentes concentraciones de colchicina y dos tiempos de inmersión distintos, sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento T6 (0,10% y 48 h), con respecto al grupo control y el resto de los tratamientos. Los resultados diferenciales se observaron principalmente en la altura de las plantas (AP), longitud de las hojas (LH) y volumen foliar. Esto podría estar relacionado a una variación a nivel de tejidos, puesto que se sabe que el efecto más inmediato y universal de la poliploidía en las plantas es un aumento del tamaño y masa celular, aunque este hecho no necesariamente origine un aumento en el tamaño total de planta [1]

Otro efecto descrito es la disminución de la velocidad de crecimiento, como consecuencia de un aumento en la duración del ciclo celular, aunque esto no parece ser universal, pues en algunas especies con distintos niveles de ploidía, los tiempos de ciclo no varían significativamente aumentando el diámetro de las células que los componen

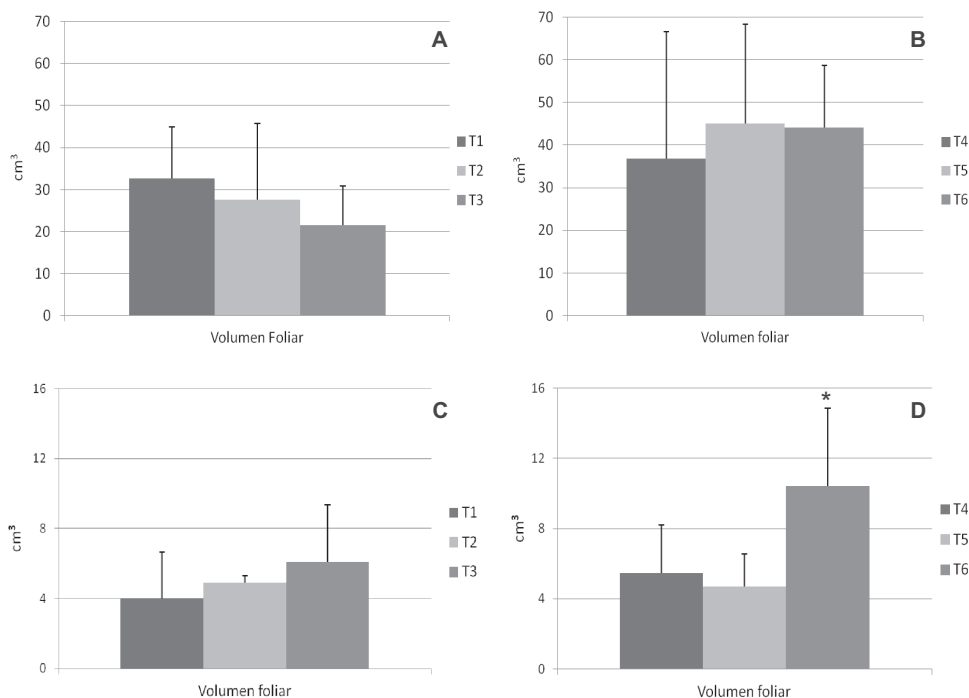


Figura 3. Volumen foliar de plantas de *Aloe vera* (Madres–A y B– e hijuelos–C y D–). Control (T1 y T4), tratamientos de 0,05% (T2 y T5) y 0,10% de colchicina (T3 y T6). A y C, 24 horas, B y D, 48 horas. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar.

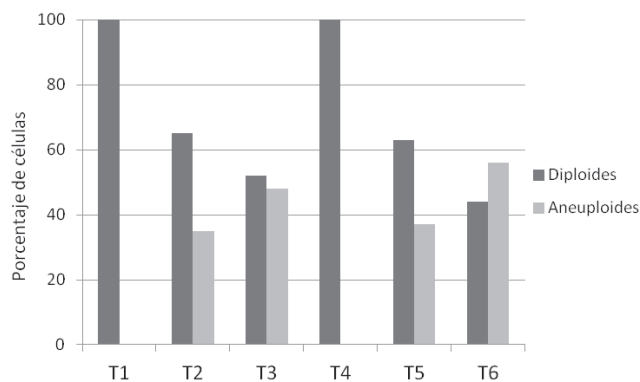


Figura 4. Porcentaje de células diploides y aneuploides en hijuelos de plantas tratadas de *Aloe vera*. Control (T1 y T4), 0,05%, 24 horas (T2 y T3) y 0,10% de colchicina, 48 horas (T5 y T6).

[21]. Muchos autores reportan las características de giga como un resultado de la poliploidía inducida en plantas con diferencias significativas en relación al control, sobre todo en relación al área foliar y el tamaño de las flores [4].

Las variaciones ambientales han sido asociadas con el desarrollo de plantas con mayor vigor. De hecho, en plantas la poliploidía les conferiría, además de las ventajas adaptativas al medio donde se desarrollan, mayor vigor, tamaño y otras características deseables para el hombre en aquellas plantas de valor comercial [28]. En este estudio, las plantas estuvieron expuestas a condiciones ambienta-

les con temperaturas entre 35 y 42°C, según datos climatológicos aportados por la Base Aérea Nacional de Venezuela, citados por Querales [19]. Es posible que las plantas tratadas en el presente trabajo, desarrollaran cierta resistencia a condiciones extremas de temperatura o estrés, tal como lo describen varios autores [2, 6]. En este sentido, estas plantas podrían haber desarrollado la capacidad de adaptarse a condiciones adversas y aún así incrementar los valores de las características foliares como altura, longitud y volumen foliar, siendo éstas las deseables para su venta y distribución.

Estudios citogenéticos

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con los de otros estudios [8, 23, 24], donde un mayor tiempo de exposición a la colchicina indujo cambios a nivel morfológico en las plantas, puesto que al extender el tiempo de inmersión hasta 48 horas, aumenta el número de células meristemáticas en contacto con colchicina, favoreciendo la penetración del alcaloide a las capas celulares durante la actividad mitótica de la misma [8].

Los tratamientos ensayados en el presente trabajo no permitieron la obtención de individuos poliploides puesto que aunque se observaron células con mayor número cromosómico al normal ($2n=14$), éstas no alcanzaron a ser triploides o tetraploides, por lo cual, no pudieron ser clasificadas como poliploides.

Por el contrario, el uso de las concentraciones de colchicina indujo la formación de células con aneuploidía. Esto podría derivarse de varias causas metabólicas y antropogénicas operando por separado o en conjunto, tales como el estado nutricional del suelo, riego por agua contaminada, patogénesis de las plantas y factores ambientales como pH y temperatura [25]. Vidali *et al.* (30) sugirió que hasta el cambio más mínimo o moderado en las condiciones ambientales pueden tener un efecto grande sobre la estabilidad genética de las plantas y por ende en su morfología. Los resultados obtenidos parecen indicar que la poliploidía inducida afecta la estabilidad cromosómica. La aneuploidía como resultado de la poliploidía inducida está gobernada por una interacción génica –surgida por la aneuploidía– que actuaría a modo de gene [22].

Asimismo, en algunos casos puede presentarse lo que se conoce como aneuploidía positiva, que promueve la expresión de características a nivel morfológico como ligeros aumentos en las dimensiones foliares de las plantas, pero sin tener ningún efecto visible en el incremento de la acumulación de biomasa (9), como consecuencia de anomalías durante la mitosis, siendo este fenómeno de alta importancia para la evolución de las plantas [12, 18].

Consideraciones finales

La utilización de colchicina a concentraciones de 0,10%, aplicada durante 48 horas indujo cambios a nivel morfológico y citogenético, observándose un mayor porcentaje de células aneuploides y variaciones morfológicas más acentuadas para este tratamiento (T6) en relación al resto, en los hijuelos de plantas tratadas.

Estos resultados demuestran que el uso de la colchicina en plantas de *Aloe vera* es de gran valor para la obtención de plantas con mayor volumen foliar, lo que puede permitir, en un futuro, el aumento de la materia prima para exportación y elaboración de productos cosméticos y medicinales.

Referencias

- [1] ASTUDILLO, LUIS. (2005). Inducción de poliploidía en plantas del género *Leucocoryne*. Tesis de grado. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Chile. p.p. 52
- [2] BALTZER, JENNIFER. (2005). Leaf optical responses to light and soil nutrient availability in temperate deciduous trees. *American Journal of Botany* 92 (2): 214-223.
- [3] CHEN, S.; LIN, K.; CHANG, C.; FANG, C. (2007). Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 45 (11): 2296-2303.
- [4] ESCANDÓN, A.; ALDERETE, L.; HAGIWARA, J. (2007). *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia Horticulturae* 115: 56-61
- [5] EWEL, J.; MADRID A. (1976). Zonas de vida en Venezuela. Memorias explicativas sobre el mapa ecológico. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), Caracas, Venezuela. p.p. 264.
- [6] FAWCETT, J.A.; VAN DE PEER, Y. (2010). Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends in Evolutionary Biology* 2010 1 (3): 16-21.
- [7] FUENTES R., GONZÁLEZ, J.; VÍLCHEZ, J.; COLMENARES, C.; BRACHO, B. (2007). Efecto del ácido indolbútrico y el tipo de sustrato en el enraizamiento *ex vitro* de zábila (*Aloe vera* L.). Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Departamento de Estadística. Cátedra de Investigación Agropecuaria. Maracaibo, Venezuela. p.p. 36.
- [8] IMERY, J.; CEQUEA, H. (2001). Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66: 409-413.
- [9] IMERY, JOSÉ. (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) (Aloaceae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Postgrado de Botánica, Universidad Central de Venezuela, Caracas. p.p. 147.
- [10] JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. (2008). Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 20 (2):181-189.
- [11] Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 206-218.
- [12] LIU, Z.; ADAMS, K.L. (2007). Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. *Current Biology* 17: 1669-1674.
- [13] MAENTHAISONG, R.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; NIRUNTRAPORN, S.; KONGKAEW, C. (2007). The efficacy of *Aloe vera* used for burn wound healing: A systematic review. *Burns* 33 (6): 713-718.
- [14] MATOS, A.; MOLINA, J. (1997). Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron. LUZ.* 14: 173-182.
- [15] MOLERO, T.; MATOS, A. (2008). Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* (L.). *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 42 (1): 111-133.
- [16] NDHLALA, A.; AMOO, S.; STAFFORD, G.; FINNIE, J.; VAN STADEN, J. (2009). Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe barberae*). *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3):404-408.
- [17] OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BASTISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. (2007). Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17: 466-476.

- [18] OTTO, S.P.; WHITTON, J. (2000). Polyploidy: incidence and evolution. **Annual Review of Genetics** 34: 401-437.
- [19] QUERALES, Yisliú (2009). Variación temporal de la producción y descomposición de hojarasca de *Rhizophora mangle* presente en el manglar de Punta Capitán Chico, estado Zulia. Trabajo de grado. Universidad del Zulia. 83 pp.
- [20] QUINTERO, M.; BEHAR, R.; GARCÍA, C.; PUPO, D.; HERNÁNDEZ, M.; DÍAZ, J.; PÉREZ, F. (2009). *Aloe* gel viscoso® en el tratamiento de pacientes con úlcera duodenal y *Helicobacter pylori* positivo. **Rev. Cubana Plant. Med.** 14 (4):1-6.
- [21] REES, Helen (1972). DNA in higher plants. **Brookhaven Symposia in Biology** 23: 394-418.
- [22] ROMMEL, MECHTILD. (1964). Aneuploids in some artificially induced polyploids of cultivated plants. **Anales Estación Experimental Aula Dei** 7 (3-4): 105-112.
- [23] [23] SÁNCHEZ, Andrea (2010). Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de *Aloe vera* L. *in vivo*. Trabajo Especial de Grado. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo, Venezuela. p.p. 34.
- [24] SÁNCHEZ, A.; MATOS, A. (2012). Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) *in vivo*. **Revista de la Universidad del Zulia** 3 (6): 119-139.
- [25] SHARMA, C.B.S.R.; PANNEERSELVAN, N. (1990). Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Crit. Rev. Plant Sci.** 9, 409-442.
- [26] SILVEIRA, P.; BANDEIRA, M.; ARRAIS, P. (2008). Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18: 618-626.
- [27] SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. (1984). **Métodos estadísticos**. 10a edición. Editorial Continental S.A. p.p. 34.
- [28] STEBBINS, G. (1966). Chromosome variation and evolution. **Science** 152:1463-1469.
- [29] VEGA, A., AMPUERO, C.; DÍAZ, L.; LEMUS, R. (2005). Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, El *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. **Rev. Chil. Nutr.** 32: 1-14.
- [30] VIDALI, L.; AUGUSTINE, R.C.; FAY, S.N.; FRANCO, P.; PATAVINA, K.A.; BEZANILLA, M. (2009). Rapid screening for temperature sensitive alleles in plants. **Plant Physiol.** 151:506-514.