

Evaluación citogenética de la generación M_1V_2 de tetraploides experimentales en sábila (*Aloe vera* L.)

Cytogenetic evaluation of M_1V_2 generation from experimental tetraploids in *Aloe vera* L.

Imery-Buiza, José y Cequea-Ruiz, Hernán

Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente
Cumaná, Venezuela. Apart. Post. 245; Email: jimery@cumana.sucru.udo.edu.ve

RESUMEN

Se analizaron las características cromosómicas en los descendientes vegetativos de plantas de *A. vera* con tetraploidía completa y parcial inducida mediante la inmersión de rizomas en solución de colchicina. Los mutantes cromosómicos M_1V_1 se cultivaron bajo condiciones de vivero hasta la obtención de propágulos M_1V_2 con 4 a 6 hojas. Al momento de la separación se identificaron los descendientes de acuerdo a su posición en la periferia del rizoma materno. La evaluación del número, tamaño y morfología de los cromosomas mitóticos se realizó en láminas temporales con aplastamiento de meristemas radicales tratados con colchicina, fijador, HCl y orceína FLP. Los resultados cariológicos permitieron reconocer una completa estabilidad cromosómica en los descendientes de plantas tetraploides, manteniéndose un cariotipo constante $2n=4x=28$ en todas las muestras analizadas. Los hijuelos de plantas quiméricas M_1V_1 corroboraron la existencia de mutaciones mericlinales inducidas por bajos niveles de exposición y concentración de colchicina y la identificación de los cuadrantes mutantes en sus ancestros parcialmente tetraploides. A diferencia de las plantas quiméricas M_1V_1 , sus descendientes M_1V_2 presentaron un nivel de ploidía individual diploide o tetraploide en sus meristemas radicales. No se observaron variaciones cromosómicas de naturaleza aneuploide ni cambios estructurales atribuibles a los efectos de la colchicina o posibles accidentes celulares postratamiento en ambas generaciones.

Palabras claves: *Aloe vera*, tetraploides, cromosomas, colchicina.

ABSTRACT

Chromosomal characteristics were analyzed in the vegetative descendants of *A. vera* plants with complete and partial induced tetraploidy by means of the immersion of rhizomes in colchicine solution. The chromosomal mutants M_1V_1 were cultivated under greenhouse conditions until the obtaining of suckers M_1V_2 with 4 to 6 leaves. The descendants were identified according to its position in the maternal rhizome periphery. The evaluation of the number, size and morphology of the mitotic chromosomes was carried out in temporary slide with squashing of root tips treated with colchicine, fixer, HCl and FLP orceine. The karyological results allowed to recognize a complete chromosomal stability in the suckers from tetraploid plants, staying a constant karyotype $2n=4x=28$ in all the analyzed samples. The suckers of chimerical plants M_1V_1 corroborated the existence of mericlinal mutations induced by low exhibition and concentration colchicine levels and the identification of the mutant quadrants in its partially tetraploid parents. Contrary to the chimerical plants M_1V_1 , its descendants M_1V_2 presented a individual diploid or tetraploid level in its radical meristems. Aneuploid chromosomal variations neither structural changes were not observed from the colchicine effects or posttreatment cellular accidents in both generations.

Key words: *Aloe vera*, tetraploids, chromosomes, colchicine.

INTRODUCCIÓN

La sábila (*Aloe vera* L. = *A. barbadensis* Mill.), es una especie xerofítica nativa de la costa Noroccidental de África, cultivada como planta ornamental y de uso medicinal (Davis, 1997). La creciente demanda de los subproductos de esta planta fomenta actualmente la búsqueda de alternativas de procesamiento y comercialización que incluyen el mercadeo de gel fresco y liofilizado, así como otros derivados fundamentales para la elaboración de

medicamentos, cosméticos, bebidas, etc. (Jiménez *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1996; Pullido, 1998; Boon, 1999). Esta intensa actividad económica ha impulsado el inicio de programas de mejoramiento genético con la finalidad de obtener cultivares con mayores volúmenes de producción, resistentes a plagas y enfermedades, adaptación a nuevas zonas de cultivo, etc. En este sentido, la inducción de poliploidía en *A. vera*, mediante el uso de colchicina, representa una opción relativamente rápida para lograr genotipos promisorios que puedan ser explotados directamente

o que ofrezcan suficiente variabilidad genética necesaria para iniciar programas de selección (Imery, 2000).

Generalmente, los poliploides desarrollan tejidos más vigorosos y productivos que pueden duplicar la acumulación de biomasa de los individuos originales. La mayoría de estos genotipos superiores corresponden a cultivares aprovechables por sus características vegetativas, entre ellos, hortalizas, frutales, raíces, tubérculos, ornamentales y forrajes, los cuales se han obtenido por la incorporación de variaciones en su nivel de ploidía durante alguna fase de manipulación genética (Shimotsuna, 1962; Verma y Raina, 1991). No obstante, los avances alcanzados con la inducción de poliploidía en una primera generación, pueden resultar poco estables debido al restablecimiento del número normal de cromosomas en generaciones sucesivas (Jackson, 1976).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características cromosómicas en los descendientes vegetativos de plantas tetraploides de *A. vera* generadas a partir de yemas laterales sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en colchicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La inducción inicial de poliploidía se logró mediante inmersión completa de rizomas de *Aloe vera* en solución acuosa de colchicina a tres concentraciones (0,05; 0,10 y 0,15% p/v) y cuatro tiempos de exposición (6, 12, 18 y 24 horas). Los esquejes tratados fueron lavados con agua a chorro continuo durante un minuto y sembrados en una mezcla desinfectada de arena, tierra y aserrín. A los 60 días después del tratamiento, se trasplantaron los hijuelos a bolsas de polietileno, manteniéndose bajo condiciones de vivero hasta su evaluación (Imery, 2000). De los 491 brotes emergentes postratamiento, se reconocieron 29 hijuelos completamente tetraploides y 26 quimeras con células diploides y tetraploides. Estos mutantes cromosómicos M_1V_1 se cultivaron en las mismas condiciones ambientales hasta la obtención de propágulos M_1V_2 con cuatro a seis hojas.

La evaluación del número, tamaño y morfología de los cromosomas mitóticos se realizó a partir de láminas temporales preparadas por el método de aplastamiento de meristemas radicales, sometidos previamente a colchicina (0,025% p/v) por

dos horas, fijador (3:1 etanol: ácido acético glacial) por 24 horas, HCl durante 10 minutos y tinción con orceína FLP 1,5% p/v por cuatro minutos (Mata, 1977; Cequea, 1985). Se analizaron cinco ápices radicales por cada descendiente M_1V_2 .

RESULTADOS

La evaluación cariológica en la primera generación M_1V_1 , representada por las plantas emergentes después del tratamiento con colchicina, reveló efectos diferenciales de este alcaloide sobre la actividad mitótica de los meristemas laterales de *A. vera*, en función del tiempo de exposición y la concentración empleada (cuadro 1). La mayor eficiencia en la duplicación del número de cromosomas se alcanzó con la inmersión de rizomas en 0,15% de colchicina durante 24 horas. Las combinaciones de otros niveles de tratamiento resultaron en eficiencias inferiores de duplicación cromosómica, además de inducciones parciales de tetraploidía.

El análisis cariotípico en los descendientes vegetativos de plantas tetraploides y parcialmente tetraploides, permitió evaluar la estabilidad cromosómica en estos mutantes M_1V_1 . Todos los brotes M_1V_2 generados de plantas completamente tetraploides M_1V_1 , presentaron el mismo número de cromosomas ($2n=4x=28$) en sus meristemas radicales; sin embargo, los hijuelos M_1V_2 provenientes de plantas parcialmente tetraploides M_1V_1 (con líneas celulares $2n=2x=14$ y $2n=4x=28$), presentaron cariotipos individuales con uno u otro nivel de ploidía (figura 1). A partir de estos resultados, se reconocieron los cuadrantes mutantes en las plantas quiméricas y se establecieron las proporciones porcentuales de descendientes diploides y tetraploides, en relación a las combinaciones de concentración y tiempo de exposición a la colchicina, aplicadas al tejido materno (cuadro 2).

Similar a los resultados preliminares en M_1V_1 , los descendientes M_1V_2 de plantas quiméricas, evidenciaron que la eficiencia de la colchicina como agente inductor de duplicación cromosómica, no depende sólo de su efecto antimitostático sobre el tejido meristemático, sino que está en función de la concentración empleada y el tiempo de penetración en el tejido. Por otra parte, no se observaron variaciones cromosómicas de tipo aneuploide ni cambios estructurales atribuibles a los efectos directos o residuales de este alcaloide.

Cuadro 1. Porcentaje de plantas diploides ($2x$) y mutantes M_1V_1 tetraploides ($4x$) y parcialmente tetraploides ($2x$ y $4x$), generadas a partir de rizomas de sábila (*Aloe vera* L.) sometidos a tratamiento con colchicina.

Tiempo de Exposición (horas)	Concentración de colchicina (% p/v)			Total
	0,05	0,10	0,15	
6	71,4	90,5	98,0	87,4
	28,6	9,5	2,0	12,6
	0,0	0,0	0,0	0,0
12	85,2	91,6	97,9	91,3
	11,1	2,8	0,0	4,6
	3,7	5,6	2,1	4,1
18	95,4	89,7	81,8	90,4
	2,3	0,0	0,0	1,1
	2,3	10,3	18,2	8,5
24	84,6	90,9	76,7	84,3
	0,0	0,0	0,0	0,0
	15,4	9,1	23,3	15,7
Total	84,3	90,9	91,4	88,8
	11,5	3,4	0,7	5,3
	4,2	5,7	7,9	5,9

Valores porcentuales para cada combinación y totales por nivel de tratamiento. Plantas diploides (superior), mutantes quiméricos (intermedio) y mutantes tetraploides (inferior) (Imery, 2000).

DISCUSIÓN

El efecto bloqueador de la colchicina sobre la polimerización de las proteínas tubulares, encargadas de la movilización de los cromosomas durante la mitosis, determina la actividad de este

alcaloide como agente inductor de duplicaciones cromosómicas sobre los meristemas laterales de *A. vera*. No obstante, la eficiencia de la colchicina para inducir tetraploidía en esta especie, dependió no sólo de su efecto antimitotático sobre el tejido en división, sino que estuvo asociada a los niveles de

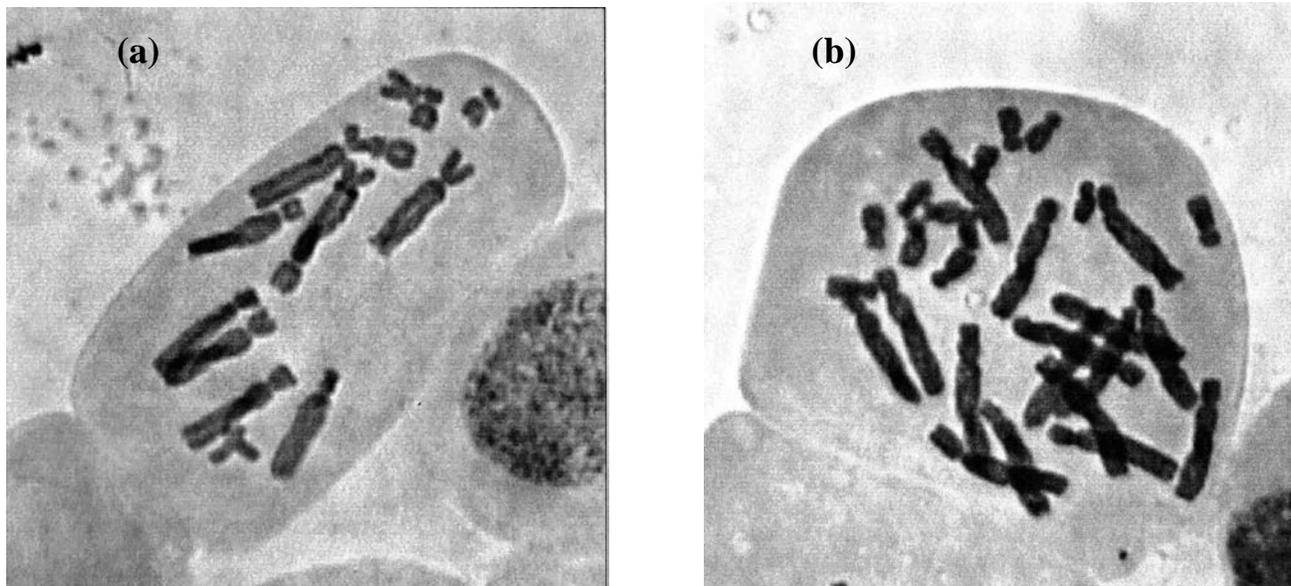


Figura 1. Cariotipos diploide (a) $2n = 2x = 14$ y tetraploide (b) $2n = 4x = 28$ presentes individualmente en meristemas radicales de hijuelos M_1V_2 descendientes de plantas de sábila (*Aloe vera* L.) parcialmente tetraploides M_1V_1 . Barra = 10 μ m.

Cuadro 2. Porcentaje de hijuelos diploides (2x) y tetraploides (4x) descendientes de plantas de sábila (*Aloe vera* L.) con tetraploidía parcial inducida por el tratamiento con colchicina.

Tiempo de Exposición (horas)	Concentración de colchicina (% p/v)			Total
	0,05	010	0,15	
6	70,5	57,6	55,6	66,2
	29,5	42,4	44,4	33,8
12	43,8	-	-	52,3
	56,2	-	-	47,7
18	-	-	-	25,0
	-	-	-	70,5
24	-	-	-	-
	-	-	-	-
Total	62,8	53,1	55,6	60,1
	37,2	46,9	44,4	39,9

Valores porcentuales para cada combinación y totales por nivel de tratamiento de acuerdo al número de descendientes diploides (superior) y tetraploides (inferior) provenientes de plantas quiméricas M_1V_1 . Combinaciones sin valor porcentual indican ausencia de plantas quiméricas M_1V_1 .

concentración y duración del tratamiento. Resultados similares han sido observados en otras especies vegetales, concluyéndose reiteradamente que los factores exógenos más influyentes en la efectividad de la colchicina para provocar variaciones cromosómicas, son definitivamente la concentración de la solución, duración de la exposición y la temperatura de tratamiento (Ronald y Paul, 1984; Sarada-Mani, 1987; Sun *et al.*, 1994; IAEA, 1995).

Al analizar la acción de la colchicina sobre semillas, plántulas, meristemas y células en suspensión, cabe destacar además, la gran diversidad de resultados en función de las características anatómicas y grado de diferenciación de los tejidos tratados (Mönckeberg *et al.*, 1988; Lindsey y Jones, 1989; Mendoza, 1994; Gao *et al.*, 1996; Hansen y Andersen, 1996; Zhao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1997). En este sentido, la escasa acumulación de biomasa y 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 periodo de inmersión hasta 24 horas, aumentando así el número de células meristemáticas en contacto con la colchicina. De este modo, se alcanza un nivel constante de tetraploidía transmisible vegetativamente hacia los nuevos propágulos M_1V_2 ; mientras que a niveles inferiores de exposición, el efecto directo sobre las células meristemáticas se reduce, debido a la acción sobre las capas superficiales y al contacto con células interfásicas en las que la colchicina no ejerce ninguna actividad antimitostática. Esta situación evidencia la

inducción de variaciones mericlinales a bajos niveles de tratamiento y explica la mayor proporción de plantas quiméricas M_1V_1 , en las cuales se observaron simultáneamente células diploides y tetraploides, que posteriormente actuaron como precursores individuales de descendientes vegetativos M_1V_2 diploides o tetraploides.

La regresión en el nivel de ploidía de algunas especies vegetales planteada por Jackson (1976), posiblemente sea el resultado de la baja frecuencia de duplicaciones cromosómicas que experimentan las poblaciones naturales combinado con la ausencia de mecanismos de aislamientos reproductivos que favorece la subsecuente hibridación entre individuos mutantes y silvestres. Por otra parte, se esperaría menor regresión en la duplicación del número de cromosomas en especies como *A. vera* que se propagan exclusiva de forma vegetativa, y en las cuales la ocurrencia de cruzamientos con ancestros diploides no representa una oportunidad para afectar el nivel de ploidía de la nueva generación. No obstante, la evaluación cariológica de futuras generaciones vegetativas permitirá establecer con mayor seguridad la estabilidad genómica de los poliploides experimentales de *A. vera* y el reconocimiento de posibles reordenamientos cromosómicos en estos genotipos promisorios.

LITERATURA CITADA

- Boon, L. El "milagro" envasado. De la sábila y sus derivados. Salud. Rev. Estampas. El Universal, 21 de noviembre 1999. 19-21 pp.

- Cequea, H. 1985. Estudio citogenético de los autotetraploides de cinco especies de *Machaeranthera* (Compositae). Acta Cient. Venez., 36:375-380.
- Davis, R.H. 1997. *Aloe vera*; A scientific approach. Vantage press, Inc. New York. 1 – 7 pp.
- Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai, Z.H. & Xu, D.R. 1996. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 47(1):73-77.
- Hansen, J.P. & Andersen, B. 1996. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin and APM in *Brassica napus* microspore culture. Euphytica, 88(2):159-164.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 1995. Manual on mutation breeding. 2ed. Technical reports series N 119. 51 – 70 pp.
- Imery, J. 2000. Inducción de tetraploidía en *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Aloaceae). Tesis de maestría. Postgrado en Biología aplicada. Universidad de Oriente, Núcleo Sucre. Cumaná-Venezuela. 73 p.
- Jackson, R.C. 1976. Evolution and systematic significance of polyploidy. Ann. Rev. Ecol., 7:209-234.
- Jiménez, L., Sumano, H. & Mateo, G. 1995. The use of *Aloe vera* for the treatment of teat cracks and lacerations in dairy cattle. Veterinaria México, 26(3):271-272.
- Kim, S., Won, Y., Song, H., Eun, S. & Lee, W. 1997. Polyploidy induction of *Cymbidium kanran* by treatment of colchicine *in vitro*. RDA J. Hort. Sci., 39(1):73-79.
- Lindsey, K., & Jones, M. 1989. Plant biotechnology in agriculture. Open University Press. U.S.A. 276 pp.
- Ma, Y., Byrne, D. H. & Chen, J. 1997. Amphydiploid induction from diploid rose interspecific hybrids. Hort Sci., 32(2):292-295.
- Mata, A. 1977. Estudio citogenético de las especies *Aloe ciliaris* Haw., *A. tenuior* Haw., *A. variegata* L. y *A. vera* Linn. (Liliaceae). Trabajo de ascenso. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 45 pp.
- Mendoza, E. 1994. Agrobiotecnología; La adaptación de las plantas al ambiente, no del ambiente a las plantas. Edit. Iberoamérica, S.A. México. 78 pp.
- Mönckeberg, F., Agosin, E., Perretta, M., Roseblatt, M., Spencer, E., Valenzuela, A. & Valladares, L. 1988. La revolución de la bioingeniería. Pub. Téc. Mediterráneo. Chile. 187 pp.
- Pullido, V. 1998. Sábila para exportar; Oro que se siembra. Rev. Sem. Primicia, 11:46-47.
- Ronald, G. & Paul, M. 1984. *In vitro* colchicine treatment of 4x blueberries *Vaccinium* sp. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 109(3):336-338.
- Sarada-Mani, N. 1987. Cytological studies of autotetraploid grain Sorghum. Cytologia, 52:587-591.
- Shimotsuma, M. 1962. Studies on triploid seed production in watermelons. Jap. J. Breeding, 12:56
- Song, P., Kang, W. & Peffley, E. B. 1996. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F₁ hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. Euphytica, 93(3):257-262.
- Sun, Y., Cheng, S. & Liang, G. 1994. Induction of autotetraploid plants of *Sorghum versicolor*. Cytologia, 59:109-114.
- Vázquez, B., Avila, G., Segura, D. & Escalante, B. 1996. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J. Ethnopharmacol. Elsevier Sci. Irland Ltd., 55(1):69-75.
- Verma, R.C. & Raina, S.N. 1991. Characteristics of colchicoid *Phlox drummondii*. Indian J. Genet., 51:315-319.
- Zhao, J., Simmonds, D. & Newcomb, W. 1996. High frequency production of doubled haploid plant of *Brassica napus* cv. Topas derived from colchicine-induced microspore embryogenesis without heat shock. Plant Cell Reports, 15:668-671.