

Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L.

Cytogenetic study in root tip cells of *Aloe vera* L.

Angela Matos¹

Julia Molina¹

Resumen

La zábila (*Aloe vera*) es una planta de la familia Liliaceae de gran importancia económica y medicinal, muy común en las regiones xerofíticas de los Estados Zulia y Falcón de Venezuela. En este trabajo se llevó a cabo un estudio citogenético en células radicales de *A. vera*, utilizando la técnica de aplastado con aceto-orceína al 2 %, con el objeto de determinar la hora mitótica y el índice mitótico (IM). Además, se calcularon las frecuencias de las fases de la mitosis y los índices de fases (IF). Asimismo, se elaboró el cariotipo de esta planta con el fin de proporcionar mayor información sobre la citología de esta especie. Para ello se usó 8-Hidroxiquinolina 2 mM durante 2 horas a 4 °C. Se contaron 5 033 células y se determinó que la hora mitótica se encontraba a las 7:00 am, mientras que el IM fue igual a 15.24 %. Las frecuencias de los estadios mitóticos fueron 368 células en profase; 211 en metafase; 69 células en anafase y 119 en telofase. Los índices de fases (IF) obtenidos fueron: 47.99 para profase; 27.51 para metafase; 8.99 en anafase y 15.51 en telofase. Por otra parte, el cariotipo de *A. vera* consta de 7 pares de cromosomas ($2n = 14$), todos los cromosomas son submetacéntricos con longitudes que varían entre 5.55 μm y 17.76 μm .

Palabras claves: *Aloe vera*, citogenética, mitosis, cariotipo.

Abstract

Sabila (*Aloe vera*) belong to the Liliaceae family. It is a medicinal and commercially important plant. This specie is common in xerofitic areas of the Zulia and Falcon States in Venezuela. In this work, was carried out a cytogenetic study in root tip cells of *A. vera* using the standard acetic-orcein squash technique in order to determine the mitotic hour and mitotic index (MI). In addition the mitotic phase frequency and phase index were calculated in base of 5 033 cells. It was found that the mitotic hour was 7:00 am and MI was 15.24 %. The frequencies of the mitotic stages were: 368 cells at prophase; 211 at metaphase; 69 cells at anaphase and 119 at telophase. The phases index (PI) obtained were:

Recibido el 25-04-1995 • Aceptado el 25-10-1996

1. La Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Citogenética. Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

47.99 at prophase; 27.51 at metaphase; 8.99 at anaphase and 15.51 at telophase. Karyotype analysis was made in *A. vera* ($2n = 14$) using root tips with 2 mM 8-Hidroxiquinoline at 4 °C for two hours. The karyotype of *A. vera* consists of fourteen submetacentric chromosomes with length range from 5.55 to 17.76 μm in length.

Key words: *Aloe vera*, cytogenetics, mitosis, karyotype.

Introducción

La zábila (*Aloe vera*) es un miembro de la familia Liliaceae (17, 14). El género *Aloe* es muy difundido en las zonas cálidas de los continentes Africano y Americano, con unas 200 especies de las más variadas formas y colores (14). *A. vera* es sólo una de las especies de mayor importancia económica y medicinal de este género. Es una planta exótica, estolonífera, mediterránea, nativa del norte de África (14). En Venezuela es muy común en las regiones xerofíticas de los Estados Zulia y Falcón, frecuente en patios y jardines (14, 17).

A. vera es una planta acaule o casi acaule (17). Consiste en una roseta basal de hojas erguidas, suculentas, gruesas, angosto-lanceoladas, de 30-60 cm de largo, con márgenes espinosos (14, 17). Las flores son amarillas, de unos 2.5 cm de largo, agrupadas en racimos sobre un pedúnculo erguido de más o menos un metro de alto (17).

Desde tiempos muy remotos, la zábila fue conocida por sus propiedades medicinales, de las hojas-cortadas se obtiene un zumo que al fluir es casi transparente y refleja tonalidades con brillos rojizos y verdosos con un olor característico. Los usos de ese zumo son muchos, las raíces también tienen propiedades medicinales. Además se utiliza en la industria de los cosméticos y como planta ornamental (14).

Los tejidos animales y vegetales en proliferación, desarrollan el llamado ciclo de división celular, el cual se divide en dos etapas: la mitosis y la interfase (6). El término mitosis, en un sentido estrictamente etimológico, se refiere a la división nuclear de las células eucarióticas (19) y es un proceso bastante complejo con los estadios convencionales ya conocidos en los tejidos de las plantas (13).

En las plantas existen tejidos conocidos como meristemas cuyas células se caracterizan por tener una división rápida y continua. Este es el caso de las células del extremo de la raíz de las plantas, las cuales se duplican cada 12 a 24 horas (13).

Las células radicales de *Allium cepa* (Cebolla) y las de *Vicia faba* L. (Habichuela) han sido ampliamente usadas para llevar a cabo estudios sobre el ciclo de división celular y la mitosis en sí (6, 19) debido a su fácil disponibilidad y manejo, sencillez en las condiciones de crecimiento y otras características. El uso de este material teñido con diferentes colorantes ha proporcionado una gran cantidad de datos cuantitativos así como cualitativos sobre los efectos citológicos de drogas (6), estudios citotaxonómicos (5, 10, 12, 20), mejoramiento genético de especies vegetales tales como trigo (*Triticum aestivum* L.) (22), maíz (*Zea*

mays L.) (2, 3, 9, 11, 18), alfalfa (*Medicago sativa* L.) (7) y otras que contribuyen a enriquecer el conocimiento sobre la citología de los organismos estudiados.

El estudio cromosómico de una célula se hace durante el proceso de mitosis específicamente en metafases de células tratadas con antimitóticos ya que es en ésta donde las copias duplicadas de los cromosomas se separan entre sí (19).

El número de cromosomas (n) varía ampliamente entre las especies eucarióticas, abarcando desde el mínimo encontrado en *Myrmecia pilosula* (n = 1) hasta superar los 600

en el helecho *Ophioglossum pycnostichum* (4). Sin embargo, cada especie de planta o animal tiene un número característico de cromosomas el cual permanece constante de generación en generación (8).

En este trabajo se llevó a cabo un estudio citogenético en células radicales de *A. vera* utilizando la técnica de aplastado con aceto-orceína al 2 % con el objeto de determinar la hora mitótica, el índice mitótico (IM) y los índices de fases (IF), así como también elaborar el cariotipo de esta planta con el fin de proporcionar mayor información sobre la citología de esta especie.

Materiales y métodos

Se utilizó como material de estudio los extremos radicales de plantas de *A. vera*. Las plantas usadas se obtuvieron de jardines en Maracaibo, Venezuela. En todos los casos se utilizaron plantas con tamaños semejantes. Se cultivaron en recipientes de vidrio con agua de filtro renovada cada 24 horas. Las raíces se cortaron cuando éstas alcanzaron de 1.5 a 2 cm de longitud en un lapso de tiempo comprendido desde las 6:00 am hasta las 10:00 am con intervalos de corte de 30 minutos, con el fin de establecer la hora mitótica. Una vez cortadas las raicillas, éstas se fijaron en Carnoy (etanol-ácido acético 3:1) y se colocaron en nevera por 24 h a 4 °C. Después de la fijación, se lavó el material en agua destilada y se hidrolizó el tejido en HCl 50 % durante 10 minutos. Para la tinción de las raíces se usó aceto-orceína 2 % durante 15 minutos. Se cortó el extremo de la raíz y se hizo el

aplastado con los dedos cuidando de no producir deslizamiento del cubreobjetos.

El cálculo del número de células a estudiar (tamaño de la muestra, «n») se realizó utilizando la siguiente ecuación estadística:

$$n = Z_{\alpha/2}^2 \times S^2 / e^2 \quad (21)$$

Donde:

$Z_{\alpha/2}$ = representa el nivel de confianza, delimita el 95 %. $Z = 1.96$. S = desviación estándar. e = representa el error de muestreo, aproximadamente el 10 % de la media de los valores del estudio.

Según esta ecuación estadística, 1 263 aproximadamente es el valor mínimo de células que deben analizarse para obtener resultados confiables.

En este trabajo se estudió un total de 5 033 células, discriminadas en células en interfase y células en mitosis.

Los cálculos del índice mitótico (IM) y los índices de fases (IF) en *A. vera* se llevaron a cabo usando las ecuaciones utilizadas por Del Campo (6) en trabajos realizados con Lirio (*Zephyrantes* sp.). De esta manera, el IM se obtuvo mediante la ecuación: $IM = (\text{No. de células en mitosis} / \text{No total de células}) \times 100$.

El cálculo de los IF se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación en cada una de las fases de la mitosis: $IF = (\text{No. de células en fase} / \text{No. total células en mitosis}) \times 100$.

Para la elaboración del cariotipo, las raíces se colocaron en 8-Hidroxi-quinolina 2 mM durante 4 horas en nevera a 4 °C. Posteriormente se

fijaron en Carnoy y se siguió el mismo procedimiento antes descrito para la elaboración de las preparaciones. Veinte células de metafases mitóticas se estudiaron para el análisis cariotípico.

El análisis microscópico de las preparaciones se llevó a cabo en un fotomicroscopio Zeiss, usando películas Kodak 135 mm asa 100/21 ° para copias en color, tomando microfotografías con una magnificación de 1000X.

Las mediciones de los cromosomas se realizaron usando micrómetros de platina y de ocular con el objetivo de 100X.

Resultados

Determinación del proceso mitótico en *A. vera* En este trabajo se observó mayor cantidad de células en mitosis a las 7:00 am. Los resultados presentados en el cuadro 1 corresponden a los conteos realizados a dicha hora.

Una vez determinada la hora mitótica se procedió a realizar el estudio microscópico de las poblaciones meristemáticas durante mitosis e interfase, con el objeto de conocer estos periodos en *A. vera*.

Las frecuencias de las diferentes fases de la mitosis en *A. vera* se muestran en el cuadro 1. Para tal efecto se analizó un total de 5 033 células obteniéndose los siguientes resultados: se contaron 368 células en profase; 211 en metafase; 69 células en anafase y 119 en telofase y además se contaron 4 266 células en interfase.

El índice de fase (IF) señala el porcentaje de células que se encontraban en cada una de las fases de la mitosis al realizar el estudio. De acuerdo con el cuadro 1, los índices de fases obtenidos para células de meristemas radicales de *A. vera* son: 47.99 para profase; 27.51 para metafase; 8.99 en anafase y 15.51 en telofase. La figura 1 muestra microfotografías de los estadios del proceso mitótico en *A. vera*. Todas las fases de la mitosis fueron observadas.

La figura 2 muestra los porcentajes de células que se encontraban en mitosis y en interfase a la hora de corte (7:00 am). Cuando se calcula el IM, éste indica el porcentaje de células que se hallan en mitosis. Por tanto, si se supone que todo el ciclo celular dura 100 % y el IM es igual a 15.24 %, entonces el porcentaje de células en

Cuadro 1. Frecuencias de las fases mitóticas y de interfase e índices de fases mitóticas en células radicales de *Aloe vera* L.

Fase	Frecuencia (No. de células)	Índices de fases mitóticas
Profase	368	47.99
Metafase	211	27.51
Anafase	69	8.99
Telofase	119	15.51
Interfase	4 266	----
Total	5 033	----

interfase será igual a 94.76 %.

Cariotipo. El cariotipo de *A. vera* consta de 7 pares de cromosomas ($2n = 14$). Como se observa en las figuras 3 y 4, todos los cromosomas son submetacéntricos con centrómero submediano y brazos cortos conspicuos.

Los cariotipos se elaboraron siguiendo el procedimiento acostumbrado de enumerar los cromosomas en orden descendente de tamaño, del más largo al más corto. *A. vera* presenta

cuatro pares de cromosomas grandes y tres pares pequeños. Así, los dos primeros pares de cromosomas son los más grandes, ambos con longitudes aproximadas de 17.76 μm . El par número tres tiene una longitud de 16.65 μm mientras que el par número cuatro presenta cromosomas con longitudes de 15.54 μm . Los tres últimos pares de cromosomas son los más pequeños, con longitudes de 6.66 μm para el par cinco y 5.55 μm para los pares seis y siete.

Discusión

Los meristemos radicales, por su facilidad de obtención y división permanente, son los más usados para estudios celulares y cromosomales en plantas. Es por ello que este estudio se llevó a cabo utilizando células del tejido meristemático de raíces de *A. vera*

Determinación de la hora mitótica y del índice mitótico. El número de células que se encuentran en mitosis en una planta varía de una hora a otra (19). Algunos autores han trabajado con plantas para investigar la hora mitótica en células radicales,

entre estos, Zabala y Molina (23), quienes demostraron que la hora mitótica de la lechosa, *Carica papaya* var. Thailandia red, estaba entre las 7:00 y 7:15 am. En este estudio se encontró que la hora mitótica de *A. vera* es 7:00 am.

Diversos autores han llevado a cabo estudios sobre índice mitótico siguiendo diferentes propósitos y utilizando distintas especies. Del Campo (6), utilizó Lirio (*Zephyranthes* sp.) con el fin de estudiar los cambios citológicos que ocurren aplicando



Figura 1. Microfotografías de células en mitosis de meristemos radicales de *Aloe vera* L., 1000X. (A) Células en profase. Se observa también una célula en interfase. (B) Célula en metafase. (C, D) Células en anafase. (E) Célula en telofase. (F) Célula en telofase tardía, puede observarse la placa celular que dividirá el protoplasto en dos para formar las nuevas células hijas.

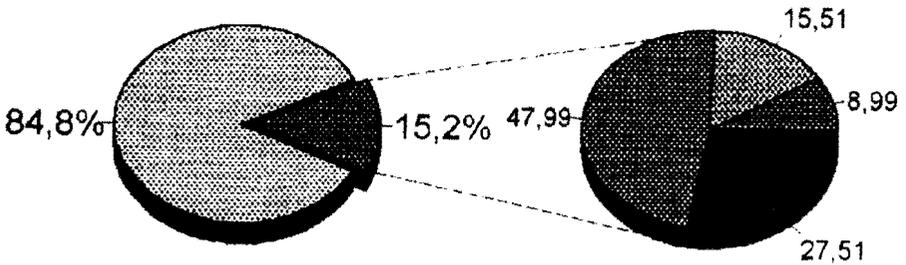


Figura 2. Periodos de mitosis e interfase en células radicales de *Aloe vera* L. La mitosis ocupa un 15.2 % mientras que la interfase alcanza un 84.8 %.

distintas drogas a los meristemos radicales. De igual manera, Rickards (16) estudió el comportamiento mitótico en inflorescencias de *Allium triquetrum* (Liliaceae).

El índice mitótico obtenido en este estudio difiere con el de Almasan *et al.* (1) quienes reportaron un IM igual a 12.76 % en cromosomas premetafásicos de *A. vera* (*Aloe barbadensis* Mill.). En el material de estudio analizado y a través de la metodología utilizada, el índice mitótico fue igual a 15.24 % (figura 2).

Esta variación del IM puede explicarse por efecto de la temperatura, tipo de célula, longitud de la raíz al ser cortada, hora de corte de las raíces y otras variables (6, 15, 19).

Determinación del proceso mitótico en *A. vera*. El proceso mitótico de *A. vera* aparece como una serie de acontecimientos morfológicos que incluyen la condensación de la cromatina y la desorganización y nueva organización del núcleo en dos células hijas.

La figura 1 muestra las diferentes etapas de la mitosis en *A. vera* obtenidas en este estudio. Las observaciones realizadas, eminentemente

descriptivas, confirman lo que se conoce hasta hoy día sobre el proceso mitótico en células vegetales.

De acuerdo con lo que se ha señalado, la mitosis generalmente ocupa del 5 % al 10 % del total del ciclo celular (15). De esta manera, los estadios de la mitosis son relativamente cortos comparados con la larga duración de la interfase. Según Raven *et al.* (15), las fases de la mitosis son variables en longitud siendo la profase la más larga y la anafase la más corta. En este sentido, las frecuencias de las fases mitóticas (cuadro 1) permanecen dentro de los rangos normales reportados en la literatura (8, 15).

Los índices de fases en este estudio concuerdan con otros autores (6), manteniéndose dentro de los límites normales.

Cariotipo. Los conteos de cromosomas se corresponden con aquellos reportados por Almasan *et al.* (1) en *A. vera* (*A. barbadensis* Mill.) ($2n = 14$) con ocho cromosomas largos y seis cortos. Sin embargo, la descripción morfológica dada en dicho estudio con cromosomas premetafásicos difiere de las observaciones realizadas en el presente trabajo. Estos autores clasi-

ficar los cromosomas en cuatro grupos: grupo I, cromosomas con centrómero subterminal; grupo II, cromosomas con centrómero submediano; grupo III, cromosomas con centrómero mediano y grupo IV, cromosomas con centrómero terminal. No obstante, los resultados aquí mostrados contradicen los reportados por Almasan *et al.* (1) ya que en este estudio, todos los cromosomas son submetacéntricos con un centrómero submediano y brazos cortos conspicuos aún en los cromosomas más pequeños (figuras 3 y 4).

Esta situación puede explicarse por el hecho de que las observaciones de Almasan *et al.* (1) fueron llevadas a cabo en período de premetafase en el cual los cromosomas podrían presentar cierta contracción que haría posible la clasificación que reportan estos

autores, diferente a la presentada en este trabajo realizado en metafases mitóticas. Así mismo, es necesario tener en cuenta la posibilidad de estar tratando con dos variedades diferentes de *Aloe*.

Por otra parte, las mediciones de los cromosomas reportadas por Almasan *et al.* (1) se refieren a longitudes relativas las cuales varían entre 0.1 para los cromosomas largos y 0.03 para los cortos. Esto difiere de las mediciones realizadas en este estudio, las cuales se hicieron utilizando micrómetros de platina y de ocular y están referidas a la longitud total del cromosoma, encontrándose valores que varían entre 17.76 μm aproximadamente para los cromosomas más largos y 5.55 μm para los más cortos (figuras 3 y 4).



Figura 3. Célula metafásica (a) y cariotipo (b) de *Aloe vera* L.

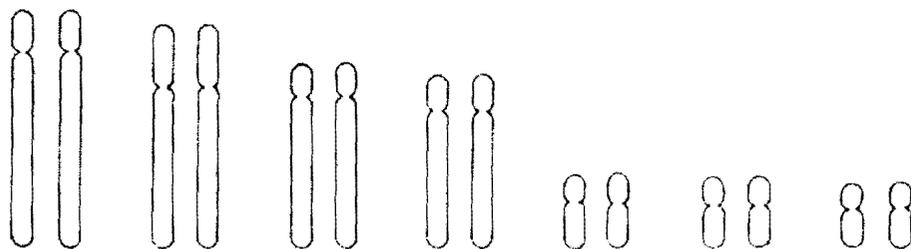


Figura 4. Idiograma de los cromosomas de *Aloe vera* L.

Los datos encontrados en este estudio proporcionan información adicional útil para el conocimiento de la citogenética de *A. vera*, una planta medicinal típica de la región zuliana, así como de otras regiones de Venezue-

la y el resto del mundo. Se hace necesario continuar estos estudios en *A. vera* utilizando técnicas de tinción diferencial y bandeo con el fin de lograr una mejor caracterización de los cromosomas de esta planta.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento a los Profesores Francisca Tong, Atilio Higuera y Alejandra Páez

por la revisión del manuscrito. Asimismo, agradecemos al Dr. Darío Espina por la elaboración de los gráficos.

Literatura citada

- Almasan A. A., A. A. Barrion, C. M. V. Casal, P. G. R. De La Cruz. 1991. Karyotype analysis of sabila, *Aloe barbadensis* Mil. (Liliales: Lilia-ceae). Philippine Agriculturist 74: 261-264.
- Arboleda F., C. Diaz, J. A. Rivera, J. D. Moreno. 1988. Programa nacional del maíz: objetivos, resultados y proyecciones. ICA Actualidades 2(23): 1-2.
- Bejarano A., V. Segovia, N. Rosales, A. Moreno, L. Andrade. 1993. Impacto del desarrollo de híbridos en la producción maicera. FONALAP Divulga 9(37): 14.
- Bennet M. D., J. B. Smith, A. G. Seal. 1986. The karyotype of the grass *Zingera biebersteiniana* ($2n = 4$) by light and electron microscopy. Can. J. Genet. Cytol. 28: 554-562.
- Cai Q., S. Lu, C. C. Chinnappa. 1987. Analysis of karyotypes and giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. Genome. 29: 187-194.
- Del Campo A. 1988. Biología del ciclo de división celular. Ediciones Astro Data S. A. Maracaibo, Venezuela.
- Denton C. R., T. J. McCoy. 1987. Cytogenetic analysis of interspecific hybrids between alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *M. rhodopea* Velen. Genome 29: 853-858.
- De Robertis E. D. P., F. A. Sáez, E. M. F. De Robertis. 1978. Biología celular. Novena Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. pp. 19-24, 240-255.
- Díaz C., M. E. Botero, F. Arboleda, J. A. Rivera. 1988. Banco colombiano de germoplasma de maíz I. Adaptación de las colecciones colombianas. ICA Actualidades 2(23): 3-4.
- Lee M., R. L. Phillips. 1987. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. Genome 29: 122-128.

11. Lee M., R. L. Phillips. 1987. Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. *Genome* 29: 834-838.
12. Linde-Laursen I. B., R. Von Bothmer, N. Jacobsen. 1989. Giemsa C-banded karyotypes of *Hordeum marinum* and *H. murinum*. *Genome* 32: 629-639.
13. Novikoff A. B., L. Boltzman. 1978. Estructura y dinámica celular. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.
14. Oliva Esteva F. 1981. Plantas de los jardines de Venezuela. Ediciones Armitano C.A. Caracas, Venezuela.
15. Raven P., R. F. Evert, H. Curtis. 1976. Biology of plants. Second Edition. Worth Publishers, INC. New York, U.S.A.
16. Rickards G. K. 1986. Differential mitotic behaviour of genetically balanced and unbalanced microspores of an interchange heterozygote of *Allium triquetrum*. *Can J. Genet. Cytol.* 28: 926-931.
17. Schnee L. 1973. Plantas comunes de Venezuela. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Caracas, Venezuela. p. 737.
18. Sierra M., R. E. Preciado, J. J. Alcazar, F. A. Rodríguez. 1991. Selección familiar de progenies de hermanos completos en poblaciones de maíz para el trópico mexicano. *Turrialba* 41(2): 202-210.
19. Swanson C., T. Merz, W. J. Young. 1981. Cytogenetics. The chromosome in division, inheritance, and evolution. Second Edition. Prentice Hall, INC. Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A.
20. Torabinejad J., J. G. Carman, C. F. Crane. 1987. Morphology and genome analyses of interspecific hybrids of *Elymus scabrus*. *Genome* 29: 150-155.
21. Wayne D. 1985. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Primera edición. Editorial Limusa. México.
22. Youssef S. S., R. Morris, P. S. Baenziger, C. M. Papa. 1989. Cytogenetic studies of progenies from crosses between «Centurk» wheat and its doubled haploids derived from anther culture. *Genome* 32: 622-628.
23. Zabala D., J. Molina. 1993. Determinación del proceso mitótico en *Carica papaya* var. *Thailandia red*. En: Resumen pp. 230. XI Congreso Venezolano de Botánica. Mérida, Venezuela.