

Estudios cariológicos en dos especies de *Clematis* (Ranunculaceae)

Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada

Instituto de Genética. Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251. (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.
Autor correspondiente: paezvaleria@hotmail.com

► **Resumen** — Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada. 2015. "Estudios cariológicos en dos especies de *Clematis* (Ranunculaceae)". *Lilloa* 52 (1). El género *Clematis* L. de distribución cosmopolita, esta adaptado a diversos hábitats en regiones templadas y frías. Las especies estudiadas del género estudiadas en el presente trabajo, *C. haenkeana* C. Presl y *C. montevidensis* Spreng. var. *montevidensis* son nativas de Sudamérica y presentan amplia distribución en Argentina. Los antecedentes citogenéticos del género establecieron un número básico estable $x = 8$, y para las especies sudamericanas se citan escasas referencias citológicas. El objetivo del trabajo es caracterizar y analizar comparativamente ambas especies del género que habitan el Noroeste argentino. Las preparaciones microscópicas se obtuvieron mediante el empleo de técnicas convencionales. El análisis citológico determinó que ambos taxones presentan complemento cromosómico diploide $2n = 16$, fórmula cariotípica de $5m + 1st + 2t$, índice de asimetría bajo y un marcado polimorfismo de un par cromosómico telocéntrico portador de satélite.

Palabras clave: Cariotipo, *Clematis haenkeana*, *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*, fórmula cariotípica, número esporofítico.

► **Abstract** — Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada. 2015. "Karyological studies in two species of *Clematis* (Ranunculaceae)". *Lilloa* 52 (1). Species of the genus *Clematis* are cosmopolitan, growing in temperate and cold regions and being adapted to different habitats. The species of the genus included in the present study, *Clematis haenkeana* C. Presl and *Clematis montevidensis* Spreng. var. *montevidensis*, are native of South America, having a wide distribution in Argentina. Previous works indicate a stable base number $x = 8$, with only a few cytological references for southamerican species. This paper aims to comparatively and compare both species of the genus which live in Northwest of Argentina. The slides were obtained by conventional techniques. Cytological analyses have determined that both taxa present diploid chromosome complement $2n = 16$, with karyotypic formula composed by $5m + 1st + 2t$, low asymmetry indices and a marked polymorphism in a pair of telocentric chromosomes which bears a satellites.

Keywords: *Clematis haenkeana*, *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*, karyotype, karyotypic formula, sporophytic number.

INTRODUCCIÓN

La familia Ranunculaceae incluye aproximadamente 2500 especies de distribución cosmopolita. El género *Clematis* L. está representado por alrededor de 350 especies adaptadas a diversos hábitats en regiones templadas y en zonas tropicales montañosas (Sheidai *et al.*, 2009). Se cita para Argentina seis especies, dos de las cuales crecen en el Noroeste argentino (NOA): *C. haenkeana* C. Presl y *C. montevidensis* Spreng. var. *monte-*

vidensis (Lourteig, 1951; Lehnebach, 2008). Esta última ocupa una extensa región que incluye Brasil, Perú, Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina. En nuestro país esta presente en todas las provincias fitogeográficas excepto en la andina, antártica y patagónica. *Clematis haenkeana* vive en el norte de Sudamérica en los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina, donde alcanza en el NOA a lo largo de la cordillera de los Andes, las provincias de Catamarca, Jujuy, Salta, incrementando su radio de distribución en la provincia de Tucumán (Lourteig, 1951; 1956).

Ambos taxones están representados por largas lianas de aproximadamente 5 metros de longitud, con flores verde-amarillentas, hermafroditas o unisexuadas (Lourteig, 1951). Son nativas y pueden habitar altitudes de hasta 3.000 msm (Lehnebach, 2008).

Los análisis sistemáticos y cladísticos dan cuenta que Ranunculaceae representa una familia monofilética (Hoot, 1991). Mientras que, los estudios citológicos determinaron la separación de la familia en dos grandes grupos basados en el tamaño de los cromosomas y el número básico. Por ello Langlet (1932) incluye en el grupo T al género caracterizado por cromosomas cortos, pequeños y número básico $x = 7$ o 9 como *Thalictrum*, mientras en el grupo R, los cromosomas son grandes, largos y número básico $x = 8$ propio de *Ranunculus* y *Clematis*.

Los antecedentes citogenéticos del género *Clematis* son escasos y el conocimiento que se dispone, proviene de especies de Asia, Europa y América del Norte (Dawson, 1993; Roy y Sharma, 1971; Kumar *et al.*, 2008; Mikeda *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2011) y para América del Sur sólo se registra el recuento gametofítico de $n = 8$ II para *C. montevidensis* en la flora de Argentina y Paraguay (Hunzinker *et al.*, 1985; Molero *et al.*, 2006). La mayoría de las especies estudiadas son diploides y solamente el 10 % poliploides, con ejemplos de $2n = 48$ para *C. paniculata* Thunb. y *C. terniflora* DC y $2n = 32$ en *C. songarica* Bunge (Mikeda *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2011). Entre las referencias preliminares, se destaca la presencia de pares cromosómicos portadores de satélite (Roy y Sharma, 1971; Kumar *et al.*, 2008; Mikeda *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2011). En la bibliografía se cita cariotipos con satélite heteromorfo en ciertos cromosomas de los taxones tetraploides de *Ranunculus ficaria* L. (Marchant y Brighton, 1971).

No se conocen estudios citogenéticos en especies del género *Clematis* del NOA, por lo que el objetivo del presente trabajo es caracterizar y analizar comparativamente los dos taxones del género *Clematis* (*C. haenkeana* y *C. montevidensis* var. *montevidensis*) que se distribuyen en esta región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los taxones empleados en este estudio *Clematis haenkeana* (Fig. 1A) y *C. montevidensis* var. *montevidensis* (Fig. 1B) pertenecen a poblaciones naturales de la provincia de Tucumán (Argentina), las que fueron herborizadas y depositadas en el herbario fanerogámico de la Fundación Miguel Lillo (LIL).

C. haenkeana: ARGENTINA. Prov. Tucumán, Dpto. Trancas, Loc. Gonzalo, 30/III/2010, Páez V (LIL 610888), *Lozzia M.* (LIL 610889-610891).

C. montevidensis var. *montevidensis*: ARGENTINA. Tucumán, Dpto. Trancas, Loc. San Vicente, 05/III/2008, *Lozzia M.* (LIL A 610763-B 610763).

El estudio mitótico se realizó a partir de radículas obtenidas de semillas germinadas en cámara húmeda, bajo condiciones de laboratorio. El material se trató con una solución de colchicina al 1% durante 4 horas, con fijación posterior en la mezcla alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1) durante 24 horas. Luego se transfirió a alcohol 70° y se conservó a -4°C hasta su utilización. Las raicillas, previo a la tinción con hematoxilina propiónica al 2 %, se hidrolizaron durante 15 minutos en HCl 1N a 60° C. Las preparaciones microscópicas se obtuvieron por el método de squash. Para la confección de los cariotipos las mediciones cromosómicas de las placas metafásicas, se efectuaron con el programa MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001). Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la estimación de la morfología cromosómica, longitud total del cromosoma (C), longitud del brazo largo (L), longitud del brazo corto (S) e índice centromérico (Ic.), se basaron en la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). Las asimetrías cromosómicas se calcularon según la metodología de Romero Zarco (1986) y finalmente para el análisis de los satélites se siguió a Battaglia (1955).

Las microfotografías se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse E 200 conectado a un video cámara Moticam 1000. Los idiogramas fueron construidos con el programa CorelDraw X3.

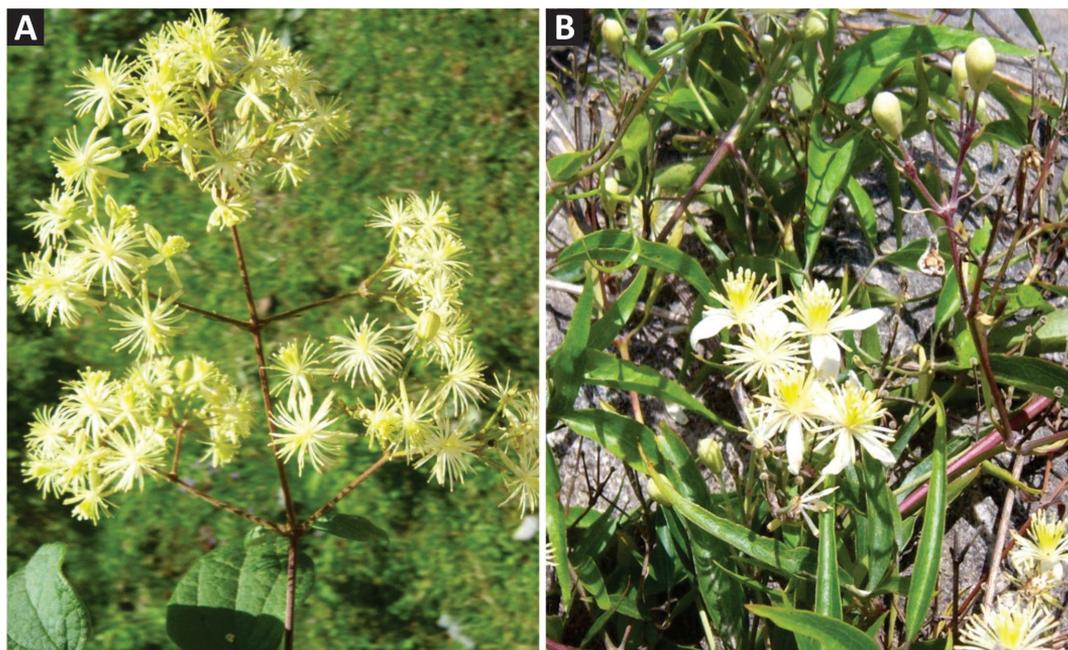


Fig. 1. A) *Clematis haenkeana*. B) *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*.

RESULTADOS

El estudio mitótico aportó igual número diploide $2n = 16$ en las poblaciones de *C. montevidensis* var. *montevidensis* y *C. haenkeana*. Las longitudes cromosómicas en *C. montevidensis* var. *montevidensis* (Fig. 2) oscilaron entre $10,58 \mu\text{m}$ y $21,43 \mu\text{m}$. Los parámetros utilizados para analizar la morfología de los cromosomas como longitud total del cromosoma, longitud de los brazos cromosómicos e índice centromérico se vol-

caron en la Tabla 1. La información aportada por los cromosomas permitió conocer la fórmula cariotípica $5m + 1st + 2t$ (Fig. 3A), con la que se construyó el idiograma (Fig. 3B).

Los datos obtenidos de las mediciones cromosómicas de *C. haenkeana* (Fig. 4) revelaron longitudes en el rango de $9,3 \mu\text{m}$ y $16,7 \mu\text{m}$. Asimismo el análisis cromosómico se muestra en la Tabla 2; el cariotipo está conformado por $5m + 1st + 2t$ (Fig. 5A) y el idiograma correspondiente (Fig. 5B).

Tabla 1. Características cromosómicas de *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*. Longitud total (C); longitud brazo largo (L); longitud del brazo corto (S); índice del complemento cromosómico (Ic)

Par cromosómico	C (μm) $\bar{x} \pm \text{EE}$	L (μm) $\bar{x} \pm \text{EE}$	S (μm) $\bar{x} \pm \text{EE}$	Ic %	Tipo cromosómico
1	21,43 \pm 5,96	12,22 \pm 2,26	9,17 \pm 3,60	42,60	m
2	18,44 \pm 2,95	10,22 \pm 0,31	8,25 \pm 2,68	44,22	m
3	17,12 \pm 1,59	9,08 \pm 0,88	8,04 \pm 2,47	47,19	m
4	16,45 \pm 0,95	9,54 \pm 0,42	6,91 \pm 1,34	42,27	m
5	15,42 \pm 0,10	8,50 \pm 1,46	6,92 \pm 1,35	45,23	m
6	13,25 \pm 2,24	10,56 \pm 0,60	2,69 \pm 2,88	20,27	st
7	11,19 \pm 4,20	9,84 \pm 0,12	1,35 \pm 4,22	12,30	t
8	10,89 \pm 4,91	9,69 \pm 0,27	1,20 \pm 4,37	11,13	t

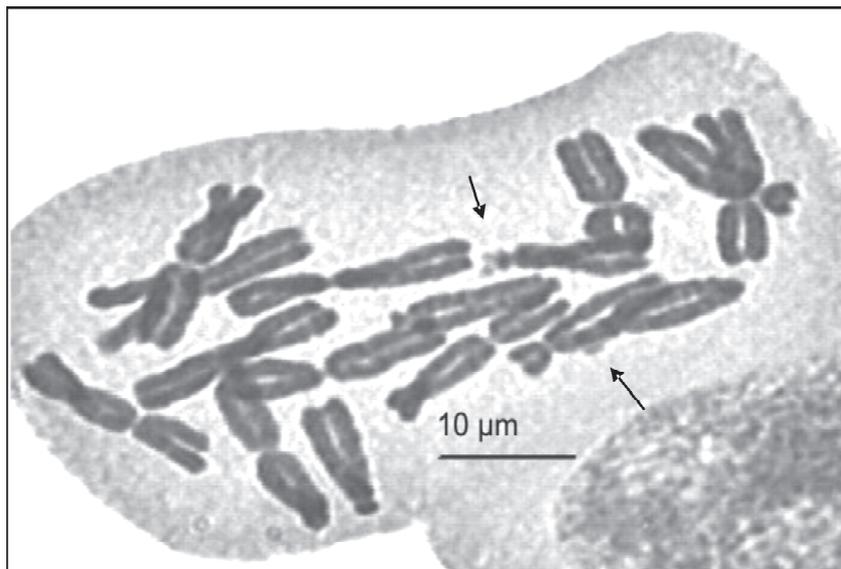


Fig. 2. Metafase mitótica de *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*. Las flechas indican el satélite. Escala 10 μ m.

El análisis comparativo de la morfología cromosómica de *C. montevidensis* var. *montevidensis* y *C. haenkeana* se presenta en la Tabla 3 donde se expresa la asimetría intra e intercromosómica respectivamente.

Las observaciones permitieron identificar satélites en el par cromosómico 7 (siete) en ambas especies. Siendo en *C. montevidensis* var. *montevidensis* donde se destacan severas diferencias morfológicas que permiten reconocer distintos tipos de cromosomas telocéntricos. En ocasiones el satélite se presenta como una estructura bipartita de tamaños diversos o como una formación cuadriparti-

ta; también como variante extrema, se observó un largo filamento cromatínico uniendo el brazo cromosómico con el satélite (Fig. 6). En *C. haenkeana* este par cromosómico no exhibe diferencias en la morfología del satélite, el cual es terminal.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El género *Clematis* se presenta en las poblaciones naturales con una diversidad morfológica muy marcada. Sin embargo, los estudios cariológicos en las especies estudiadas hasta el momento, muestran uniformidad de

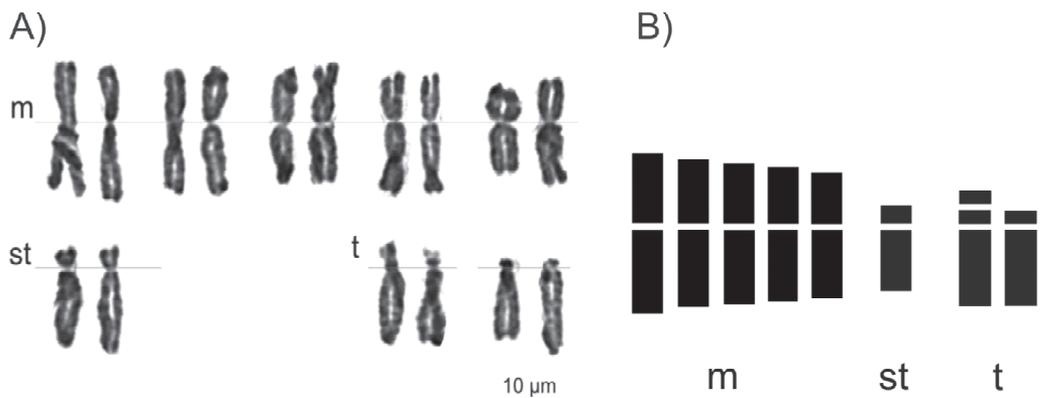


Fig. 3. *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*. A) Cariograma. B) Idiograma. Escala 10 μ m.

Tabla 2. Características cromosómicas de *Clematis haenkeana*. Longitud total (C); longitud brazo largo (L); longitud del brazo corto (S); índice del complemento cromosómico (Ic).

Par cromosómico	C(μm) $\bar{x} \pm EE$	L (μm) $\bar{x} \pm EE$	S (μm) $\bar{x} \pm EE$	Ic%	Tipo cromosómico
1	16,69± 4,06	9,05± 1,13	7,64± 2,94	45,95	m
2	15,40± 2,77	8,42± 0,50	6,98±2,28	45,38	m
3	14,57± 1,95	8,00± 0,08	6,57±1,87	45,02	m
4	13,99± 1,37	7,81± 0,11	6,18± 1,48	44,21	m
5	12,97± 0,35	7,38± 0,54	5,59± 0,89	43,05	m
6	8,49± 4,14	6,54± 1,38	1,95± 2,75	22,50	st
7	9,51± 3,12	8,11± 0,19	1,40± 3,30	14,77	t
8	9,37± 3,26	8,06± 0,14	1,31± 3,39	14,23	t

número y estructura interna de los cromosomas (Roy y Sharma, 1971; Yang, 2002).

Los índices de asimetría indican que *C. montevidensis* y *C. haenkeana* presenta idéntica variación intercromosómicas (A2) con valores relativamente bajos, sin embargo ésta última especie exhibe mayor asimetría intracromosómica (A1).

Estudios cromosómicos de especies del género en China y en poblaciones naturales de Nueva Zelanda como por ejemplo *C. kockiana* Schneid., *C. rehderiana* Craud., *C. brevicaudata* DC., *C. afoliata* Buchanan, *C. cunninghamii* Turcz., *C. foetida* Raoul, revelaron una fórmula cariotípica uniforme coincidente con los resultados obtenidos para *C. montevidensis* var. *montevidensis* y *C. haenkeana* (Dawson, 1993; Yang, 2002). Sin embargo, sólo en las especies de Nueva Zelanda se describe cromosomas telocéntricos portadores de satélites heteromórficos, identificado en *C. marata* J. Armstr., *C. cunninghamii* Turcz., *C. marmoraria* Sneddon y *C. quadribacteolata* Colenso (Dawson, 1993). En éstas se observan variaciones en el tamaño del satélite, tanto entre los miembros del par cromosómico de una misma célula, como entre cromosomas de células diferentes (Dawson, 1993). Asimismo el cuerpo cromatínico unido por un delgado filamento al satélite propiamente dicho, que se observó en *C. montevidensis* var. *montevidensis*, también se ha registrado en *C. marata* y plantas masculinas de *C. quadribacteolata*, por lo que Dawson (1993) sugiere que existe una

estrecha relación entre estas dos últimas especies. El satélite heteromórfico se detecta tempranamente en la familia Ranunculaceae, los que podrían haberse generado por una translocación recíproca sin consecuencias en la división celular (Marchant y Brighton, 1971). No obstante, estos autores señalan que en *Liliaceae* la descripción de satélites heteromórficos se asocia a irregularidades de comportamiento durante la segregación cromosómica en mitosis.

No se le atribuye ventajas evolutivas a la presencia del par de satélite heteromórfico y las explicaciones de su existencia pueden considerarse meramente especulativas. Se podría relacionar su origen a hibridación ancestral entre los taxones o como un mecanismo para la determinación del sexo como lo propone Dawson (1993).

Ranunculaceae es una familia polibásica con números básicos más frecuentes que varían en el rango de $x = 5$ a $x = 10$; números diploides hasta $2n = 154$ se han descrito en los taxones (Kumar y Subramaniam, 1986). No obstante en la familia, al género *Clematis* se lo considera monobásico en donde $x = 8$ es el número más común, aún cuando se ha descrito algunas especies con $2n = 18, 32$ (*C. ispanhica* Boiss, *C. flammula* L, *C. mandschurica* Rupr.), 36, 44, 48 (*C. paniculada* Thunb.) y 49 (Meurman y Therman, 1938; Sheidai et al., 2009). Los antecedentes destacan que la poliploidía no es un rasgo común en el género, pero los números cromosómicos observados, nos in-

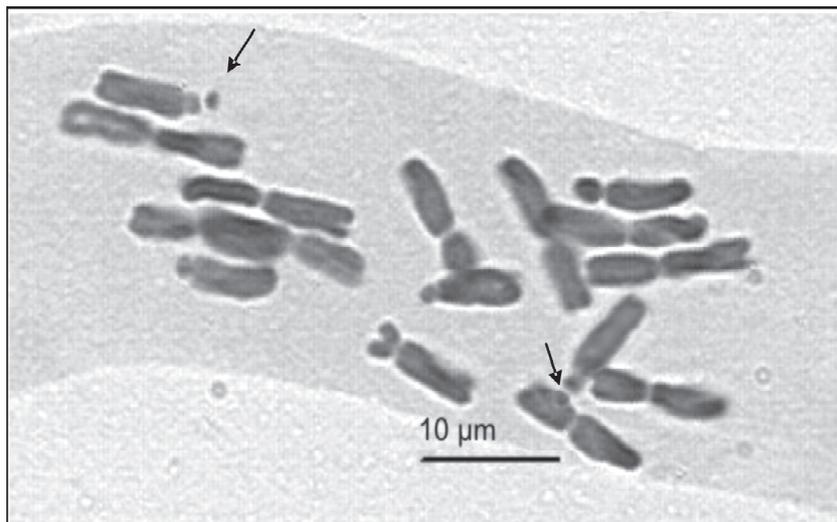


Fig. 4. Metafase mitótica de *Clematis haenkeana*

dican ser estrictamente monobásicos, con lo que se acercan a las características citológicas de la familia. Meurman y Therman (1938) argumentaron que no basta con la morfología de los cromosomas mediante la elaboración de cariotipos (por la estabilidad que presentan los mismos) para establecer si los taxones son auto o aloploidos, por lo cual los autores sugirieron complementar con estudios del comportamiento meiótico.

Clematis montevidensis var. *montevidensis* y *C. haenkeana* muestran en base al análisis citológico, un complemento cromosómico diploide $2n = 16$, resultados que confirman la acentuada estabilidad de los cariotipos, principal característica del género. El alto grado

de similitud se extiende a la fórmula cariotípica descrita de $5mt + 1st + 2t$, según los antecedentes de estudios realizados en *Clematis* (Meurman y Therman, 1938). Asimismo, Yang (2002) estudió seis especies de *Clematis* con $2n = 16$ cromosomas, en las cuales pudo observarse la misma fórmula cariotípica registrada en nuestros estudios.

En resumen, es importante destacar que a pesar de la amplia distribución y la variedad morfológica que se presenta en el género, citogenéticamente son marcadamente similares. En este caso, los cambios evolutivos en el género no fueron muy trascendentales o bien ellos habrían obrado hacia cambios que favorecen a la uniformidad. Los taxones

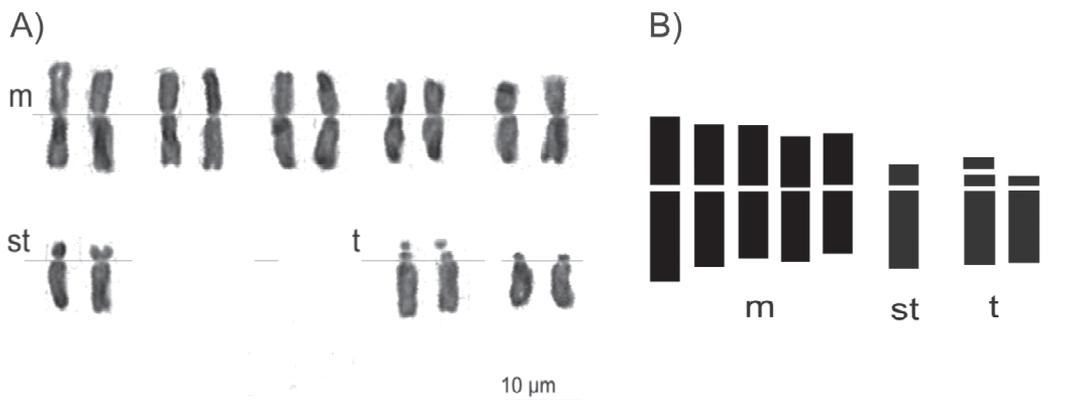


Fig. 5. *Clematis haenkeana* A) Cariograma. B) Idiograma. Escala 10 μm.

Tabla 3. Análisis numérico de los cariotipos en *Clematis montevidensis* var. *montevidensis* y *C. haenkeana*. IC: índice centrómero; A₁: variación intracromosómica; A₂: variación inter-cromosómica.

Datos	<i>C. montevidensis</i> var. <i>montevidensis</i>	<i>C. haenkeana</i>
2n	16	16
Fórmula cariotípica	5 m + 1 st + 2 t	5 m + 1 st + 2 t
Satélites	Par 7	Par 7
Rango de variación	10,58 - 21,43 μm	9,3 - 16,7 μm
IC	33,15	34,38
A ₁	0,05	0,40
A ₂	0,23	0,21

aquí estudiados según Langlet (1932) pertenecen al tipo R, clasificación apoyada por recientes estudios realizados sobre la base de importantes parámetros de análisis filogenéticos como el tipo y número cromosómico (Rani *et al.*, 2011).

Es necesario el desarrollo de nuevos estudios cariológicos en taxones de América del Sur, ya que desde una perspectiva citogenética, la ausencia de este tipo de análisis nos

impide comprender íntegramente al género *Clematis*.

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. María Sara Caro por su lectura crítica y sugerencias realizadas. A la Lic. Lelia Bordón de la Sección Iconografía del Área Botánica de la FML, por la realización y digitalización de las láminas.



Fig. 6. A) Variación morfológica de cromosomas con satélites en *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*. B) Representación gráfica de cromosomas con satélites. Escala 5 μm.

BIBLIOGRAFÍA

- Battaglia E. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8 (1): 179-187.
- Dawson M. I. 1993. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora-31 *Clematis* (Ranunculaceae). *New Zealand Journal of Botany* 31: 91-96.
- Hoot S. 1991. Phylogeny of the Ranunculaceae based on epidermal microcharacters and macromorphology. *Systematic Botany* 16 (4): 741-755.
- Hunziker J. H., Xifreda C. C., Wulff A. F. 1985. Estudios cromosómicos en angiospermas de Sudamérica. *Darwiniana* 26: 7-14.
- Kumar P., Singhal V., Kaur J. 2008. Cytomixis induced meiotic abnormalities in pollen mother cells of *Clematis flammula* L. (Ranunculaceae). *Cytologia* 73 (4): 381-385.
- Kumar P., Subramaniam B. 1986. Chromosome atlas of flowering plants of The Indian subcontinent Vol.I Dicotyledones. *Botanical Survey of India, Calcuta, India*. 464 pp.
- Langlet O. 1932. Über Chromosomenverhältnisse und Systematic der Ranunculaceae. *Svensk Botanisk Tidskrift* 26: 381-400.
- Lehnebach C. 2008. Ranunculaceae en: *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*. Volumen 3. Zuloaga F. O., Morrone O., Belgrano M. J. Editores. Missouri Botanical Garden Press. 1636 pp.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lourteig A. 1951. Ranunculáceas de Sudamérica Templada. *Darwiniana* 9 (3-4): 397-608.
- Lourteig A. 1956. Ranunculáceas de Sudamérica tropical. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*. XVI (43): 19-88.
- Marchant C., Brighton A. 1971. Mitotic instability in the short arm of a heteromorphic SAT-Chromosome of tetraploid *Ranunculus ficaria* L. *Chromosome* 34: 1-18.
- Meurman O., Therman E. 1939. Studies on the chromosome morphology and structural hybridity in the genus *Clematis*. *Cytologia* 10: 1-14.
- Molero J., Daviña J., Honfi A., Franco D., Rovira A. 2006. Chromosome studies on plants from Paraguaray II. *Candollea* 61 (2): 373-392.
- Mikeda O., Kita K., Handa T., Yukawa T. 2006. Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 153-168.
- Rani S., Kumar S., Jeelani S., Kumari S., Gupta R. 2011. Cytological studies in some members of family Ranunculaceae from Western Himalayas (India). *Caryologia* 64 (4): 405-418.
- Reeves A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44: 439-443.
- Romero Zarco C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35 (3): 526-530.
- Roy S. C., Sharma A. 1971. Cytotaxonomic Studies on Indian Ranunculaceae. *Nucleus* 14: 132-143.
- Sheidai M., Habib M., Azizyan D., Khatamsaz M. 2009. Cytology and palynology of the *Clematis* L. species (Ranunculaceae) in Iran. *Acta Botánica Croatica* 68 (1): 67-77.
- Yang Q. 2002. Cytology of ten species in *Anemone*, one in *Anemone* and six in *Clematis* (Trib. Anemoneaceae, Ranunculaceae) from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 40 (5): 396-405.