

Estudios citológicos en *Piper tucumanum* C. DC. y *Piper hieronymi* C. DC.

Andrada A. R.; M. E. Lozzia; M. E. Cristóbal

Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251. (4000) Tucumán, Argentina. e-mail: rubenan03@yahoo.com.ar

► **Resumen** — Estudios Citológicos en *Piper tucumanum* C. DC. y *Piper hieronymi* C. DC. Andrada A. R., M. E. Lozzia y M. E. Cristóbal. *Lilloa* 46. 2009. El género *Piper* es el más numeroso dentro de las Piperaceae con distribución pantropical; representado en Argentina por 10 especies. En este trabajo se estudia citogenéticamente *P. hieronymi* ($2n = 26$; $n = 13$) y el poliploide *P. tucumanum* ($n = 26$) y se evalúa la viabilidad de polen de estas especies del NO argentino. Ambas presentan irregularidades cromosómicas en la meiosis y medianos porcentajes de viabilidad de polen. Se discute el probable origen híbrido del número $x = 13$ como poliploide secundario entre dos especies con $x = 7$ y $x = 6$.

Palabras clave: Piperaceae, *Piper hieronymi*, *Piper tucumanum*, citomixis, viabilidad de polen, poliploidía.

► **Abstract** — Estudios Citológicos en *Piper tucumanum* C. DC. y *Piper hieronymi* C. DC. Andrada A. R., M. E. Lozzia y M. E. Cristóbal. *Lilloa* 46. 2009. The genus *Piper* is the largest one in the Piperaceae family with pantropical distribution. In Argentina it is represented by 10 species. In this paper they are studied cytogenetically and valued the pollen viability of *P. hieronymi* ($2n = 26$, $n = 13$) and *P. tucumanum* ($n = 26$), a polyploid from NW of Argentina. Both of them show chromosomal irregularities in meiosis and moderate levels of pollen viability. The probable origin of the number $n = 13$ as a secondary polyploid between two species with $x = 7$ y $x = 6$ is discussed.

Keywords: Piperaceae, *Piper hieronymi*, *Piper tucumanum*, citomixis, pollen viability, polyploidy.

INTRODUCCIÓN

Piperaceae es una familia de distribución pantropical que comprende alrededor de 3000 especies e incluye 8 a 13 géneros con relaciones taxonómicas confusas entre ellos (Mathew *et al.*, 1999). El género *Piper* es el más grande dentro de la familia y cuenta con alrededor de 1200 especies de distribución pantropical, con el mayor número de representantes en la región neotropical (Samuel, 1987). En Argentina el género se distribuye en la región norte del país pasando su límite austral por Tucumán, Chaco y Corrientes (Novara, 1998). Cuenta con 10 especies, una endémica, *P. tucumanum*, (Zuloaga & Morrone, 1999).

Numerosas especies de *Piper* tienen importancia económica, por sus propiedades ornamentales (Nair, 2007), alimenticias

(Mathew *et al.* 1999), medicinales (Martínez Crovetto, 1981). Recientemente se utilizaron extractos de *P. aduncum* como controlador biológico del díptero *Aedes aegypti* (Rafael *et al.*, 2008).

El género *Piper* constituye una serie de especies poliploides (Nair, *et al.*, 1993) cuyos números básicos de $x = 12$, 13 fueron propuestos y discutidos por diferentes autores. En este trabajo se realiza el estudio citológico de las especies argentinas *P. hieronymi* y *P. tucumanum*, características de la región fitogeográfica de las yungas

Piper hieronymi C. DC. es un arbusto o arbolito de hasta 6 m de altura, de hojas pubescentes, con pelos cortos. Se distribuye por el NOA en bosques y selvas húmedas de Jujuy, Salta y Tucumán (Novara, 1998).

Piper tucumanum C. DC. es un arbusto o arbolito de 3 a 8 m de altura, hojas asimétricas, palmatinervadas. Se distribuye en el NOA, entre los 400 y 600 msm de las provin-

cias de Jujuy, Salta y Tucumán (Villa Careño, 1977).

Este trabajo forma parte de los estudios citológicos que el Instituto de Genética de la Fundación M. Lillo lleva a cabo en la flora del Noroeste argentino, a los fines de contribuir al esclarecimiento de problemas taxonómicos y evolutivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

P. hieronymi: Ruta 307, Km 22. Dpto Tafí del Valle, Tucumán, 26/05/08. R. Andrada LIL 609.732; Loc. La Toma (Dpto. Tafí Viejo) 27/09/07. R. Andrada LIL 609.734 y Loc. Cochuna (Camping Municipal), Dpto. Chichigasta. Tucumán. 20/04/08. R. Andrada LIL 609.738.

P. tucumanum: Ruta 307, Km 22, Dpto. Tafí del Valle. Tucumán. 26/05/08. R. An-

drada LIL 609.739. La Toma (Dpto. Tafí Viejo) 27/09/07. R. Andrada LIL 609.733; Jardín Botánico de la Fundación Miguel Lillo, Dpto. Capital. Tucumán. 12/04/08. R. Andrada LIL 609.740.

Para el estudio mitótico, primordios foliares de *P. hieronymi*, de aproximadamente 1 cm. de longitud, fueron pretratados con 8-hidroxiquinoleína 0,002 M durante 9 horas a temperatura ambiente y fijados en etanol y ácido láctico (5:1). El material se hidrolizó en HCl 1 N durante 15 minutos a 60° C; la tinción y el aplastado se realizaron con una gota de orceína acética 2 %.

En ambas especies el análisis de la meiosis se hizo en células madres de polen (CMP) fijadas en etanol y ácido acético 3:1 respectivamente; la tinción y el aplastado se efectuaron del mismo modo que para la mitosis.

La viabilidad de polen se determinó con

Irregularidades de CMP en meiosis						
Especie	<i>Piper hieronymi</i>			<i>Piper tucumanum</i>		
	Nº células	regular	irregular	Nº células	regular	irregular
Profase I	113	100 %	-	203	98,57 %	1,43 %
Metafase I	222	97,75 %	2,25 %	320	97,50 %	2,50 %
Anafase I	337	93,47 %	6,53 %	27	88,89 %	11,11 %
Telofase I	300	98,67 %	1,33 %	177	100 %	-
Profase II	-	-	-	-	-	-
Metafase II	311	76,17 %	23,83 %	159	74,84 %	25,16 %
Anafase II	24	95,84 %	4,16 %	16	93,75 %	6,25 %
Telofase II	117	77,47 %	22,53 %	244	99,51 %	0,49 %

Viabilidad de polen (n = 1000 granos)		
Especie	Granos viables	Granos inviables
<i>Piper hieronymi</i>	77,80 %	22,20 %
<i>Piper tucumanum</i>	97,70 %	2,30 %

Tabla 1. Irregularidades meióticas más frecuentes y viabilidad de polen expresadas en porcentajes.

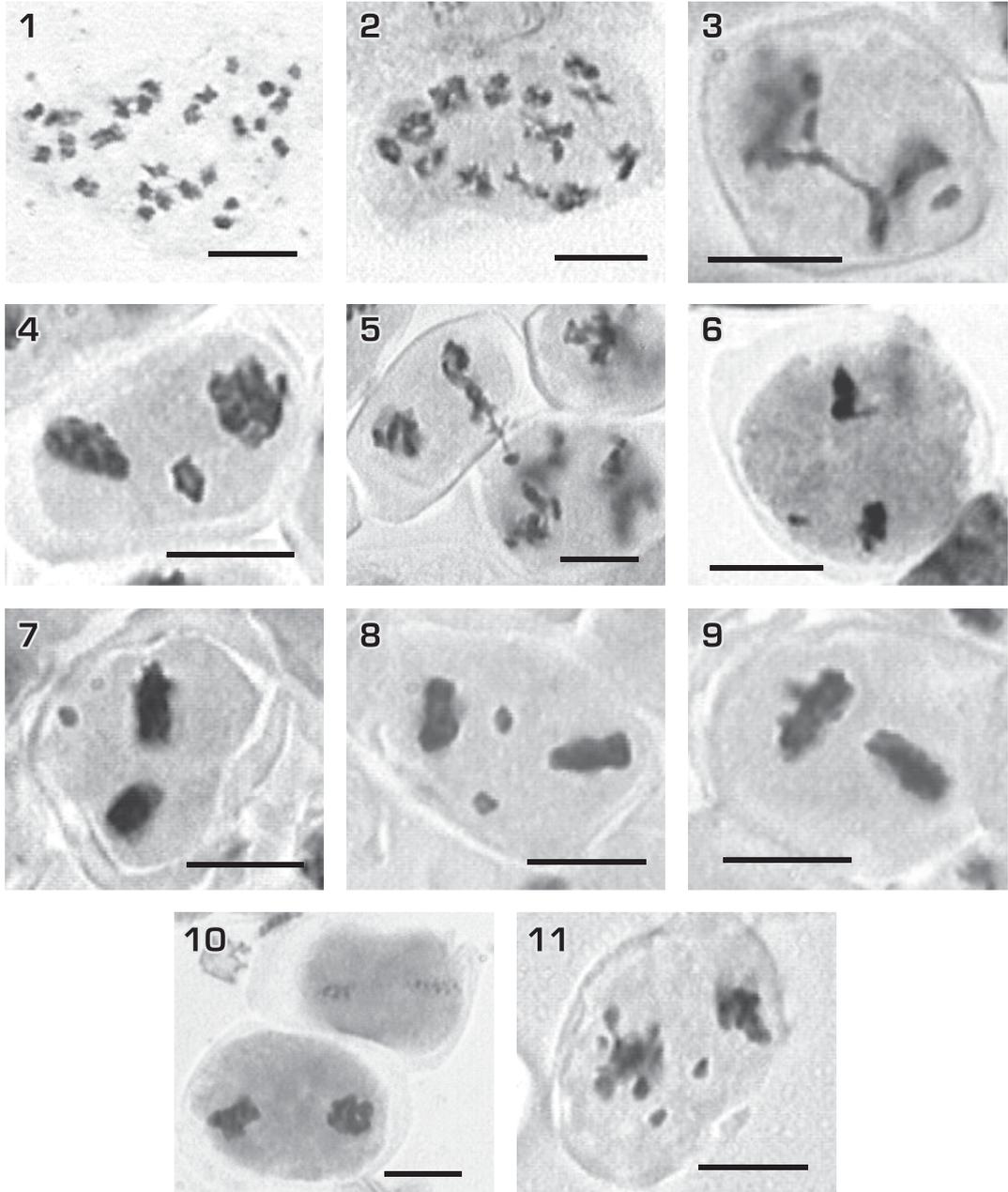
Tétradas normales y anormalidades más frecuentes (n = 724)						
	Normales	Mónadas	Diádas	Citomixis	Péntadas	Héxadas
<i>Piper hieronymi</i>	97,02 %	0,41 %	-	0,55 %	0,97 %	1,05 %
<i>Piper tucumanum</i>	96,56 %	-	0,55 %	-	0,82 %	2,07 %

Tabla 2. Desarrollo de tétradas normales y anormalidades más frecuentes expresadas en porcentaje.

glicerol y carmín acético (1:1) en 1000 granos de polen por preparado.

En las Tablas 1 y 2 se reúnen los resulta-

dos del análisis de la meiosis, formación de tétradas y viabilidad de polen para cada una de las especies.



Figs. 1-11: *Piper hieronymi*. 1: Metafase mitótica, $2n = 26$ cromosomas. 2: Diacinesis con 13 II. 3: AI con puente de cromatina. 4: TI con tres núcleos, uno pequeño. 5: TI con citomixis entre dos células. 6, 7 y 8: MII con cromosomas fuera de placa. 9: MII con las placas en disposición perpendicular. 10: MII, dos células con cromosomas en diferentes grados de condensación. 11: AII con dos cromosomas fuera de placa. Escala = 6 μ m.

RESULTADOS

Piper hieronymi

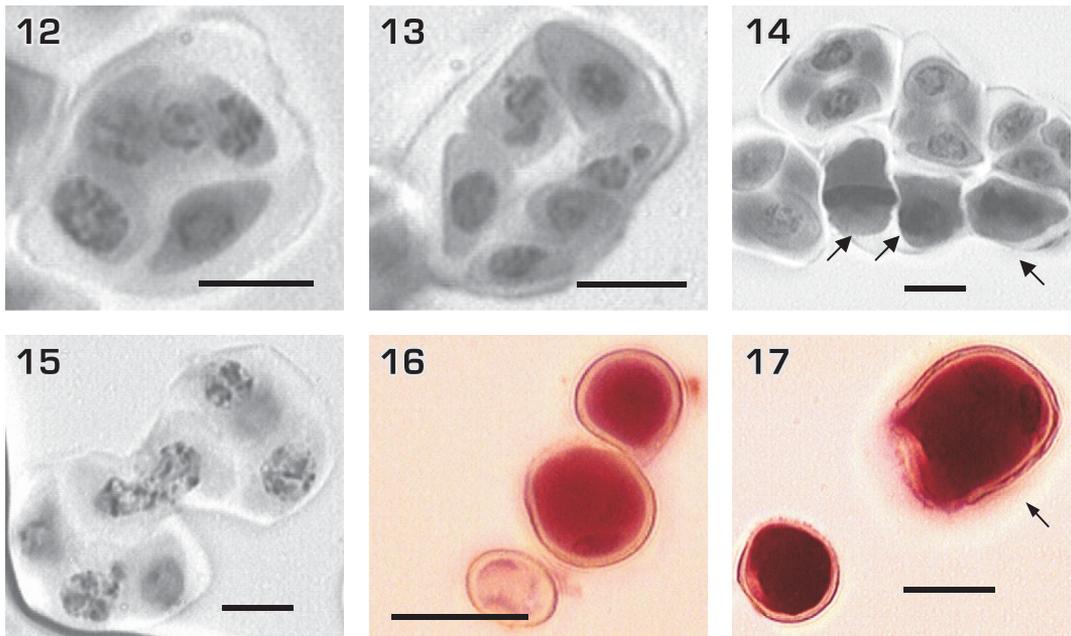
Los números cromosómicos somáticos y gaméticos fueron de $2n = 26$ (Fig.1) y $n = 13$ (Fig. 2), respectivamente.

Las MI se desarrollaron normalmente; en AI se observaron puentes de cromatina (Fig. 3) y en TI se presentaron tres núcleos, uno de ellos de pequeño tamaño (Fig. 4) y citomixis entre dos células (Fig. 5). En MII se observó en ocasiones 1 o 2 cromosomas fuera de placa (Figs. 6, 7 y 8), frecuentemente las placas ecuatoriales dispuestas perpendicularmente entre sí (Fig. 9) y células con cromosomas con niveles diferentes de condensación (Fig. 10). En AII se pudo observar un par de cromosomas fuera de placa (Fig. 11). Los porcentajes de las irregularidades meióticas se expresan en la Tabla 1. Las esporadas presentaron las siguientes irregularidades (ver Tabla 2): péntadas, hexasdas (Fig. 12 y 13) algunas héptadas, mónadas (Fig. 14) y citomixis (Fig. 15). Los granos

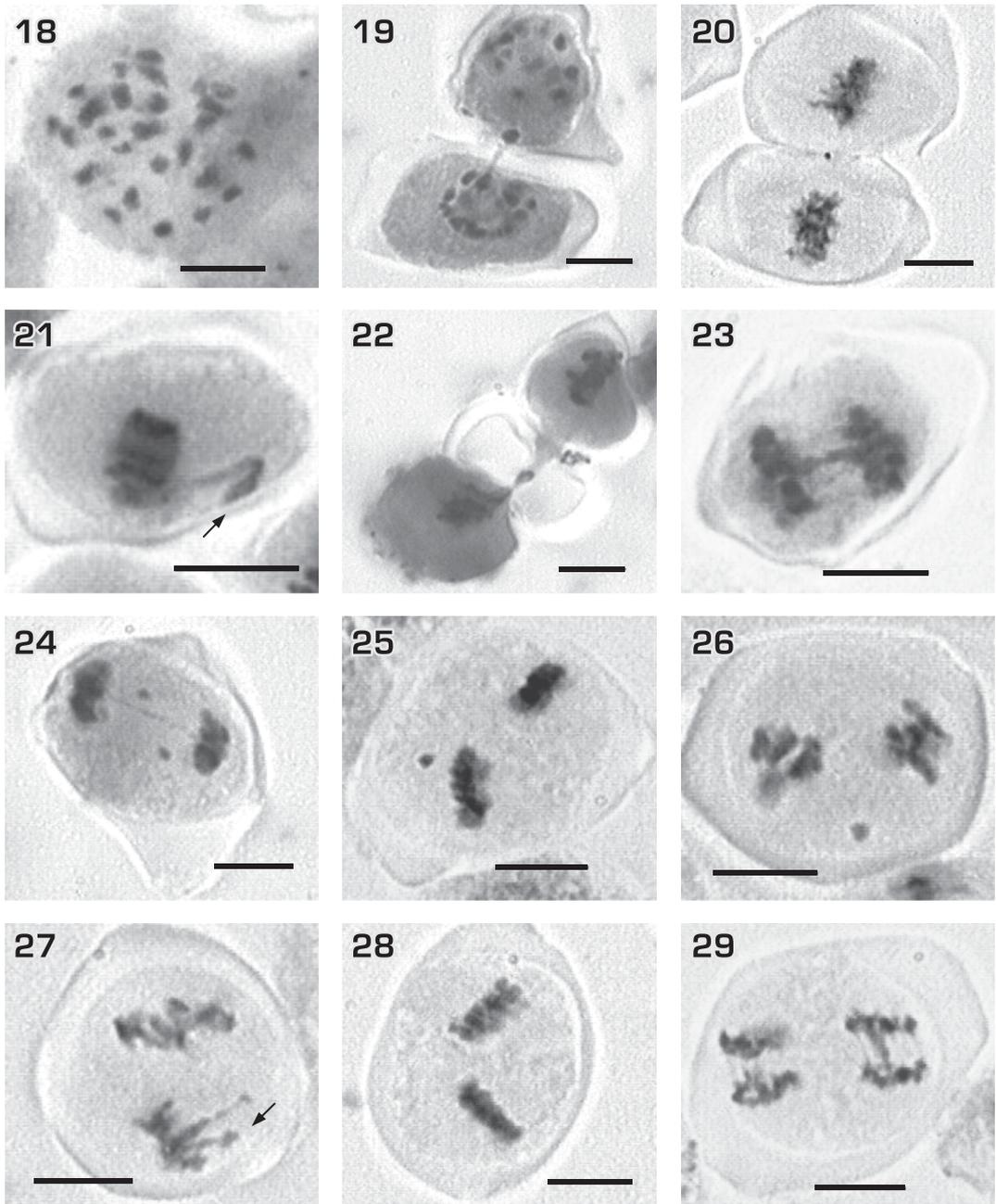
de polen fueron viables en un 77,8 % (ver Tabla 2); poseen un diámetro promedio de $11,6 \mu\text{m}$; se observaron granos de polen coloreados de menor tamaño, $\pm 9,0 \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. 16) y otros de gran tamaño con un diámetro de $\pm 17,6 \mu\text{m}$ (Fig. 17).

Piper tucumanum

El número gamético es $n = 26$ bivalentes (Fig. 18). El tamaño de las CMP es variable entre $21,70$ y $30,36 \mu\text{m}$. En diacinesis suele presentarse citomixis entre dos células (Fig. 19). En algunas MI los cromosomas parecen descondensados (Fig. 20); en la Fig. 21 se observa una conexión de cromatina interrumpida durante esta etapa (Kumar *et al.*, 2008); en la Fig. 22 se observa citomixis de material nuclear y citoplasmático. En las Figs. 23 y 24, AI con puentes de cromatina y cromosomas rezagados en la región ecuatorial respectivamente; las TI se desarrollan normalmente. Durante las MII se presentaron cromosomas fuera de placa (Figs. 25 y 26); dos conexiones de cromatina interrumpidas



Figs. 12-17: *Piper hieronymi*. 12: Péntadas. 13: Hexasdas. 14: Mónadas (3) entre las tétradas. 15: Tétradas con citomixis. 16: Grano de polen viable normal acompañado de un grano viable más pequeño y uno estéril no coloreado. 17: Granos viables, normal y jumbo. Escala = $6 \mu\text{m}$ (Figs. 12-15). Escala = $15 \mu\text{m}$ (Figs. 16 y 17).



Figs. 18 - 29: *Piper tucumanum*. 18: Diacinesis con 26 II. 19: Diacinesis con citomixis entre dos células. 20: MI con cromosomas con aspecto descondensado. 21: MI con una conexión de cromatina interrumpida. 22: MI con citomixis entre dos células. 23: AI con puente de cromatina. 24: AI con puente y cromosomas rezagados. 25 y 26: MII con cromosoma fuera de placa. 27: MII con dos conexiones de cromatina interrumpidas. 28: MII con las placas ecuatoriales dispuestas perpendicularmente. 29: AII con múltiples puentes de cromatina. Escala = 6 μ m.

pida (Fig. 27) y placas ecuatoriales en disposición perpendicular (Fig. 28). Se pudo observar en AII, formación de múltiples puentes de cromatina (Fig. 29); las irregularidades meióticas que se presentan han sido reunidas en la Tabla 1. Se registraron péntadas y hexas (Fig. 30 y 31 respectivamente) y algunas díadas (Fig. 32). La viabilidad de polen estimada fue 97,70 % y el diámetro promedio de los granos coloreados (viables) $17,7 \mu\text{m}$ (Fig. 33). También se registraron granos viables de mayor tamaño con un diámetro de $21,8 \mu\text{m}$ aproximadamente (Fig. 34). En la Tabla 2 se detallan los porcentajes de las anormalidades en el desarrollo de las esporadas y la viabilidad de polen.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

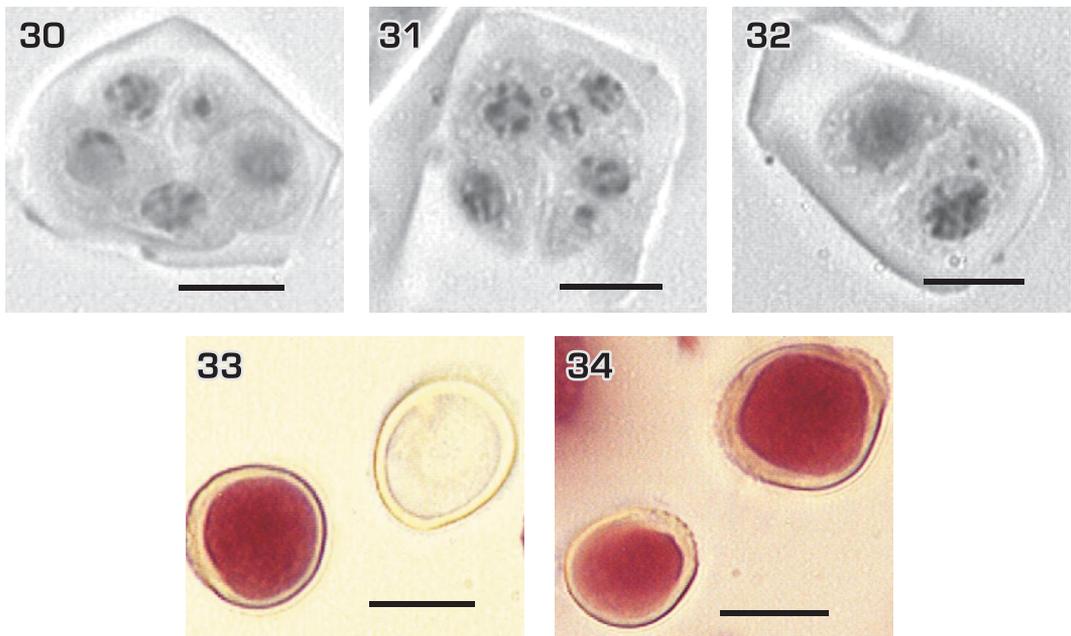
La mayoría de los recuentos cromosómicos corresponden a las especies del sur de la India, en las americanas los estudios citológicos son escasos.

En este trabajo se realizaron por primera vez análisis citogenéticos en dos especies

argentinas de *Piper*. Los recuentos cromosómicos fueron en *P. hieronymi* $n = 13$, $2n = 26$ y en *P. tucumanum* $n = 26$.

La determinación del número cromosómico básico de *Piper* ha sido diferente según los autores. Darlington & Wyile (1955) mencionan $2n = 24, 28, 32$ y 128 , recuentos que resultaron contradictorios al momento de determinar los números básicos correspondientes; Dasgupta & Datta (1976), Lewis (1980), Jose & Sharma (1984) proponen $x = 12$.

Los estudios de Mathew (1958) que reconocen un número $x = 13$ para especies de la India fueron confirmados por Smith (1966), Samuel (1987), Nair (1993), Mathew *et al.* (1999) y por nuestros recuentos. A estos antecedentes debe agregarse la hipótesis de Mathew (1999) que considera niveles diferentes de ploidía en *Piper* y según Lewis (1980) los recuentos varían de $x = 12$ a $10x$. Para este autor las Annonales ($x = 7$) son un orden primitivo entre cuyos miembros, verdaderos paleopoliploides, se incluye a la familia Piperaceae y al género *Piper* como un poliploide de origen secundario.



Figs. 30 a 34: *Piper tucumanum*. 30: Péntada. 31: Hexas. 32: Díada. 33: Grano de polen viable (teñido) y no viable (sin color). 34: Granos de polen viables, uno normal y otro de mayor tamaño. Escala = $6 \mu\text{m}$ (Figs. 30 a 32); Escala = $15 \mu\text{m}$ (Fig. 33 y 34).

Los resultados de este trabajo indican que *P. hieronymi* sería un diploide y *P. tucumanum* un tetraploide. El número básico $x = 13$, según Mathew (1958), se produciría a partir de dos números básicos ancestrales ($x = 6$ y $x = 7$) por poliploidía híbrida ($7 + 6 = 13$).

Las investigaciones meióticas revelan que las anteras de una misma flor en las dos especies, poseen CMP en estadíos de maduración diferentes (una antera más avanzada que la otra). Las irregularidades que se producen frecuentemente serían determinantes de la formación de héxadas, péntadas, diádas, mónadas (Tabla 2). Citomixis se presentaría en ambas especies en todas las fases de la meiosis, por ejemplo en profase I de *P. tucumanum* (Fig. 19) y durante la formación de tétradas en *P. hieronymi* (Fig. 15).

En *P. hieronymi* granos de polen de mayor tamaño ($17,6 \mu\text{m}$), que superan el diámetro de $11,6 \mu\text{m}$ de los granos normales para esta especie (Fig. 19), serían los granos jumbo o granos de polen no reducidos ($2n$) (Panseri *et al.*, 2003), presencia que siempre ha sido relacionada con la poliploidía en las plantas (De Wet, 1980). Nair *et al.* (1993) en sus investigaciones en híbridos interespecíficos y autotriploides de *Piper nigrum*, informa la presencia de granos de polen con un número variable de cromosomas que dan lugar también a progenies con números variables de cromosomas. Responsables de esta anomalía son las segregaciones de cromosomas no apareados y también de la citomixis en las células madre.

Los estudios citológicos en *Piper* sp. son escasos (Nair, 2007), especialmente en las especies del noroeste argentino. Los resultados citogenéticos y de viabilidad de polen de dos especies de *Piper*; que se dan a conocer en este trabajo, pretenden contribuir a la sistemática y a la filogenia de la familia Piperaceae.

BIBLIOGRAFÍA

Darlington, C. D. y Wylie, A. P. 1955. Chromosome atlas of flowering plants. George Allen and Unwin Ltd, London.

- Dasgupta, A. y Datta P. C. 1976. Cytotaxonomy of Piperaceae. Cytologia 41: 697-706.
- De Wet, J. M. J. 1980. Origins of polyploids. pp.3. In: Lewis, W. H. (Ed.). 1980. Polyploidy, Biological Relevance. Plenum Press, New York and London. 583 pp.
- Jose, J y Sharma, A. K. 1984. Chromosome studies in the genus *Piper* L. J. Indian Bot. Soc. 63: 313-319.
- Kumar P, V. K. Singal y Kaur J. 2008. Citomixis induced meiotic abnormalities in pollen mother cells of *Clematis flammula* L. (Ranunculaceae). Cytologia 73 (4): 381-385.
- Lewis, W. H. 1980. Polyploidy in Angiosperms: Dicotyledons. pp 241. In Lewis, W. H. (Ed.). 1980. Polyploidy, Biological Relevance. Plenum Press, New York and London. 583 pp.
- Martínez Crovetto, R. 1981. Plantas utilizadas en medicina popular en el Noroeste de Corrientes. Miscelánea N° 69, Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina, Min. Cult. y Educ. 139 pp.
- Mathew, P. M. 1958. Studies in Piperaceae. J. Ind. Bot. Soc. 37: 153-171
- Mathew, P. J., Mathew, P. M. y Pushpangadan, P. 1999. Cytology and its bearing on the systematic and phylogeny of the Piperaceae. Cytologia 64 (3): 301-307.
- Nair, R. R. 2007. Aneuploid variation of chromosome number in the somatic cells of *Piper magnificum* Trel. Cytologia 72 (2): 239-242.
- Nair, R. R., Sasikumar, B. y Ravadrán, P. N. 1993. Polyploidy in cultivar of black pepper (*Piper nigrum* L) and its open pollinated progenies. Cytologia 58: 27-31.
- Novara, L. J. 1998. Piperaceae. Flora del Valle de Lerma. C. A. Agard. Aportes Botánicos de Salta 5 (1): 1-24.
- Panseri, A., Peralta, S., Seijo, J. G. y Solís Neffa V. G. 2003. Evidencias de la presencia de gametos no reducidos en poblaciones diploides del complejo autopoliploide *Turnera sidoides* L. (Turneraceae). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. UNNE. Resumen: B-030.
- Rafael, M. S., Hereira-Rojas, W. J., Roper, J. J., Nunomura, S. M. and Tadei, W. P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. Genet. Mol. Res. 7 (3): 772-781.
- Samuel, R. 1987. Chromosome numbers in *Piper*. Kew Bull. 42 (2): 465-470.
- Smith, J. B. 1966. Chromosome numbers in *Peperomia* Ruiz y Pav. (Piperaceae) and note on chromosome number of *Piper magnificum* Trelease. Kew Bull. 20: 512-526.
- Villa Carenzo, M. 1977. Piperaceae. En Flora Ilustrada de la Provincia de Tucumán (1ª Entrega): 5-43. Minist. Cult. y Educ. de la Nación. Fundación M. Lillo. Tucumán. Argentina.
- Zuloaga, F. y O. Morrone. 1999. Piperaceae. En: Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. II. Missouri Botanical Garden Press. 91.