

Citogenética y rehabilitación de *Calceolaria lilloi* Descole & Borsini (Calceolariaceae)

Andrada, Aldo R.; María E. Lozzia; María E. Cristóbal

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

► **Resumen** — Andrada, A. R.; M. E. Lozzia; M. E. Cristóbal. 2010. "Citogenética y Rehabilitación de *Calceolaria lilloi* Descole & Borsini (Calceolariaceae)". *Lilloa* 47 (1-2). El género *Calceolaria* es exclusivo de América y tiene principalmente distribución neotropical. En este trabajo se realizaron estudios citológicos y se llevaron a cabo estudios de la morfología floral y seminal en *C. lilloi* Descole & Borsini. Algunos autores establecieron que *C. lilloi* es sinónimo de *C. chelidonioides* Khunt en base a estudios principalmente taxonómicos. Nuestros resultados, tanto citológicos como morfológicos permiten la rehabilitación del taxón *C. lilloi*, independiente de *C. chelidonioides*.

Palabras clave: Validez de especie, *Calceolaria lilloi*, *Calceolaria chelidonioides*, citogenética.

► **Abstract** — Andrada, A. R.; M. E. Lozzia; M. E. Cristóbal. 2010. "Cytogenetics and rehabilitation of the *Calceolaria lilloi* Descole & Borsini (Calceolariaceae)". *Lilloa* 47 (1-2). The genus *Calceolaria* is exclusive of America and it has Neotropical distribution mainly. Cytological studies were carried out, and also the floral and seminal morphology in *C. lilloi* Descole & Borsini was studied. Some authors established that *C. lilloi* is synonymous with *C. chelidonioides* Khunt which was based on taxonomic studies. Both results, the cytological and morphological ones allowed the rehabilitation of the taxon *C. lilloi*, independent of *C. chelidonioides*.

Keywords: Validity of species, *Calceolaria lilloi*, *Calceolaria chelidonioides*, cytogenetics.

INTRODUCCIÓN

El género *Calceolaria* L., tradicionalmente ubicado en la tribu Calceolarieae ha sido recientemente segregado de las Scrophulariaceae. Los recientes estudios filogenéticos y moleculares (Olmstead *et al.* 2001, 2005) y ciertas características florales, han determinado la decisión del cambio de rango de tribu, a familia Calceolariaceae (Stevens, 2001; Andersson, 2006).

Calceolaria es un género exclusivo de Centro y Sudamérica que cuenta con alrededor de 500 especies y distribución principalmente neotropical (Botta y Cabrera, 1993). En Argentina está representado por 42 especies, tres de las cuales son endémicas (Xifreda, 1999).

Calceolaria lilloi L. fue descrita originalmente por Descole y Borsini (1953) y citada como sinónimo de *C. chelidonioides* Kunth por Molau (1988). Botta y Cabrera (1993) reconocen a *C. lilloi* como un taxón

diferente de *C. chelidonioides* y posteriormente Xifreda (1999) considera nuevamente a *C. lilloi* sinónimo de *C. chelidonioides*.

Estudios citológicos mencionan $x = 9$ como número básico del género (Molau, 1988) y a la mayoría de las especies tetraploides. En hierbas anuales de las secciones *Calceolaria* y *Micranthera*, como en *C. tripartita* $2n = 32$ (tetraploide) y *C. chelidonioides* $2n = 64$ (octoploide) el número básico es $x = 8$.

En este trabajo el objetivo propuesto es evaluar la validez de *C. lilloi* como un taxón independiente o no de *C. chelidonioides*. Para tal fin se realizaron los siguientes estudios comparativos: de la morfología floral y seminal de *C. lilloi* y *C. chelidonioides* y el análisis citológico (mitosis y meiosis) de *C. lilloi* respecto a los resultados obtenidos por Molau (1988) en *C. chelidonioides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Calceolaria lilloi Descole y Borsini es una hierba anual de corola blanca, que crece en

suelos cenagosos y que puede alcanzar hasta 1 m de altura (Fig. 1). Fue coleccionada en zonas montañosas de la provincia de Jujuy a 2000 m snm.

MATERIAL ESTUDIADO

Argentina. Jujuy. Dpto. Humahuaca. Loc. Bárcena, 04/12/2008 Lozzia M. E. 609.736 (LIL).

Material adicional examinado:

C. lilloi L. Argentina. Jujuy, Dpto. Capital. Loc. Reyes, 1907, 44672 (LIL). Loc. Yala 1947, 208428 (LIL). Loc. Quebrada de San Lorenzo, 1947, 182861 (LIL). Salta, Dpto. Capital, 1969, 508112 LIL;

C. chelidonioides Kunth. Argentina: Jujuy. Dpto. Tumbaya. Loc. El Volcán, 44676, 4476, 44582 (LIL); Brasil: Prov. Paranaá, Dpto. Morretes 1916, 170129 (LIL); Loc. Parecí Novo, Montenegro, 1945, 24644 (LIL); Ecuador: 1954, 257677 (LIL).

Los recuentos cromosómicos de *C. lilloi* se realizaron en meristemas de ápices de raíz obtenidos a partir de semillas germinadas, pretratadas con frío (4°C) durante 24 horas y fijados en alcohol acético (3:1) 24 horas a temperatura ambiente y conservadas en al-



Figura 1. *Calceolaria lilloi* Descole y Borsini.

cohol 70%. La coloración utilizada fue hematoxilina propiónica al 2 %, con cristales de citrato férrico, previa hidrólisis con ácido clorhídrico 1N a 60° C durante 15 minutos.

El análisis meiótico se realizó en los botones florales de *C. lilloi*, fijados y conservado del mismo modo que las raíces. La tinción de las anteras y el montaje se efectuó en orceína lacto-acética al 2%.

El estudio de las ornamentaciones de la cubierta seminal (Molau, 1988), se realizó a partir de semillas colocadas en agua durante 24 horas; posteriormente se ejecuta el desprendimiento de la cubierta para ser analizada con microscopía óptica y fotografiada.

Las fotomicrografías se realizaron con Microscopio Nikon Eclipse E 200 y video cámara Moticam 1000, 1.3 MP

RESULTADOS

ESTUDIOS CITOLÓGICOS

EN *C. LILLOI*

C. lilloi tiene $2n = 32$ cromosomas (Tabla 1), de tamaño pequeño entre 1,2 a 1,4 μm (Fig. 2). El cariotipo es unimodal formado por cromosomas aparentemente meta-céntricos.

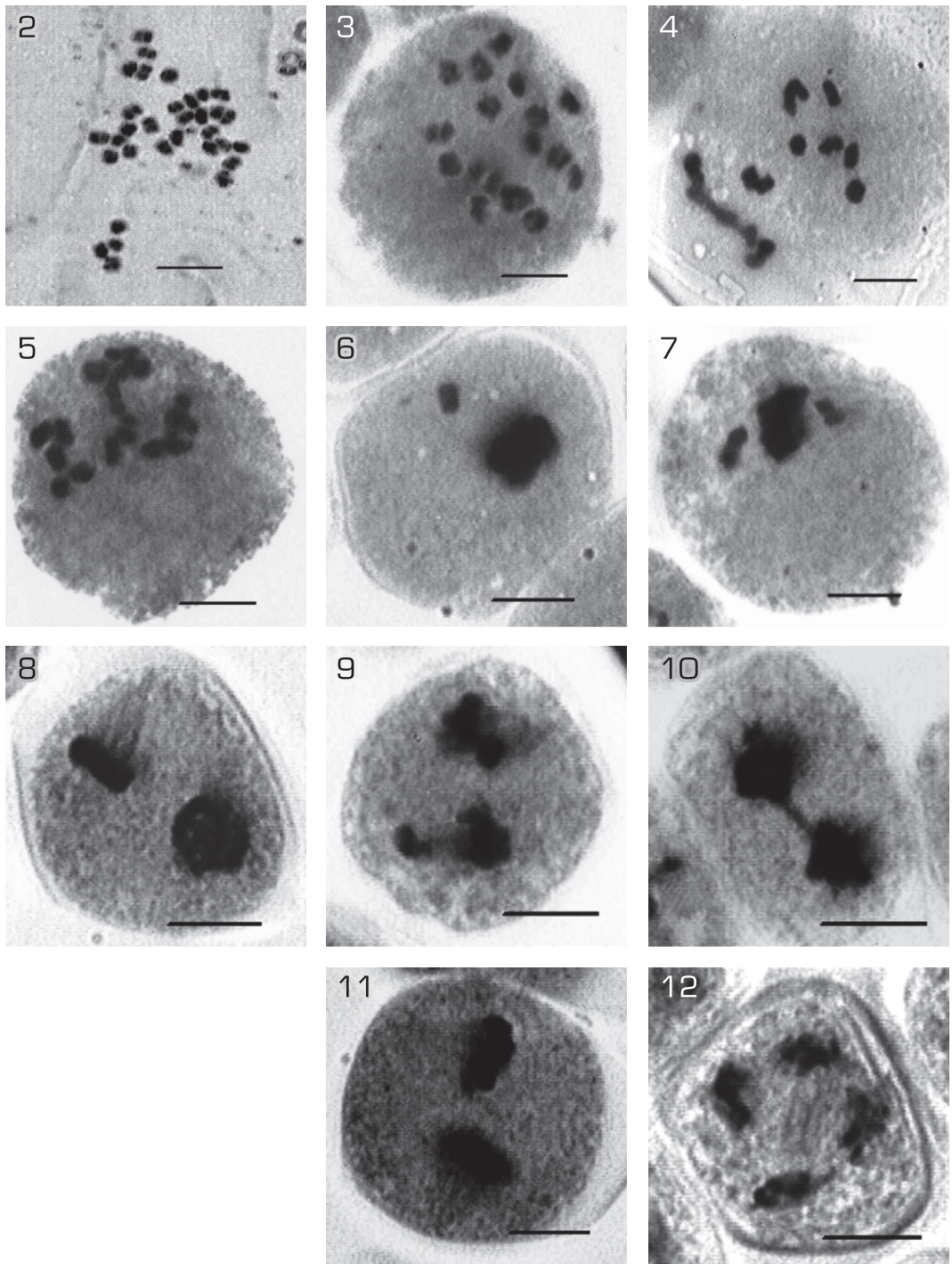
El número gamético es $n = 16$ (Fig. 3); microsporogénesis generalmente normal y la meiosis con irregularidades como formación de multivalentes en cadena (Fig. 4); agrupaciones de cromosomas (Fig. 5); MI con 1 a 2 cromosomas fuera de placa (Figs. 6 y 7); MII con asincronía (Fig. 8) y cromosomas fuera de placa en número de 1 a 2 (Fig. 9); puentes de cromatina que conectan ambas placas ecuatoriales (Fig. 10); placas en disposición perpendicular (Fig. 11). En AII se observaron puentes de cromatina y husos perpendiculares entre sí (Fig. 12).

MORFOLOGÍA FLORAL Y SEMINAL EN

C. LILLOI Y *C. CHELIDONIOIDES*

El análisis comparativo de las características florales y seminales entre *C. lilloi* y *C. chelidonioides* (Figs. 13 y 14, Cuadro 1) permitió determinar que:

Calceolaria lilloi presenta las flores con corola de color blanca; estambres con ramas



Figuras 2-12. *Calceolaria lilloi*. 2. Mitosis, $2n = 32$. 3. Diacinesis con $n = 16$ bivalentes. 4. Prometafase con cromosomas en cadena. 5. Prometafase con asociaciones de cromosomas. 6-7. MI con cromosomas adelantados. 8. MII con asincronía. 9. MII con cromosoma adelantado. 10. MII con puente entre ambas placas. 11. MII con placas perpendiculares entre sí. 12. All con husos en disposición perpendicular. Escala = 6 μ m.

Tabla 1. Cuadro comparativo entre *Calceolaria lilloi* y *C. chelidonioides* respecto a los caracteres florales, seminales (según Molau, 1988) y citológicos.

	Caracteres florales			Caracteres seminales			Caracteres citológicos	
	Color de la corola	Anteras		Ornamentación				
		Conectivo	Teca anterior	1er orden	2do orden	3er orden	2n =	Nivel de ploidía
<i>Calceolaria lilloi</i>	Blanca	Con ramas subiguales	Plana de base escotada	Con crestas longitudinales	Con crestas transversales	Células de la testa de contornos sinuosos	32	Tetraploide
<i>Calceolaria chelidonioides</i>	Amarilla	Desplazado hacia teca estéril	Oblonga con surco central	Con crestas longitudinales	Sin crestas transversales	Células de la testa de contorno angulosos	64	Octoploide

de conectivos de tamaño similar, con la teca anterior estéril, aplanada y escotada en la base (Fig. 13- C). Las semillas ornamentadas con crestas longitudinales y crestas transversales (Figs. 13- D y 14- A y B); al MO la epidermis seminal está compuesta por células sinuosas que forman un retículo de aspecto regular (Figs. 14- C).

Calceolaria chelidonioides tiene las flores con corola de color amarillo; estambres con conectivos que poseen ramas desiguales desplazados hacia la teca anterior estéril, teca anterior oblonga con una surco central (Fig. 13- E). Semillas con crestas longitudinales y sin crestas transversales (Figs. 13- F y 14- D y E); al MO la epidermis seminal está compuesta por un reticulado regular de células de bordes angulosos (Fig. 14- F).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Recientes investigaciones en secuenciación de genes de cloroplastos y transcripción de regiones espaciadoras nucleares (Stevens, 2001; Andersson, 2006) demostraron la monofilia de la tribu Calceolarieae, lo que permitió separarla de la familia Scrophulariaceae. Esta última fue determinada como polifilética por estudios moleculares (Oxelman

et al., 1999; Olmstead *et al.* 2001).

Las características vegetativas y florales observadas en *C. lilloi* y en *C. chelidonioides* coinciden totalmente con las descritas por Descole y Borsini (1953) y Botta y Cabrera (1993) respectivamente. Sin embargo son numerosas las sinonimias que han sobrellevado los representantes del género *Calceolaria* por la similitud morfológica entre sus especies. Molau (1988) menciona 10 sinónimos para *C. chelidonioides* y entre ellos incluye a *C. lilloi*; sin establecer los fundamentos para tal aseveración, sinónimo que también emplea Xifreda (1999).

El color de la corola permite distinguir las taxas a simple vista y hay diferencias en otros rasgos reproductivos como son los estambres y las semillas. Los estambres de *C. lilloi* poseen conectivos con ambas ramas de tamaño similar y la teca anterior es aplanada con una escotadura en la base, mientras que las anteras de *C. chelidonioides* poseen el conectivo desplazado casi totalmente a la rama de la teca anterior, esta última es oblonga y con un surco central.

Molau (1988) considera que las ornamentaciones de la testa son un elemento importante para la delimitación de las secciones en la tribu Calceolarieae. Al microscopio óptico

pueden observarse las diferencias en las ornamentaciones de las semillas. *C. lilloi* presenta crestas longitudinales (ornamentaciones de primer orden), alrededor de 15 a 20 crestas transversales (ornamentaciones de segundo orden) y células epidérmicas de contorno sinuoso que forman un entramado ordenado. Esta configuración es similar al tipo “ruminate-scalariform” de Molau (1988), con un patrón de reticulado terciario semejante al de *C. rhacodes* Kränzlin. *C. chelidonioides* tiene una cubierta seminal con un patrón diferente al anterior, presenta las crestas longitudinales, no tiene las transversales y la testa posee células de contornos angulosos, con un entrama-

do del tipo denominado “angulate-escalariforme” (Molau, 1988).

Los estudios citológicos realizados en este trabajo permitieron establecer que *C. lilloi* es tetraploide con $2n = 4x = 32$ y *C. chelidonioides* octoploide con $2n = 64$ (Molau, 1988), este número es poco frecuente dentro de la sección *Calceolaria*, la mayoría de las especies son tetraploides. Esta sección fue considerada por Molau (1988) como un grupo de plantas con rasgos más avanzados por los hábitos de crecimiento, adaptaciones al medio acuático, el número cromosómico aneuploide y variaciones intraespecíficas por la extrema plasticidad fenotípica.

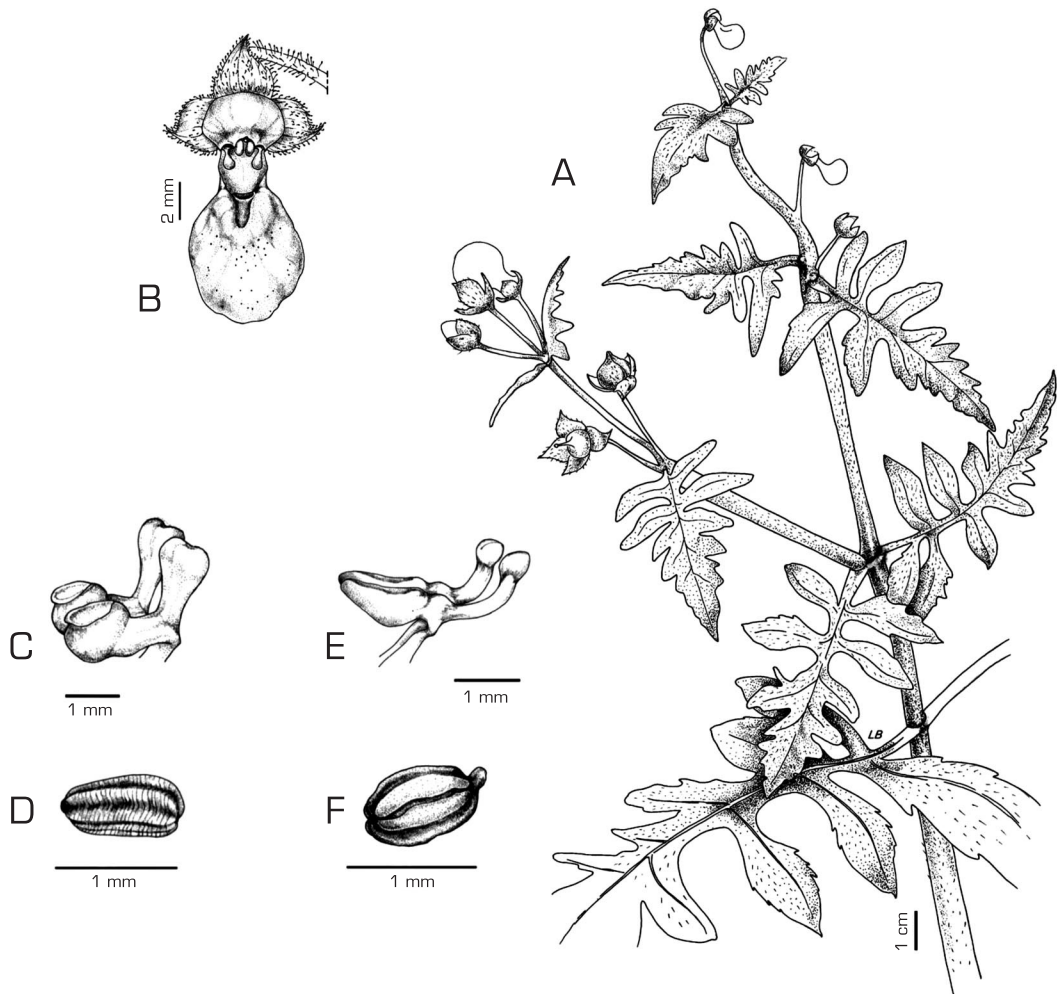


Figura 13. Caracteres florales y seminales en *Calceolaria*: **A-B)** *C. lilloi*: Aspecto general de planta y de la flor. **C-F)** Anteras y semillas: **C-D)** *C. lilloi*, **E-F)** *C. chelidonioides*.

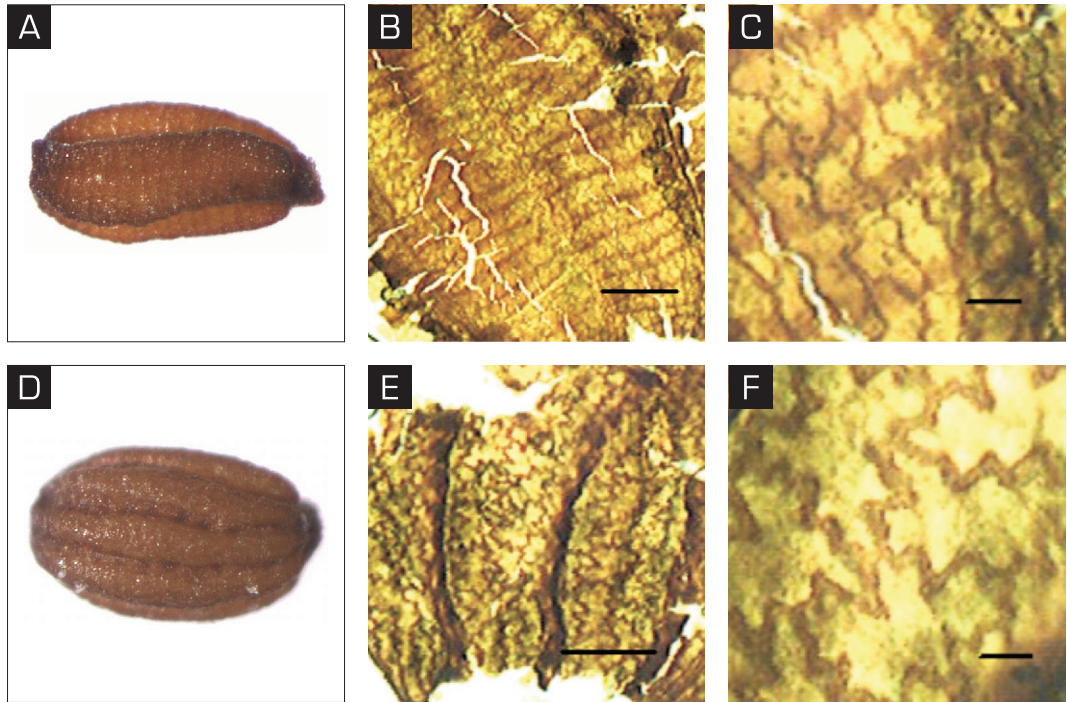


Figura 14. Patrones de ornamentación al MO de semillas de *Calceolaria* de acuerdo a Molau (1988). **A-C)** *C. lilloi*: **A)** Ornamentación de primer orden con crestas longitudinales, **B)** Ornamentación de segundo orden con crestas transversales y **C)** Ornamentación de tercer orden con células de contornos sinuosos y un reticulado regular. **D-F)** *C. chelidonioides*: **D)** Ornamentación de primer orden con crestas longitudinales, **E)** Ornamentación de segundo orden sin crestas transversales **F)** Ornamentación de tercer orden con células de contornos angulosos y un reticulado regular. B y E) escala = 0,15 mm; C y F) escala = 25 μ m.

La poliploidía como proceso fundamental en la evolución de las plantas principalmente, habría jugado su rol en la diversificación de estas especies, ambas tienen el mismo número básico y presentan características fenotípicas que permiten diferenciarlas.

Las características florales, seminales y números cromosómicos permitirían rehabilitar a *C. lilloi* como una especie válida, tal como fue originalmente descrita por Descole y Borsini (1953) y posteriormente por Botta y Cabrera (1993). El tipo de habitat, la pubescencia de tallos y hojas, la forma del cáliz y corola; anteras con una teca estéril y las ornamentaciones de primer orden de las semillas, son rasgos compartidos con *C. chelidonioides*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Lic. Alberto Slanis por la lectura crítica del manuscrito, por sus aportes a la taxonomía, sugerencias y observaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, S. 2006. On the phylogeny of the genus *Calceolaria* (Calceolariaceae) as inferred from ITS and plastid mat K sequences. *Taxon* 55 (1): 125-137.
- Botta & Cabrera 1993. Scrophulariaceae. En A. L. Cabrera (ed.), *Fl. Prov. Jujuy*, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 13 (9): 155-226.
- Descole & Borsini 1953. *Calceolaria lilloi* Descl. et Bors. nov sp. *Lilloa* 27: 75-79
- Molau, U. 1988. Scrophulariaceae. Part I. Calceolariaceae. *Fl. Neotrop. Monogr.* 47: 1-326.

- Olmstead R.G., de Pamphilis, C.W., Wolfe, A. D., Young, N.D., Elisens, W. J. & Reeves, P.A. 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. *Amer. J. Bot.* 88: 348-361.
- Oxelman, B., Backlund, M., Bremer, B. 1999. Relationships of the Buddlejaceae s. l. Investigated using Parsimony Jackknife and Branch support Analysis of Chloroplast *ndhF* and *rbcL* Sequence Data. *Systematic Botany* 24 (2): 164-182.
- Oxelman, B., P. Kornhall, R. G. Olmstead & Birgitta Bremer. 2005. Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54 (2): 411-425.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>
- Xifreda C. C. 1999. Scrophulariaceae en F. Zuloaga & O. Morrone (eds.). *Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina .II. Dicotyledoneae*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*