

Estudios meióticos en *Agalinis fiebrigii* y *Agalinis genistifolia* (Orobanchaceae)

Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada; Graciela E. Ruiz de Bigliardo

Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

Autor corresponsal: paezvaleria@hotmail.com

► **Resumen** — Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada; Graciela E. Ruiz de Bigliardo. 2015. "Estudios meióticos en *Agalinis fiebrigii* y *Agalinis genistifolia* (Orobanchaceae)". *Lilloa* 52 (2). *Agalinis* es un género americano y sus escasos antecedentes citogenéticos coinciden en que las especies de Norteamérica presentan números básicos $x = 13, 14$ mientras que las especies sudamericanas $x = 16$. En este trabajo se analiza la meiosis y se estima la viabilidad del polen de *A. fiebrigii* y *A. genistifolia*, las únicas dos especies que se distribuyen en el Noroeste Argentino. El número gametofítico observado en ambas especies de $n = 16$ es consistente con el número básico $x = 16$ presente en los taxones de Sudamérica. Durante la meiosis se observaron irregularidades y cuerpos extranucleares, que son reportados por primera vez en *Agalinis*.

Palabras clave: *Agalinis*, cuerpos extranucleares, meiosis, viabilidad del polen.

► **Abstract** — Páez, Valeria de los A.; Aldo R. Andrada; Graciela E. Ruiz de Bigliardo. 2015. "Meiotic studies in *Agalinis fiebrigii* and *Agalinis genistifolia* (Orobanchaceae)". *Lilloa* 52 (2). *Agalinis* is an American genus and their few cytogenetic backgrounds agree that North American species exhibit basic chromosome numbers $x = 13, 14$ and the species of South America $x = 16$. In this work, meiosis and the pollen viability are analyzed in *A. fiebrigii* and *A. genistifolia* are estimated, the two unique taxa who grow in the Northwest of Argentina. The gametophytic number $n = 16$ present in both species is consistent with the previous report and agreed with the basic number proposed for South American taxa. During meiosis numerous irregularities are observed in one species and extra-nuclear bodies are reported for the first time in *Agalinis*.

Keywords: *Agalinis*, extra-nuclear bodies, meiosis, pollen viability.

INTRODUCCIÓN

En la familia Orobanchaceae, el género *Agalinis* Raf. es americano, compuesto por plantas herbáceas, sufruticosas propias de ambientes húmedos como secos y en un amplio rango altitudinal (Canne-Hilliker, 1988). El género ha sido sometido a una extensa revisión taxonómica avalada por estudios moleculares que reubicaron al género *Agalinis* en la familia Orobanchaceae, de su ubicación anterior en Scrophulariaceae (dePamphilis *et al.*, 1997; Wolfe y dePamphilis, 1998; Yoder, 1999 y Stevens, 2001). Incluye aproximadamente 70 especies y habita desde el este de Estados Unidos, México, América Central hasta Sudamérica (Neel y Cummings, 2004). En América del Sur aunque se

encuentra en Brasil, Uruguay y Paraguay, la mayoría de las especies ocupan la región andina de Perú y Bolivia, mientras que en Argentina y Chile, están muy poco representadas (Canne-Hilliker, 1988). En Argentina, Castro Souza (2008) cita tres especies *Agalinis fiebrigii* (Diels) D'Arcy y *A. genistifolia* (Cham. & Schltdl.) D'Arcy en el Noroeste argentino (NOA), mientras que *Agalinis communis* (Cham. & Schltdl.) D'Arcy se distribuye más extensamente alcanzando el noreste, centro, parte de Cuyo hasta el norte de la Patagonia. Las especies del NOA son nativas, así *A. fiebrigii* es un subarbusto que habita desde los 2000 a 4500 msnm y *A. genistifolia* también es un subarbusto pero hemiparásito, que se ubica entre 0 y 3000 msnm (Castro Souza, 2008).

Las especies sudamericanas de *Agalinis*, han sido muy poco estudiadas, son escasos

los antecedentes de la variabilidad morfológica, el comportamiento reproductivo, o los estudios citológicos, puesto que la mayor parte de la información proviene de las especies norteamericanas. Así, para las especies norteamericanas de *Agalinis* y algunos géneros afines, Canne (1981, 1984) estableció dos números básicos $x = 13$ y $x = 14$. Sin embargo, Canne-Hilliker (1988) sugirió en las especies Sudamericanas uniformidad en el número cromosómico gametofítico de $n = 16$ de modo que disiente con los antecedentes de las especies de Norteamérica que morfológicamente son menos diversas. Los antecedentes de las especies sudamericanas las señalan diploides con $n = 16$ y $2n = 32$ cromosomas.

El objetivo del presente estudio es dar a conocer los números cromosómicos, gametofíticos, analizar el comportamiento del complemento cromosómico durante la meiosis y estimar por último, la viabilidad de los granos de polen de *Agalinis fiebrigii* y *A. genistifolia* en poblaciones naturales de la provincia de Tucumán (Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se recolectaron en regiones montañosas de la provincia de Tucumán, depositando el material de referencia en el herbario de la Fundación Miguel Lillo (LIL).

Agalinis fiebrigii. ARGENTINA. Prov. Tucumán, Dpto. Tafí, El Rincón, 1850 m, 27/XII/2007, *Andrada-Páez* (610750 A-B LIL) (Fig. 1A).

Agalinis genistifolia. ARGENTINA. Prov. Tucumán, Dpto. Burruyacú, Sierra de Medina, 04/III/2009. *Andrada-Páez* (610032 LIL) (Fig. 1B).

Los botones florales jóvenes se fijaron en una solución de alcohol etílico – ácido acético en proporción 3:1 (Farmer); luego de 24 horas se transfirieron a alcohol 70° y se conservaron a -4°C .

Se tomó como criterio para el análisis, la observación de un mínimo de 50 células por cada estadio meiótico y se emplearon tres técnicas de coloración que se detallan a continuación:

Tinción con orceína acética: el material se sometió a hidrólisis ácida con HCl 1N a



Fig. 1 A) *Agalinis fiebrigii*. B) *Agalinis genistifolia*.

60°C durante 15 minutos, luego los restos ácidos fueron eliminados con agua destilada. La coloración y montaje de las preparaciones microscópicas se realizaron con solución de orceína acética al 45%.

Tinción con AgNO_3 : Las anteras fueron tratadas durante 1 hora con una solución enzimática combinada (celulasa-pectinasa al 2%), cumplido el tiempo se lavaron en agua destilada. La preparación microscópica se obtuvo por aplastamiento con una gota de ácido acético al 45%. Luego de 3 (tres) días se procedió a la coloración con una mezcla de AgNO_3 50% en solución acuosa combinada con dos gotas de solución reveladora coloidal (2g gelatina + 100 ml agua destilada + 1 ml ácido fórmico) durante 20 minutos (Howell y Black, 1980). Los restos de la tinción argéntica se eliminaron por un lavado en agua corriente durante 15 minutos. El montaje de la preparación microscópica para la observación se realizó con una gota de agua glicerizada 10%.

Tinción con DAPI: el tratamiento previo del material destinado a esta tinción fue idéntico al de la tinción precedente. Después de 3 (tres) días se procedió a la coloración con DAPI propuesta por Schweizer (1976).

En la estimación de la viabilidad de los granos de polen se empleó la solución de Müntzig de glicerina-carmin acético al 1% en la relación 1:1 (Sharma y Sharma, 1965). Se consideraron viables aquellos granos de polen que adquirieron coloración intensa. Para esta estimación se contaron 1500 granos de polen por especie.

Las microfotografías se tomaron con una cámara Moticam 1000 adosada a un microscopio óptico Nikon Eclipse E200. Las microfotografías con fluorescencia se obtuvieron con una cámara Olympus Qcolor5 de un microscopio Olympus BX43.

RESULTADOS

Los resultados de las observaciones se presentan según las técnicas de coloración empleadas en cada una de las especies estudiadas.

Agalinis fiebrigii

En las células madres de polen (CMP) analizadas con la tinción convencional, se identificó el número gametofítico $n=16$ (Fig. 2A). En profase y prometafase I se observa un único nucléolo. La diacinesis regular con 16 bivalentes (16 II) es la más frecuente (89%), mientras que el porcentaje restante se distribuye entre las células con cromosomas homólogos sin aparear o apareados formando trivalentes en diferentes configuraciones (Fig. 2B-C). Aunque se observaron cadenas de cromosomas homólogos en prometafase, su frecuencia fue despreciable. La metafase I (MI) fue regular, sólo en el 7% de ellas, un cromosoma se muestra fuera de la placa medial (Fig. 2D). El comportamiento de los cromosomas fue normal en anafase I (AI) al igual que en la telofase I (TI). La metafase II (MII), no mostró diferencias con la MI (Fig. 2E), pero en anafase II (AII) se registró sólo un 3% de cromosomas rezagados. La telofase II (TII) fue regular (Fig. 2F).

En el 45% de las células analizadas con igual técnica de coloración, se ha observado desde MI hasta TII uno o más cuerpos extranucleares de aspecto redondeado, similares al nucléolo. Este tratamiento ha puesto en evidencia una tinción diferencial de los mismos. La débil tinción de los cuerpos se diferencia claramente de los cromosomas homólogos con fuerte heteropicnosis positiva en estas etapas (Figs. 2F). Asimismo como resultado de la meiosis se evidenció la formación de tétradas, como así también mónadas y héxadas (Fig. 2G).

En las células meióticas de *Agalinis fiebrigii* cuando fueron sometidas a las técnicas de impregnación argéntica, los cuerpos extranucleares adquirieron una coloración intensa, positiva mientras que los cromosomas mostraron un color claro, ligeramente amarillo (Fig. 2H-I). La utilización del marcador fluorescente DAPI no arrojó resultados positivos. Los cromosomas presentaron un aspecto homogéneo ante la excitación con la luz ultravioleta, mientras que los cuerpos extranucleares se observaron de color gris, opaco, claramente diferente al que presentaron los cromosomas (Fig. 2J).

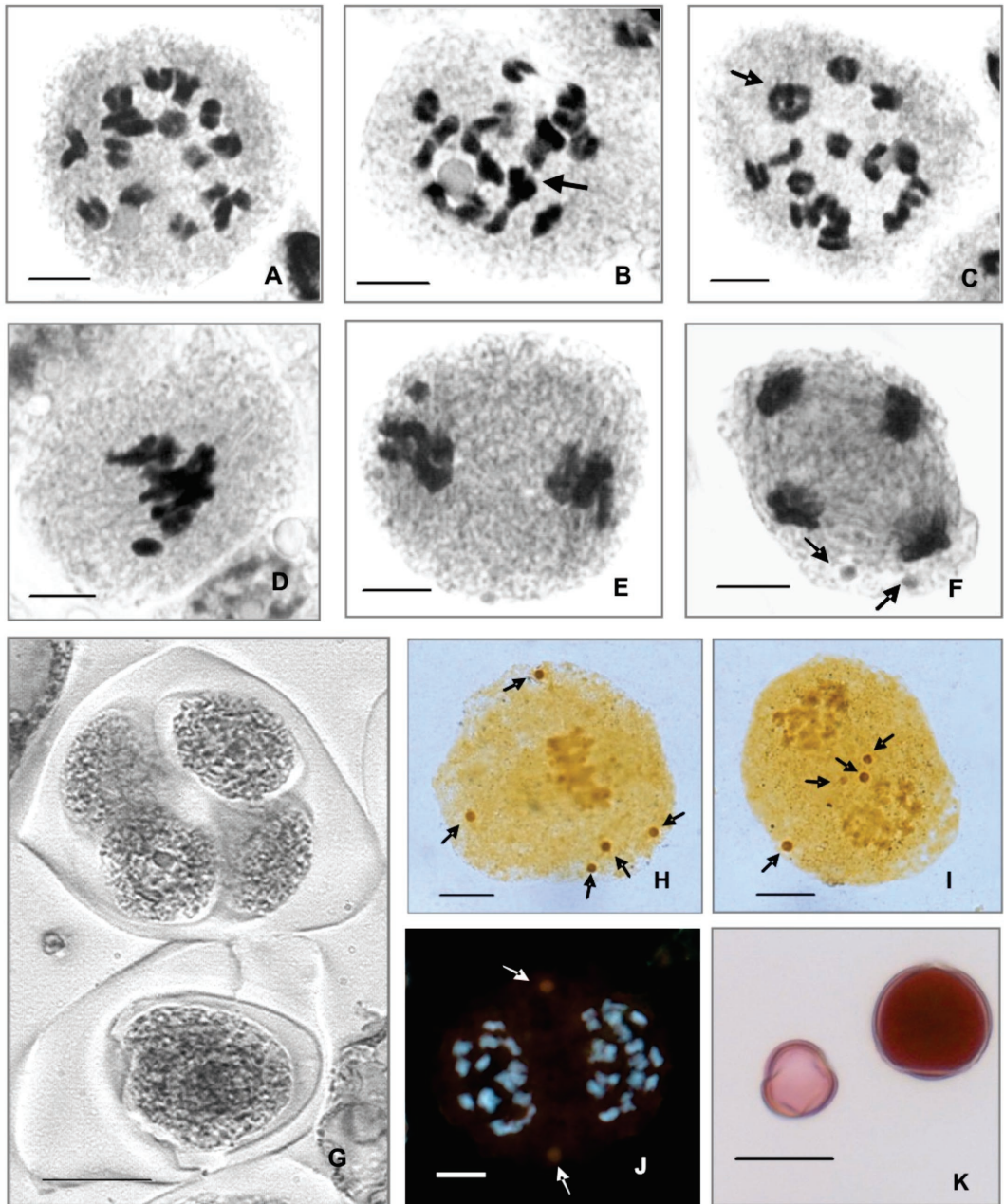


Fig. 2. A-J) *Agalinis fiebrigii*: A) Diacinesis $n = 16II$. B-C) trivalente en diferentes configuraciones. D) MI con cromosoma fuera de placa. E) MII con cromosoma fuera de placa. F) TII regular con cuerpos extranucleares (flechas). G) Tétrada y mónada. H-I) MI y TI respectivamente con cuerpos extranucleares teñidos con $AgNO_3$ (flechas). J) TI con cuerpos extranucleares con tinción DAPI (-) (flechas). K) Granos de polen viables con coloración intensa y grano estéril no coloreado. 2A-J Escala = 6 μm , 2K Escala = 15 μm .

La viabilidad de los granos de polen en *Agalinis fiebrigii* alcanzó el 97%, los viables se mostraron intensamente coloreados, mientras que los inviables fueron de menor tamaño y coloración tenue (Fig. 2K).

Agalinis genistifolia

El número gametofítico observado en esta especie fue $n = 16$ (Fig. 3A). Un único nucleolo se presenta en profase I y prometafase I. La diacinesis mostró los 16 II. Asimismo el 37.5% de las células en MI mostraron segregación temprana de un par de cromosomas (Fig. 3B) y en AI se detectó la formación de puentes de cromatina y cromosomas rezagados (Fig. 3C). Fue algo mayor el porcentaje (40%) de células en MII que exhibieron cromosomas fuera de la placa ecuatorial (Fig. 3D). El 37.5 % de las células en TII mostraron cromosomas rezagados. No se observaron cuerpos extranucleares y la formación de tétradas fue regular.

En esta especie al igual que en *Agalinis fiebrigii* en las células tratadas con DAPI los

cromosomas se presentaron con tinción uniforme sin identificación de bandas.

En *A. genistifolia* la viabilidad de los granos de polen estimada llegó al 98%, los inviables, estériles, se tiñen débilmente y se reconocen también por su menor tamaño (Fig. 3E).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La familia Orobanchaceae contiene aproximadamente 2000 especies distribuidas en 89 géneros donde la mayor parte de ellos lo componen plantas heterótrofas. *Agalinis* es un género americano con especies hemiparásitas que habitan principalmente en América del Norte y por ello son las más estudiadas. Las características morfológicas, anatómicas y formas de vida entre otras, pone en evidencia menor variabilidad en las especies norteamericanas, que las poco investigadas de América del Sur. *Agalinis* representa a un grupo taxonómicamente difícil, sujeto a diversas revisiones por las que se sitúa al gé-

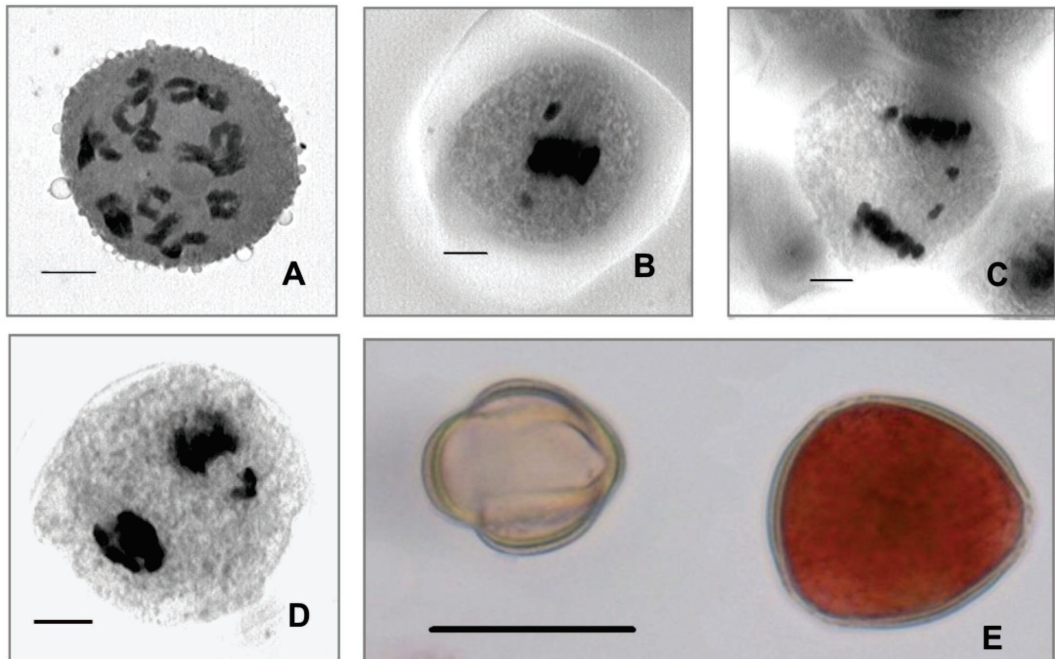


Fig. 3. A-E) *Agalinis genistifolia*: A) Diacinesis $n = 16$ II. B) MI con cromosomas adelantados. C) AI con cromosomas rezagados. D) MII con cromosomas fuera de placa. E) Grano de polen coloreado viable y estéril sin tinción. 3A-D Escala = 6 μ m. 3E Escala = 15 μ m.

nero en la familia que actualmente lo incluye y que asimismo brinda las evidencias de la monofilia de la misma (Pamphilis *et al.*, 1997; Wolfe y dePamphilis, 1998; Yoder, 1999; Stevens, 2001). Los análisis de ADN cloroplastídico establecieron claramente las relaciones filogenéticas en el género y entre géneros estrechamente relacionados (Bennett y Mathews, 2006).

Aunque no se pone en duda la monofilia de *Agalinis* como género, existe una clara dicotomía de las características citológicas de estas plantas. Los recuentos cromosómicos efectuados para las especies de Norteamérica revelan dos números básicos $x = 13$ y 14 (Canne, 1981, 1984; Canne-Hilliker, 1988). Los análisis de secuencias de ADN de genes cloroplastídicos determinaron que un único evento evolutivo ocasionó la reducción del número cromosómico $n=14$ a $n=13$ (Neel y Cummings, 2004). Los pocos estudios que generan los antecedentes de especies sudamericanas indican un número básico diferente $x = 16$ para *Agalinis* de Argentina (citada para Buenos Aires), Uruguay, Perú y Bolivia (Hunziker *et al.*, 1985; Canne-Hilliker, 1988).

Nuestros resultados de los recuentos obtenidos de *Agalinis fiebrigii* y *A. genistifolia* coinciden con los antecedentes bibliográficos del género en Sudamérica. Asimismo indican la naturaleza diploide de estas especies y la marcada estabilidad de los números cromosómicos $x = n = 16$ en contraste con las especies del hemisferio norte donde habrían ocurrido procesos que condujeron a la poliploidía y aneuploidía inter o intraespecífica. La poliploidía se puso en evidencia en los números cromosómicos gametofíticos de *Agalinis linifolia* (Nutt.) Britton de $n = 28$ (Canne, 1984) y los recuentos $2n = 28$ realizados por Kondo *et al.* (1981). Asimismo, la aneuploidía intraespecífica se pone de manifiesto con los recuentos esporofíticos de *A. obtusifolia* Raf. de $2n = 26$ y $2n = 28$, así como los de *A. purpurea* (L.) Pennell de $2n = 28$ y $2n = 30$ (Kondo *et al.*, 1981).

La estabilidad en el número cromosómico en el género $n = 16$ demostrado por los pocos antecedentes que se dispone de las es-

pecies de *Agalinis*, impide afirmar que este sea el único número cromosómico haploide ya que aun falta conocer los complementos cromosómicos de otras especies de América del Sur.

La interpretación de los cuerpos redondeados extranucleares con tinción diferencial respecto al resto de cromosomas, que se presentan en el citoplasma cuando el núcleo y la membrana nuclear pierden identidad durante la división es poco clara. Folgerberg (1938) los ha observado en especies del género *Cuscuta* y Ross (1981) en Cactaceae, quien intentó por intermedio del reactivo de Schiff conocer químicamente su naturaleza. Los resultados de esta reacción y la tinción con DAPI en nuestras investigaciones dieron negativa, indicando ausencia de ADN. Sin embargo demuestra presencia de proteínas posiblemente similares a las que se encuentran asociadas al ADN ribosómico al ser positivo el tratamiento con impregnación argéntica de Howell y Black (1980).

La falta de señales con DAPI indica ausencia de heterocromatina rica AT (adenina-timina). Los números cromosómicos encontrados en *Agalinis fiebrigii* y *A. genistifolia* estudiadas en la región montañosa de Tucumán y el análisis del comportamiento meiótico representan las primeras investigaciones del género en la región. La observación de cromosomas rezagados o fuera de la placa medial indica que podrían ser los responsables de la formación de mónadas y héxadas al final de la división con posible desarrollo de gametas genéticamente desbalanceadas. Sin embargo la baja frecuencia de las anomalías consignadas en los resultados no afectaría significativamente la viabilidad de los granos de polen; viabilidad que alcanza en *A. fiebrigii* y *A. genistifolia* el 97% y 98% respectivamente.

Las dos especies estudiada *Agalinis fiebrigii* y *A. genistifolia* tienen el complemento haploide $n = 16$ e irregularidades meióticas en muy baja frecuencia que no afectan significativamente la viabilidad del polen, lo cual asegura en parte el éxito reproductivo de estos taxones.

BIBLIOGRAFÍA

- Canne J. M. 1981. Chromosome counts in *Agalinis* and related taxa (Scrophulariaceae). Canadian Journal of Botany 59 (6-7): 1111-1116.
- Canne J. M. 1984. Chromosome numbers and the taxonomy of North American *Agalinis* (Scrophulariaceae). Canadian Journal of Botany 62 (3-4): 454-456.
- Canne-Hilliker J. M. 1988. *Agalinis* (Scrophulariaceae) in Perú and Bolivia. Brittonia 40 (4): 433-440.
- Castro Souza V. 2008. Orobanchaceae. En: Zuloaga F. O., Morrone O., Belgrano M. J., (eds.) Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Missouri Botanical Garden Press. 107 (3): 2663-2669.
- Bennett J. R., Mathews S. 2006. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. American Journal of Botany 93 (7): 1039-1051.
- dePamphilis C. W., Young N. D., Wolfe A. D. 1997. Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. Proceedings of National Academy of Sciences USA 94: 7367-7372.
- Folgerbert S. O. 1938. The cytology of *Cuscuta*. Bulletin of the Torrey Club. 65: 631-645.
- Howell W. H., Black D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experimentia 36: 1014-1015.
- Hunziker J. H., Xifreda C. C., Wulff A. F. 1985. Estudios cromosómicos en angiospermas de Sudamérica. Darwiniana 26: 7-14.
- Kondo K., Segawa M., Musselman L. J., Mann W. F. 1981. Comparative ecological study of the chromosome races in certain root parasitic plants of the southeastern U.S.A. Boletim da Sociedade Broteriana, sér. 2. 53: 793-807.
- Neel M. C., Cummings M. P. 2004. Section-level relationships of North American *Agalinis* (Orobanchaceae) based on DNA sequence analysis of three chloroplast gene regions. BioMed Central Evolutionary Biology 4: 15.
- Ross R. 1981. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. American Journal of Botany. 68: 463-470.
- Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-324.
- Sharma A. K., Sharma A. 1965. Chromosome Techniques, Theory and Practice. Butterworth & Co. (Publishers), London. 474 pp.
- Stevens P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.
- Wolfe A. D., dePamphilis C. W. 1998. The Effect of Relaxed Functional Constraints on the Photosynthetic Gene *rbcL* in Photosynthetic and Nonphotosynthetic Parasitic Plants. Molecular Biology and Evolution 15 (10): 1243-1258.
- Yoder I. J. 1999. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. Current Opinion in Plant Biology 2: 65-70.