

**ESTUDIO CROMOSÓMICO DE CUATRO ESPECIES DE ÑAME
(*Dioscorea Spp*)**

**VIVIAN LORENA ESPINOSA VOZA
HERNANDO RUBÉN FRANCO HERNANDEZ
NEVER SEGUNDO TRONCOSO CARRASCAL**

JAVIER DARIO BELTRAN HERRERA Ph.D.

Director

**EDUARDO JOSE HERNANDEZ GUEVARA B.Sc.
Codirector**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2008**

**ESTUDIO CROMOSÓMICO DE CUATRO ESPECIES DE ÑAME
(*Dioscorea Spp*)**

**VIVIAN LORENA ESPINOSA VOZA
HERNANDO RUBÉN FRANCO HERNANDEZ
NEVER SEGUNDO TRONCOSO CARRASCAL**

Trabajo de grado presentado como prerrequisito para optar al título de
Biólogo con énfasis en Biotecnología

**JAVIER DARIO BELTRAN HERRERA Ph.D.
Director**

**EDUARDO JOSÉ HERNÁNDEZ GUEVARA B.Sc.
Codirector**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2008**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Sincelejo, Enero del 2008

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a:

Dios, por iluminar el camino de nuestras vidas y darnos sabiduría para alcanzar nuestras metas.

La Universidad de Sucre, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales en esta importante área.

A Eduardo Hernández, por ser además de nuestro docente un amigo, gracias por confiar en nosotros, por su esfuerzo, apoyo incondicional y su disposición para orientarnos.

A los auxiliares de laboratorio: Fredi, Rosa, José, Arturo, Rocío por su gran contribución

A los docentes: Eidyeliana, Juan Manuel, Rafael, Giovanni por sus aportes para el desarrollo de esta investigación.

Al Doctor Carlos Baeza por sus valiosas asesorías durante el transcurso de la investigación.

A nuestros compañeros de laboratorio: Jorge, Elvis, Mayerlys, Yair, Álvaro, David, por su colaboración y apoyo durante todo el trabajo.

Al Doctor Javier Beltrán por su colaboración.

A nuestros amigos y compañeros de la cohorte 2001-2002 que de una u otra forma estuvieron siempre apoyándonos y brindándonos su sincera y desinteresada amistad.

DEDICATORIA

A Dios por haberme guiado durante mi vida.

A mis padres Esther y Luis, quienes han estado conmigo en todos los momentos, a mis hermanos Luis, Olga, Margarita por apoyarme, y al resto de mi familia quienes han sido un aliciente para conseguir mis metas.

A todos mis amigos gracias por brindarme su amistad y por estar ahí cuando mas los necesito.

Vivian

A Dios por permitirme alcanzar esta gran meta.

***A mi familia por ese gran esfuerzo que realizaron para que
fuese alguien en la vida.***

***A todos mis amigos por creer en mi y por estar presentes en lo
buenos y malos momentos.***

Hernando Rubén

A Dios por ser el artífice de todos mis logros.

A mis padres orlando Troncoso y Adairis Carrascal, por sus consejos y el gran esfuerzo que hacían para brindarme lo mejor.

A mis hermanos Luis, Orlando y Serlis por su comprensión y respaldo en todo momento.

A todas aquellas personas que siempre estuvieron presentes para que este sueño se hiciera realidad

Never

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo

(Artículo 12, resolución 02 del 2003)

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. ESTADO DEL ARTE	20
3.1 Generalidades del ñame	20
3.2 Botánica y taxonomía	21
3.3 Ciclo celular y mitosis	22
3.4 Fases de la mitosis	23
3.5 Poliploidias	24
3.5.1 Origen de los poliploides	25
3.6 Importancia de los estudios citogenéticos	27
3.7 Recuento de cromosomas mitóticos	29
3.7.1 Coloración	30
3.7.2 Técnicas de coloración para cromosomas	31
3.7.3 Técnicas de bandeado cromosómico	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1 Escenario de referencia	46
4.2 Población de estudio	46
4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	47
4.4 Obtención de meristemos radiculares	48
4.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS EN METAFASE	49
4.5.1 Pre tratamiento con inhibidor del huso mitótico	49
4.5.2 Fijación	49
4.5.3 Hidrólisis de la pared celular	50
4.5.4 Tinción	50
4.6 Squash	51
4.7 CONTEO DE CÉLULAS DETENIDAS EN METAFASE CON CROMOSOMAS DISPERSOS	51
4.8 CONTEO Y MEDICIÓN DE CROMOSOMAS	51
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	52
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1 Hidrólisis de la pared celular	53

5.2 Tinción de la cromatina	54
5.3 Pretratamiento con inhibidor del huso mitótico	55
5.4 Número, tamaño y morfología cromosómica	60
5.4.1 <i>Dioscorea alata</i>	60
5.4.2 <i>Dioscorea rotundata</i> y <i>Dioscorea cayennensis</i>	62
5.4.3 <i>Dioscorea trifida</i>	63
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	70
REFERENCIAS	71
ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunas especies vegetales de tamaño cromosómico pequeño	30
Tabla 2. Concentración de ácido clorhídrico y tiempo de exposición de cada uno de los tratamientos evaluados	50
Tabla 3. Resultados de la evaluación de los distintos tratamientos con 8-Hidroxiquinolina	60
Tabla 4. Número y tamaño cromosómico en las especies de <i>Dioscorea</i> analizadas	65

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la orceína	33
Figura 2. Vitroplantas en cuarto de crecimiento	46
Figura 3. Vitroplantas con raíces jóvenes	47
Figura 4. Obtención de meristemos radiculares	48
Figura 5. Hidrólisis	54
Figura 6. Tinciones	55
Figura 7. Células de <i>Dioscorea alata</i> en estado de telofase	56
Figura 8. Influencia de la concentración de 8-Hidroxiquinolina en el porcentaje de metafases	57
Figura 9. Influencia del tiempo de exposición a la 8-Hidroxiquinolina en el porcentaje de metafases	58
Figura 10. Células en metafase con cromosomas dispersos	66
Figura 11. Células detenidas en metafase con cromosomas dispersos mostrando varios números cromosómicos en <i>Dioscorea cayennensis</i>	67
Cuadro 1. Tipos de colorantes	31

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Medio de multiplicación para <i>Dioscorea alata</i>	87
Anexo 2. Medio de multiplicación para <i>Dioscorea rotundata</i>	87
Anexo 3. Medio de multiplicación para <i>Dioscorea trifida</i>	88
Anexo 4. Medio de multiplicación para <i>Dioscorea cayennensis</i>	88
Anexo 5. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en <i>Dioscorea alata</i>	89
Anexo 6. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo	89
Anexo 7. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor concentración	89
Anexo 8. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en <i>Dioscorea trifida</i>	90
Anexo 9. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor concentración	90
Anexo 10. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo	91
Anexo 11. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en <i>Dioscorea cayennensis</i>	91

	Pág.
Anexo 12. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases para el factor concentración	91
Anexo 13. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo	92
Anexo 14. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en <i>Dioscorea rotundata</i>	92
Anexo 15. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases para el factor concentración	93
Anexo 16. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo	93

RESUMEN

El género *Dioscorea* comprende alrededor de 650 especies distribuidas ampliamente en las regiones tropicales del mundo, en donde constituye la base fundamental de la alimentación y la economía; son plantas dioicas, con floración irregular y asincrónica y poco desarrollo de semilla sexual, por lo que son propagadas vegetativamente, este hecho ha generado poca variabilidad genética entre las especies de ñame, y consecuentemente muchos genotipos han sido reportados como susceptibles a plagas y enfermedades. Se hace necesario entonces la búsqueda de genotipos élitos con adaptación ecológica y resistentes a patógenos, para lo cual es importante investigar el rango de diversidad existente, desafortunadamente, en Colombia a diferencia de África, los cultivares tradicionales no han sido recolectados, caracterizados y analizados adecuadamente y se desconocen varios aspectos fundamentales como los niveles de ploidía de la mayoría de las especies, característica relacionada con procesos como la esterilidad, tolerancia a condiciones de estrés y resistencia al ataque de patógenos. A raíz de lo anterior se hizo necesaria la estandarización de un protocolo para el estudio de los niveles de ploidía de las especies de ñame presentes en el Banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, como un primer paso en la caracterización y el monitoreo de la variación somaclonal que pueda ocurrir en los sistemas de propagación *in Vitro* del género. Por lo cual se estandarizó un protocolo para la obtención de metafases y determinación del número cromosómico a partir de meristemas radicales, evaluando cuatro concentraciones (0, 1, 2, 4 mM) y tres tiempos de exposición (3, 6 y 12 horas) del antimitótico 8-Hidroxiquinolina; para la hidrólisis de la pared celular se probaron diferentes concentraciones y tiempos de acción del HCl; y se utilizaron tres tipos de coloración para la observación de los cromosomas (Schiff, Giemsa y aceto-orceína). El mejor tratamiento para la obtención de cromosomas metafásicos fue la utilización de 2 mM de 8-Hidroxiquinolina durante 6 horas para las especies *D. alata*, *D. rotundata* y *D. cayennensis*, mientras que en *D. trifida* estuvo constituido por 8-Hidroxiquinolina 4 mM durante 6 horas. La hidrólisis más efectiva se obtuvo con HCl 5 N por 90 minutos, y el mejor colorante fue la aceto-orceína. Los números cromosómicos fueron constantes en los individuos de *D. alata* y *D. trifida* con $2n = 20$ y $2n = 30$ respectivamente, a diferencia de *D. rotundata* y *D. cayennensis* donde se encontró inestabilidad en el número de cromosomas con $2n = 20$, 30 y $2n = 30$, 38 , 40 respectivamente.

ABSTRACT

The *Dioscorea* genus includes around 650 species distributed in the tropical regions of the world, where it constitutes the fundamental basis for food and the economy. They are dioecious plants, with irregular and asynchronous flowering and little development of sexual seed reason why they are propagated vegetatively, this fact has generated little genetic variability between the species of yam, and consequently many genotypes have been reported like susceptible to plagues and diseases. The search becomes necessary to identify genotypes elites with ecological adaptation and resistant to pathogens, for which it is important to investigate the rank of existing diversity, unfortunately, in Colombia unlike Africa, traditional cultivars have not been collected, characterized and analyzed in several fundamental aspects like those of ploidy levels of most of the species, characteristic related to processes like sterility, tolerance to conditions of stress are not known and resistance to the attack of pathogens. As a result of the previous observation the standardization of a protocol became necessary for the study of the of ploidy levels of the of yam species present in the Plant Biotechnology Laboratory's germoplasm bank of the University of Sucre, like a first passage in the characterization and the screening of the somaclonal variation that can happen in the *in Vitro* regeneration systems. Thus a protocol for the obtaining of metaphases and determination of the chromosomal number from radical meristems was standardized, evaluating four concentrations (0, 1, 2, 4 mM) and three times of exposition (3, 6 and 12 hours) of the 8-Hidroxiquinoline antimitotic; for hydrolysis of the cellular wall different concentrations and times from action of the HCl were proven; and three types of coloration for the observation of the chromosomes were used (Schiff, Giemsa and orcein-acetic). The best treatment for the obtaining of metaphasic chromosomes was 2 mM of 8-Hidroxiquinoline during 6 hours for species *D. alata*, *D. rotundata* and *D. cayennensis*, whereas in *D. trifida* 4 mM during 6 hours. Was the best. The effective hydrolysis was obtained with HCl 5 N in 90 minutes, and the best colorant was orcein-acetic. The chromosomal numbers were constant in the individuals of *D. alata* and *D. trifida* with $2n = 20$ and $2n = 30$, unlike respectively *D. rotundata* and *D. cayennensis* where was instability in the number of chromosomes with $2n = 20$, 30 and $2n = 30$, 38 , 40 respectively.

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Dioscorea* incluye plantas cuya característica sobresaliente es la presencia de tubérculos subterráneos, aéreos o de ambas formas, abarca alrededor de 650 especies que se encuentran distribuidas mundialmente en el oeste de África, Sur de Asia, islas del Pacífico y región Caribe de América Latina (Twyford y Mantell, 1996).

En Colombia el ñame es utilizado como fuente de alimentación en la costa Atlántica, principalmente en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar (Sánchez y Hernández, 2005), donde se ha cultivado asexualmente y de forma cíclica a través del tiempo utilizando una selección superficial por parte de los cultivadores. Este proceso de propagación vegetativa sin ningún programa de mejoramiento, ha desembocado en la degeneración genética de la planta con obvio deterioro en su sistema de adaptación y resistencia, esta situación se ve agravada por la falta de investigación en este aspecto (Perea y Buitrago, 2000)

Las dos especies más cultivadas en esta región corresponden a *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*, de las cuales existen una gran diversidad de morfotipos parecidos a nivel fenotípico, a pesar de ello se han realizado pocos estudios de caracterización que permita revelar diferencias marcadas entre ellas (Sánchez y Hernández, 2005). Una de las estrategias para el esclarecimiento de este problema lo constituyen las técnicas moleculares como análisis del ADN de cloroplasto, isoenzimas y AFLP, sin embargo otra alternativa para ello lo constituye el análisis citológico, donde el conteo cromosómico, representa un acercamiento al concepto de especie y un apoyo para la delimitación de las mismas (López, 1999)

Gran parte de los estudios citogenéticos realizados en África en el género *Dioscorea* muestran la presencia de altos niveles de ploidía (4n, 6n, 8n), los cuales han sido correlacionados con características fenotípicas importantes (Dansi *et al.*, 2000) sin embargo, en Colombia no existen estudios realizados a este nivel, en donde se relacionen características citológicas con la productividad, el nivel de resistencia a patógenos o para el esclarecimiento de afinidades específicas, patrones evolutivos o el monitoreo de la variabilidad genética en plantas regeneradas durante el proceso de cultivo *in vitro* (Blas y González, 2004; Naranjo y Poggio 2004). Por lo cual, se hace necesario estandarizar una metodología para obtener cromosomas metafásicos en este género, que permita conocer el nivel de ploidía de las especies cultivadas presentes en el Banco de Germoplasma de la Universidad de Sucre, lo cual servirá de apoyo para caracterizar el germoplasma presente, con la evaluación y comparación de rasgos morfológicos y fisiológicos con respecto a las características citológicas. De igual manera el conocimiento de las diferencias y afinidades cromosómicas entre las especies se emplearía más adelante como herramienta para generar híbridos con características deseadas.

En este trabajo se estandarizó el protocolo de obtención de células en metafase con cromosomas dispersos como una herramienta para determinar el número cromosómico y consecuentemente el nivel de ploidía y las características cromosómicas de cuatro especies del género *Dioscórrea*. A fin de aportar información citogenética para futuras investigaciones en el campo del mejoramiento genético.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Elaborar y estandarizar un protocolo para la obtención de cromosomas metafásicos en *Dioscorea alata*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea cayennensis* y *Dioscorea trifida*.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Evaluar los parámetros de concentración y tiempo de exposición del material vegetal al antimitótico 8-hidroxiquinolina.

2.2.2 Determinar la concentración y el tiempo de exposición de ácido clorhídrico para la degradación total de la pared celular.

2.2.3 Establecer el mejor colorante para la tinción de los cromosomas.

2.2.4 Identificar el número, tamaño y morfología cromosómica de *Dioscorea alata*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea cayennensis* y *Dioscorea trifida*.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES DEL ÑAME:

La familia *Dioscoreaceae* abarca 5 géneros y unas 750 especies. Los géneros pertenecientes a esta familia son: *Dioscorea* con más de 600 especies, *Tamus* con 5 especies, *Rajana* con 25 especies y *Stenomeris* con 2 especies (Perea y Buitrago, 2000). *Dioscorea* es el principal representante de la familia, comprende muchas especies con una distribución pantropical (McVaugh, 1989; Hann, 1995). Estas plantas fueron domesticadas simultáneamente en África, Asia y América, hace alrededor de 10,000 años, siendo después de la calabaza y la cebada, los cultivos que se domesticaron más antiguamente (Burkill, 1960; Evans, 1993).

De alrededor de 600 especies que componen el género, siete son las más importantes como cultivos básicos en los trópicos, entre ellos el ñame blanco (*D. rotundata*), el ñame amarillo (*D. cayenensis*), el trifoliado (*D. dumertorum*), que son originarios del oeste de África; el ñame de agua (*D. alata*) y el chino (*D. esculenta*), nativos de Asia; el ñame aéreo (*D. bulbifera*), que ocurre tanto en África como en Asia y el cush-cush ñame (*D. trifida*), que es originario de América (Hahn, 1995). Diferentes especies se han utilizado como fuentes de medicina en la industria farmacéutica, la producción de estos compuestos químicos y de sustancias venenosas, como los alcaloides y sapogeninas, es en algunos casos la causa de su explotación excesiva (McVaugh, 1989; Zamora, 1993).

3.2 BOTÁNICA Y TAXONOMÍA:

El ñame es una planta monocotiledónea, que presenta algunas características de las dicotiledóneas; su tallo es herbáceo y trepador pudiendo este alcanzar varios metros de longitud; sus hojas son de tamaño mediano, largamente pecioladas y de forma acorazonada; se disponen de manera opuesta y/o alterna en la misma planta; la parte aprovechable de la planta es un tubérculo de forma variable dependiendo del cultivar; este tiene la capacidad de formar su sistema caular a partir de una capa de células meristemáticas localizadas en la corteza (Álvarez, 2000). Las flores son imperfectas producidas en plantas diferentes (Ammirato, 1984); las flores masculinas se encuentran en gran número sobre panojas, constan de un cáliz con tres sépalos y una corola con tres pétalos; normalmente presentan verticilos cada uno con dos estambres (Perea y Buitrago, 2000). El fruto proviene de la flor en forma de cápsulas trinoculares, secas y transparentes, las semillas que contienen son pequeñas, de color claro y aplanadas (Montaldo, 1983).

Según USDA (2007) la ubicación taxonómica del ñame es la siguiente:

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Liliidae</i>
Orden:	<i>Liliales</i>
Familia:	<i>Dioscoreaceae</i>
Género:	<i>Dioscorea L</i>
Especies:	varias

3.3 CICLO CELULAR Y MITOSIS

El ciclo celular es el mecanismo universal de reproducción de las células eucariotes, cuyo evento principal es la reproducción del número de cromosomas, siendo la mitosis el mecanismo de división de los cromosomas, del núcleo y de toda la célula (Talledo y Escobar, 2004).

Tradicionalmente, el ciclo celular se divide en cuatro partes: La fase S, es el periodo del ciclo donde se da la replicación del ADN del núcleo. La fase M o mitosis, es el periodo del ciclo donde se da la división celular, el intervalo entre la consumación de mitosis y el comienzo de la síntesis del ADN se llama fase G1; el intervalo entre el final de la síntesis del ADN y el principio de la mitosis se denomina fase G2 (Caravaca, 2004). Los periodos G1 y G2 no son sólo espacios de transición al periodo S y a la mitosis, si no también son espacios de decisión sobre si la célula continúa en el ciclo de división o si se separa temporal o definitivamente de él (Talledo y Escobar, 2004).

En la mitosis ocurren 2 procesos altamente sincronizados: la cariocinesis (división del núcleo) y la citocinesis (división del citoplasma). En la cariocinesis se reconocen distintas fases: profase, metafase, anafase y telofase. Algunos autores reconocen a la prometafase como un estadio entre profase y metafase. La mitosis finaliza con la citocinesis, la cual es diferente en animales y vegetales (Panzera *et al.*, 2006). En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, se contrae alrededor del centro de la célula estrangulando el citoplasma para dividir la célula original en dos células hijas, cada una con su núcleo; en células vegetales, la existencia de pared celular impide que la célula se estrangule por lo que se sintetiza un tabique llamado fragmoplasto entre las dos células hijas. (Poggio *et al.*, 2006)

3.4 FASES DE LA MITOSIS

La mitosis comprende varias fases en las cuales se dan una serie de cambios:

- ❖ **PROFASE:** La cromatina comienza a condensarse lentamente formando cromosomas bien definidos, cuyo número exacto es característico de las especies en cuestión. Cada cromosoma se ha duplicado durante la fase S precedente y ahora consta de dos cromátidas hermanas. Cada una de las cromátidas contiene una secuencia de ADN específica conocida como centrómero, necesaria para la correcta segregación del cromosoma. A medida que avanza este estadio desaparece el nucleolo y comienza a formarse el huso mitótico (Caravaca, 2004).

- ❖ **METAFASE:** en esta fase los cromosomas llegan a su máximo grado de compactación, mientras son alineados por los microtúbulos en un plano situado en la mitad de la célula (Caravaca, 2004).

- ❖ **ANAFASE:** Las cromátidas hermanas se separan y comienzan a migrar hacia los polos opuestos de la célula. Ahora los cromosomas se observan formados por una sola cromátida, con los centrómeros dispuestos hacia los polos y los telómeros hacia el centro de la célula (Panzera *et al*, 2006).

- ❖ **TELOFASE:** los cromosomas llegan a los polos de la célula y la envoltura nuclear aparece de nuevo. Entonces la cromatina condensada vuelve a expandirse (Caravaca, 2004).

3.5 POLIPLOIDIAS:

Un genoma es el ADN total en un juego básico de cromosomas (X), como el que se encuentra en un grano de polen maduro o en una célula del ovario antes de la fertilización (n es el número de cromosomas en un gameto) (Thompson y Lumaret, 1992; Leitch y Bennet, 1997). Una célula diploide contiene dos genomas, como se encuentra en las células huevo después de que estas son fertilizadas, mientras que el núcleo de una célula poliploide contiene más de dos genomas. La poliploidia es un estado en el que hay más cromosomas de los que corresponden al número diploide básico (López, 1999).

El éxito evolutivo de las plantas vasculares poliploides ha generado una intensa especulación, se ha estimado que la frecuencia de la poliploidia entre las plantas con flores varía entre 47% y 95%, estos porcentajes son una clara indicación del importante papel que tiene la poliploidia en la evolución de las plantas fanerógamas (De Rocher *et al.*, 1990; Hilu, 1993; Masterson, 1994). En el caso de los aloploiploides se relaciona con el proceso evolutivo de especiación y ha desempeñado un papel de primera importancia en la evolución de las plantas (Lewis, 1980; Brochmann y Elven, 1992; Thmpson y Lumaret, 1992; Leitch y Bennet, 1997).

Se ha sugerido que la principal importancia evolutiva de la poliploidia, es la de representar un medio para estabilizar las combinaciones genéticas derivadas de la hibridación entre razas con diferentes normas adaptativas (Brochmann y Elven, 1992). La tendencia de la poliploidización somática en plantas al parecer es inversamente proporcional al tamaño del genoma; la poliploidización somática en plantas de genoma pequeño y en células de la línea germinal, podrían ser dos estrategias que llevarían a resultados similares (De Rocher *et al.*, 1990).

3.5.1 Origen de los poliploides

El doblaje del número cromosómico implica un evento somático, ya sea en el cigoto, para producir un individuo poliploide o en algún meristemo apical, para producir una quimera. La poliploidia, también se desarrolla mediante la formación y fusión de los gametos sexuales femeninos y masculinos no reducidos citológicamente (De Wet, 1980).

La poliploidia se expresa por 4 diferentes tipos de series numéricas:

- 1) Múltiplos de un número básico original.
- 2) Múltiplos de un número básico secundario, que se derivó del número original por un ciclo anterior de poliploidia.
- 3) Múltiplos de un número básico que es el menor en el género, pero probablemente se derivó de un género preexistente por un ciclo de poliploidia en el pasado.
- 4) Series de aneuploides que más probablemente representan sucesiones de aloploides basados en diferentes números básicos (Stebbins, 1985).

La poliploidia somática (endopoliploidia), es el cambio cromosómico más común en células diferenciadas, se ha encontrado en la mayoría de las especies de plantas y animales estudiadas (Therman, 1995). Los términos “endopoliploidia” y “polisomatia” se refieren a un fenómeno común, bien estudiado en las plantas, caracterizados por la multiplicación del contenido de ADN en varios tejidos, además de núcleos con contenido 2C y 4C (correspondientes a las fases G₀/G₁ y G₂ del ciclo celular), los tejidos endopoliploides también contienen núcleos con valores 8C, 16C, 32C, 64C.

La endopoliploidia ocurre en un amplio rango de especies y es expresado en tejidos en diferentes estados del desarrollo (Sesek *et al.*, 2005). Comúnmente la endopoliploidia es expresada durante la germinación de la semilla (Bino *et al.*, 1993), pero también ha sido detectada en hojas (Melaragno *et al.*, 1993; Smulders *et al.*, 1994), células germinales (Kudo y Kimura, 2001), flores, como también en el fruto en desarrollo o tejidos de semillas tales como pericarpio de tomate (Bergervoet *et al.*, 1996) o el endospermo de maíz (Kowles *et al.*, 1997).

Varios autores han presentado observaciones sobre endopoliploidia en plantas y también han especulado que la función de este fenómeno estaría relacionado con una mejor tolerancia al frío en las plantaciones de maíz, la morfología de los tricomas de las hojas de *Arabidopsis* (Traas *et al.*, 1998), el fenómeno de senescencia y el mejoramiento en el descenso de los tejidos de almacenamiento (Bergervoet *et al.*, 1996).

Teóricamente, el contenido incrementado de ADN causado por ciclos de endoreduplicación puede resultar en dos tipos de rearrreglos cromosómicos: los cromosomas pueden exhibir poliploidia o pueden en realidad mantenerse todos agrupados. En el caso de la poliploidia, el número de cromosomas es duplicado por cada ciclo de endoreduplicación y cada cromosoma es separado individualmente, mientras que en el caso de la no-disyunción de cromosomas el número de unidades de cromosomas se mantiene igual porque todos están unidos (Sesek *et al.*, 2005). Un fenómeno similar donde los cromosomas están unidos, conocido como politenia, ocurre en los cromosomas gigantes de larvas y adultos de *Dípteros* que a menudo contienen 1024 o 2048 cromátidas por cada cromosoma (Pardue, 1994). Estos también fueron encontrados en células en suspensión de *Phaseolus vulgaris* por Nagl (1969) con una clara organización de bandas similares a las de *Drosophila*. Otros estudios revelan que los cromosomas politénicos gigantes pueden ser

encontrados en varios tejidos de la planta, tales como antípoda, células de anteras o células de endospermo (Krees, 1996).

Desde el punto de vista terminológico endoreduplicación, endopoliploidia, polisomatia, mixoploidia y politenia describen el fenómeno de incrementados niveles de ADN (Sesek *et al.*, 2005). La endoreduplicación es descrita por Therman (1995) como una forma de poliploidia somática en la cual los cromosomas se replican una y otra vez, sin condensación y sin mitosis. Como es referenciado por Levan y Muntzing (1991), el término “endopoliploidia” está asociado con números poliploides de cromosomas, causado por células con 4X, 8X, 16X, 32X. El término “politenia” normalmente describe un tipo especial de cromosoma gigante, visible en mitosis, que está mas o menos suborganizado en bandas e Inter bandas (Rieger *et al.*, 1991)

3.6 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

Un conocimiento profundo de las características morfológicas y cariotípicas dentro de cada especie es necesario no solamente para el reconocimiento de nuevos morfotipos sino también, para la identificación varietal (Acosta, 1980). Para llegar a esto, la biotecnología ha utilizado herramientas como análisis bioquímicos, isoenzimáticos, morfológicos, moleculares y citológicos, sin embargo, pueden existir especies con pocas diferencias a nivel bioquímico y/o morfológico, lo que dificulta la clasificación taxonómica, para realizar el estudio diferencial de estas, es necesario entonces poner en marcha un estudio citogenético completo.

El número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización de germoplasma, ya que nos pueden mostrar relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia y clarificar el origen de híbridos naturales y variedades cultivadas. Además, gran parte de las características reproductivas y

evolutivas de las especies se explican por el conocimiento de sus rasgos citológicos. (Blas y Gonzáles, 2004)

Teniendo en cuenta lo anterior, se podría afirmar que el análisis del cariotipo, en cuanto a características estructurales y cuantitativas es importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas, puesto que los cromosomas no son un sistema estático, sino que están en constante cambio como resultado del proceso de evolución, esta variación se expresa en características como número, forma y tamaño (Naranjo y Poggio, 2004).

Es frecuente y normal la existencia de variación cariotípica interespecífica (Naranjo y Poggio, 2004) es así como el número básico de cromosomas para *Dioscorea* es $x = 10$. *D. alata*, presenta un número somático de 40 y en algunos casos 81 cromosomas, para *D. cayenensis* alrededor de 140 cromosomas, y para *D. bulbífera* 80 cromosomas (Acosta, 1980), sin embargo, la especie *Dioscorea rotundata* ha sido considerada como diploide $2n = 40$ (Scarcelli *et al.*, 2005). Por otro lado, aunque menos frecuente, también puede existir variación cariotípica intraespecífica manifestada como politipismo o polimorfismo cromosómico (Naranjo y Poggio, 2004), por ejemplo se reporta para *D. trifida* la especie americana comestible un número básico de cromosomas igual a 9, siendo la mayoría de las especies de *Dioscorea*, tetraploides $4x = 40$, con número básico $x = 10$ (Acosta, 1980). La aparición de estos nuevos números básicos que no tengan relación directa con los ancestrales es posible si ocurren nuevas reestructuraciones o hibridaciones entre poliploides con distintos números básicos (Naranjo y Poggio, 2004).

3.7 RECUENTO DE CROMOSOMAS MITÓTICOS

Existen métodos directos e indirectos para estimar el número de cromosomas y consecuentemente el nivel de ploidía de una especie vegetal. La citometría de flujo del ADN (Costich *et al.*, 1993), por ejemplo es un método rápido y directo para conocer la ploidía de una planta a partir de la cantidad de ADN existente en sus células, sin embargo, se necesita de un equipamiento especial. Chong y Ozias-akins (1992) consideran que el conteo de cromosomas en células meristemáticas es el método inequívoco para la determinación del número de cromosomas y el nivel de ploidía de una especie, ya que la citometría no es un método selectivo, por que analiza el contenido genómico total de la muestra, sin discriminar aquellas células anómalas escasamente representadas en la muestra (<1%), dado a que los picos que estas discretas poblaciones representan son pequeños y suelen quedar enmascarados por dobletes o tripletes de núcleos (Nohales, 2002), mientras que a través del conteo cromosómico convencional se realiza un estudio detallado de cada una de las células permitiendo identificar este tipo de anomalías; además de lo anterior se puede evidenciar características como: forma, tamaño, presencia de satélites, lo que nos permitiría ejecutar un análisis citogenético más completo. Sin embargo, muchas veces dichos estudios se ven obstaculizados, por que existen especies con cromosomas de tamaño pequeño que carecen de marcadores morfológicos, tales como: tomate, arroz, rosa y cacao (Tabla 1).

Para observar con mayor claridad el número y morfología cromosómica es necesario que se encuentren individualizados los cromosomas, mostrando una forma característica que permita diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente, esto es mas evidente durante la metafase mitótica, fase en la cual presentan su mayor grado de condensación, sin embargo, esta es solo una etapa, por lo general bastante breve del ciclo celular que depende de factores genéticos y ambientales (Talledo y

Escobar, 2004), para dicho propósito se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por encontrarse en constante mitosis, poseer núcleos grandes, permanecer indiferenciados y no contener sustancias almacenadas que puedan intervenir en el proceso, los meristemas más utilizados son los obtenidos a partir de ápices radiculares de semillas en germinación, brotes u órganos establecidos en un sustrato apropiado o provenientes del cultivo de tejidos (Blas y Gonzáles, 2004).

Tabla 1. Algunas especies vegetales de tamaño cromosómico pequeño

Especie	Complemento cromosómico	Longitud cromosómica media (μm)	4C tamaño del genoma (picogramos)
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	$2n = 2x = 24$	2.03	4.6
<i>Oryza sativa</i>	$2n = 2x = 24$	1.95	1.9
<i>Rosa hybrida</i>	$2n = 2x = 28$	2.81	3.3
<i>Theobroma cacao</i>	$2n = 2x = 20$	1.33	1.7

Tomado de Andras (1999)

3.7.1 Coloración

Al microscopio óptico las células tienen el aspecto de vacías y los cromosomas son pocos sensibles, a causa de que su densidad es muy similar a la del citoplasma. Para la observación de diferentes estructuras celulares es necesario teñir para diferenciar todos los componentes, los cuales absorben los colorantes en forma selectiva.

Un colorante es una molécula que tiene la capacidad de absorber radiaciones electromagnéticas dentro de la región del espectro visible es decir entre 400 y 650 nanómetros; para que un compuesto actúe como colorante, su molécula debe tener dos grupos:

- Grupo auxocromo: responsable de la disociación del compuesto
- Grupo cromóforo: productor del color. (Lillo, 2007)

La mayoría de los colorantes citológicos son de naturaleza orgánica y aromática, estos pueden ser de dos tipos: básicos y ácidos (cuadro 1).

Cuadro 1. Tipos de colorantes

BASICOS	ACIDOS
Basofilia: capacidad de coloración con colorantes básicos.	Acidofilia: capacidad de coloración con colorantes ácidos.
Un colorante básico (catiónico), se halla cargado positivamente y por lo tanto puede formar una sal con grupos de tejidos cargados negativamente	Un colorante ácido (aniónico), se halla cargado negativamente y por lo tanto puede formar una sal con un grupo de tejidos cargado positivamente

Tomado de Lillo (2007)

3.7.2 Técnicas de coloración para cromosomas

❖ Método de Feulgen:

Es una técnica específica para la determinación histoquímica del ADN, basado en el contenido de desoxirribosa del mismo. Se eliminan los grupos púricos del ADN por medio de una hidrólisis ácida débil. De esta manera, se abre el anillo de desoxirribosa y se forma el grupo aldehído. La hidrólisis ácida débil, es suficiente para eliminar el ARN (Lillo, 2007)

El mecanismo consta de los siguientes pasos, dependiendo si la hidrólisis se realiza a temperatura ambiente o en estufa:

- A temperatura ambiente: en HCl 5N a 20 °C.
- En estufa: en HCl 1N a 60 °C, de 3 a 15 min., dependiendo del tejido. El tiempo de hidrólisis es muy importante, particularmente a esta temperatura elevada (Lillo, 2007)

El colorante empleado en esta técnica, es fucsina básica, decolorada a fucsina leucobásica. La preparación del colorante es crítica y debe ser llevada a cabo con sumo cuidado. El colorante es inestable al aire o a la luz, por lo que debe ser almacenado en la oscuridad. Las fallas ocasionales que se pueden presentar son frecuentemente debido a la incorrecta hidrólisis (tiempo) o a la ineficiente preparación de la solución colorante (Lillo, 2007).

❖ **Carmín acético:**

Es el colorante más usado para teñir cromosomas. El carmín se extrae de la hembra de *Coccus cactis* (homóptero, cochinilla), que vive sobre los cactus. La coloración puede mejorarse con un mordiente de hierro que puede ser agregado a la solución stock del colorante con unas pocas gotas de acetato férrico. El exceso de hierro lleva a la precipitación del colorante, si esto ocurre, el preparado puede filtrarse. La adición del hierro es innecesaria si las agujas que se usaron para desmenuzar el material son de acero; si el hierro ha sido agregado al colorante, entonces deben usarse agujas de acero inoxidable para prevenir el precipitado. Si el citoplasma tomó mucho color, el exceso de colorante debe ser removido por diferenciación usando ácido acético al 45% (Lillo, 2007).

❖ Orceína acética

Este colorante es más selectivo que el carmín y es preferentemente usado para cromosomas humanos, particularmente glándulas salivales y ocasionalmente en plantas. No es necesario el mordiente y fue recomendado por primera vez como un colorante cromosómico por La Cour en 1941, es usado frecuentemente en solución de ácido acético al 45%. (Alzola, 2001)

Tanto carmín como orceína pueden ser usados en una mezcla de colorantes en una proporción de 9:1 y con HCl 1N, como una combinación de colorante e hidrólisis (Lillo, 2007)

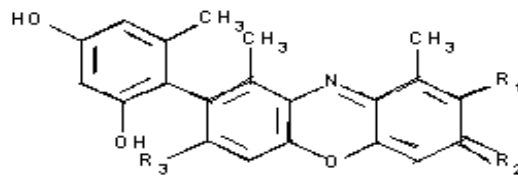


Figura 1. Estructura química de la orceína

❖ Carmín propiónico y orceína propiónica

Pueden ser usados después de una fijación con ácido propiónico-alcohol (1-3). Ellos tienden a dar una mejor diferenciación que el carmín acético y orceína acética. Son muy útiles para pequeños cromosomas (Lillo, 2007).

❖ Hematoxilina acética

Otro colorante usado para cromosomas es la hematoxilina que es extraída de la madera de un árbol conocido como árbol de Campeche, originario de Centroamérica; se prepara en solución de acético 50% (Alzola, 2001)

3.7.3 Técnicas de bandeo cromosómico

El cariotipo elaborado mediante técnicas de tinción uniforme brinda una información muy limitada, ya que no permite la identificación individual de cada cromosoma. Las técnicas de bandas cromosómicas han ayudado en la ampliación de la información citogenética acerca, no sólo de la morfología cromosómica, sino de sus cambios en los reordenamientos estructurales. Además de la construcción más apropiada de cariotipos, las técnicas de bandeo permiten la descripción detallada de cada cromosoma, cambios cromosómicos, localización de marcadores citológicos y la comparación de cromosomas entre especies relacionadas o dentro de una misma especie.

Las bandas cromosómicas se relacionan con variaciones en la estructura longitudinal de la cromátida, puestas en evidencia por las distintas técnicas de tinción. Cada par de cromosomas homólogos se diferencia de los otros pares por su contenido de secuencias de ADN repetitivo y por la constitución de la cromatina en términos de secuencias de bases. Las técnicas de bandas cromosómicas más utilizadas son: **Q, G, R, C, DAPI y NOR.** (Poggio *et al.*, 2006)

❖ **Bandas Q**

Las bandas Q son producidas por tinción con Quinacrina, un fluorocromo que se une al ADN por intercalación entre los planos de las sucesivas pares de bases o por uniones iónicas. La unión ocurre preferencialmente con pares adenina – timina (AT) y la fluorescencia de la quinacrina que se une a los pares AT es más alta comparada con la que se une a guanina – citosina (GC). Esta característica puede constituir la base de las bandas Q dado que los pares AT contenidos en el ADN varían a lo largo de los cromosomas. Sin embargo, esta hipótesis no explica porque la quinacrina falla al teñir ciertas regiones heterocromáticas también ricas en AT (Poggio *et al.*, 2006).

❖ **Bandas G.**

Corresponden a los cromómeros observados sin tratamiento de los cromosomas en paquitene. Utiliza tanto los efectos de enzimas proteolíticas (tripsina) y una suave desnaturalización que afectan las interacciones que estabilizan la estructura de las diferentes proteínas y ácidos nucleicos que componen la cromatina (Poggio *et al.*, 2006)

Varias hipótesis explican el mecanismo de las bandas G:

- El mecanismo se basa principalmente en las diferencias de composición proteica a lo largo de los cromosomas.
- Las bandas G causan rearrreglos cromatínicos llevando a la exposición de bandas similares al de los cromosomas meióticos.

La primera hipótesis está sustentada por el patrón característico de bandas R en secuencia ALU y secuencia KpnI en bandas G, las cuales varían en cuanto a su composición de bases, la segunda sugiere que los tratamientos usados en bandas G tal como el de tripsina lleva al despliegue de los bucles de cromatina y permiten que el Giemsa tinte el esqueleto proteico asociado con los alineamientos de regiones ricas en AT (Poggio *et al.*, 2006).

❖ **Bandas R.**

Corresponde con regiones ricas en GC, o sea, corresponde a un alineamiento base específico, que se replican durante la primera mitad del periodo de síntesis y se condensan tardíamente durante la mitosis. (Drets, 2002)

Esto se sustenta por:

- Tratamientos que sistemáticamente producen bandas R, involucran desnaturalización seguida por renaturalización diferencial del ADN. Estos tratamientos permiten que solo regiones ricas en GC se renaturalicen.

Los patrones de bandas R pueden ser obtenidos sin desnaturalización mediante el uso de componentes fluorescentes tales como la cromomicina A3 y la mitramicina, los cuales tienen alta afinidad por regiones ricas en GC.

- Las bandas R en humanos contienen secuencias ALU que se desnaturalizan más lentamente y se renaturalizan más rápidamente que las secuencias KpnI debido a que las primeras son más ricas en GC que las últimas, más cortas y por lo tanto menos complejas y a menudo presentan también repeticiones invertidas (Poggio *et al.*, 2006).

❖ **Bandas C.**

La técnica de bandeo C permite la localización de los segmentos de heterocromatina de ADN en cromosomas homólogos, los cuales se diferencian de los segmentos de eucromatina presentes en el cromosoma normal (Pinto, 2006).

Las bandas C son reveladas por sucesivos tratamientos con ácido, álcali y sal a alta temperatura seguido de una tinción con Giemsa. Estos tratamientos extraen preferencialmente el ADN de las regiones que no corresponden con las bandas C, dejando intacto el ADN de la heterocromatina constitutiva el cual se tiñe intensamente con Giemsa (Poggio *et al.*, 2006)

Las condiciones ácidas hidrolizan los enlaces glicosídicos entre las bases púricas del ADN y el azúcar, las condiciones alcalinas desnaturalizan el ADN y la condición salina a alta temperatura rompe el ADN en pequeños

fragmentos, los cuales son extraídos. La alta resistencia a la extracción del ADN localizado en las bandas C puede estar relacionada con la presencia de proteínas no histónicas fuertemente pegadas a la heterocromatina y la rápida renaturalización de las secuencias de ADN altamente repetitivo que contienen las bandas C (Poggio *et al.*, 2006).

❖ **Bandas DAPI.**

El DAPI (4,6 diamidino- fenilindol) es un fluorocromo que tiene afinidad por las regiones AT y además produce un patrón de bandas similar al de las bandas Q. Raramente se usa sólo y usualmente está asociado con uno de contrastante como la distamicina A. Esta asociación intensifica el teñido de ciertas regiones (Poggio *et al.*, 2006).

La tinción con fluorocromos base específicos ha permitido el análisis de las bandas heterocromáticas en plantas, las cuales también se analizan mediante bandeo C (Guerra, 2000); el bandeo con fluorocromos tiene la ventaja de ser un método simple, más reproducible y menos destructivo al ser comparado con el bandeo C (Guerra, 1993).

Por ejemplo: Los fluorocromos cromomicina A (CMA) y el 4,6 diamidino-fenilindol (DAPI) exhiben tinción preferencial por las secuencias de ADN ricas en GC y AT respectivamente; permitiendo la identificación de los diferentes tipos de heterocromatina. Otros fluorocromos como la distamicina A (DA), son usados para contrastar entre CMA y DAPI (Schweizer y Ambros, 1994; Marcon *et al.*, 2003)

❖ **Bandas NOR. Tinción con nitrato de plata.**

La tinción con nitrato de plata es un método que permite la visualización de la región organizadora del nucleolo (NOR), la cual está relacionada con las constricciones secundarias y los sitios ADN ribosomales (ADNr),

pero después de la tinción con plata solamente aquellos sitios activados en el núcleo en interfase son teñidos en la subsiguiente profase o metafase. En general los sitios teñidos con plata en los cromosomas en profase o metafase y el número máximo de nucleolos por núcleos en el núcleo de interfase corresponden al número de sitios 45S ADNr (Moscone *et al.*, 1995).

La variación en el número y la posición de los sitios ADNr ha demostrado ser un rasgo adicional cariotípico importante para el análisis de algunos géneros de gimnospermas tales como *Clivia* (Ran *et al.*, 1999) y *Sanguisorba* (Mishima *et al.*, 2002). Un estudio de este tipo fue realizado por Buarque *et al.*, (2005) en el género *Selaginella* para contribuir a un mejor entendimiento de la variabilidad estructural en los cromosomas de este género, se aplicaron diferentes métodos de tinción en especies con diferentes números de cromosomas; se analizó el complemento cromosómico de siete especies, en cuatro de ellos la distribución de los sitios 45S ADNr fue determinada por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Adicionalmente se desarrollaron tinciones CMA/DA/DAPI y nitrato de plata para investigar la correlación entre los sitios 45S ADNr, las bandas heterocromáticas y el número de sitios DNAr activos. Encontrando correspondencia entre las bandas CMA+ y el número tamaño y localización de los sitios ADNr. En general los sitios ADNr correspondían con el número de nucleolos por núcleo. La variación marcada en el tamaño, número cromosómico y sitios ADNr mostraron que han ocurrido cambios dramáticos cariológicos durante la evolución del género en el nivel diploide, estos datos sugieren que dos números básicos pueden ocurrir independientemente en el género.

La existencia de diferencias citológicas entre especies de un mismo género de interés agronómico y comestible, ha llevado a realizar varios estudios cromosómicos.

De Carvalho y Guerra (2002) estudiaron el número, morfología, tamaño cromosómico y otros marcadores citológicos como el número de constricciones secundarias, patrón de condensación cromosómica en profase, estructura del núcleo interfásico y el número máximo de nucleolos en 39 cultivares de yuca y 8 especies silvestres relacionadas con el género *Manihot*, para identificar posibles diferencias citogenéticas entre las especies. Encontrando en todas las accesiones investigadas un cariotipo similar con 36 cromosomas pequeños, de tipos metacéntricos y submetacéntricos, estructura nuclear interfásica y patrón de bandas C idéntica, 2 pares de constricciones secundarias, meiosis regular y un número máximo de seis nucleolos por núcleo, de acuerdo con esto concluyeron que todo el material estudiado se encuentra relacionado mostrando un cariotipo altamente estable.

Przywara *et al.*, (2003) analizaron la variabilidad en número cromosómico, fórmula cariotípica y longitud cromosómica total mediante técnicas de citogenética convencional en cinco poblaciones del musgo polaco *Plagiomnium undulatum*, encontrando estabilidad en el número cromosómico, pero gran variabilidad con respecto al tipo de cromosomas: por otro lado, observaron diferencias en el tamaño cromosómico dependiendo del método de tinción utilizado.

Dematteis (2001) reportó números cromosómicos e información cariotípica de ocho especies de *Vernonia* de Brasil y Argentina pertenecientes al grupo *Macrocephalae*. La mayoría de las especies estudiadas resultaron diploides con número básico $x = 16$. Estas especies fueron *V. aurea*, *V. brevifolia*, *V. chalybaea*, *V. heringeri* y *V. rufogrisea*, las cuales presentaron todas $2n = 32$. Otras dos entidades, *V. hovaefolia* y *V. obtusata*, fueron tetraploides con este mismo número básico, mostrando $2n = 64$ cromosomas en sus células somáticas. La restante especie de *Vernonia* analizada, *V. rugulosa*, resultó diploide con número básico $x = 15$. Se detectaron diferencias entre las distintas especies en

cuanto a su tamaño y morfología cromosómica, la presencia de pares subtelocéntricos, tal como se detectó en *V. hovaefolia* es inusual en el género, sugiriendo que la diversificación del género *Vernonia* ha estado acompañada por cambios cariotípicos relativamente pequeños.

Chiarini (2005) examinó por primera vez mediante técnicas clásicas los cromosomas somáticos de *Ennealophus fimbriatus* Ravenna, hallando número cromosómico $2n = 14$ y macrosatélites en el brazo corto de los cromosomas del par submetacentrico.

En muchos casos los análisis del cariotipo y del comportamiento meiótico, permiten conocer el nivel de ploidía y los posibles orígenes de la esterilidad en las especies vegetales, como es el caso de *Trifolium repens*, trébol blanco, donde Majumdar *et al.*, (2004) encontraron meiosis y mitosis regular cuyos resultados correspondían con la elevada fertilidad del polen, dichas características confirmaron las condiciones genéticas favorables y la estabilidad citológica para posteriores usos de este genotipo en programas de mejoramiento y cultivo.

Solis *et al.*, (2005) estudiaron el comportamiento meiótico y la viabilidad del polen de 49 poblaciones del complejo *Turnera sidoides* (Turneraceae); a fin de analizar el papel de la autoploidía en el origen y evolución de este complejo, encontrando un comportamiento meiótico generalmente regular en las poblaciones diploides, formación de multivalentes en los poliploides, así como mayor viabilidad del polen en las poblaciones diploides en relación con las poliploides, lo que estaría de acuerdo con el comportamiento esperado en los autoploidios, constituyendo una evidencia citológica que sustenta el origen autoploide de los poliploides del complejo *Turnera sidoides*.

Caponio (2001), trabajó en la caracterización citogenética de tres especies de *Digitaria* (*D. insularis*, *D. sacchariflora* y *D. similis*) determinando el nivel de ploidía a través de recuentos cromosómicos y comportamiento meiótico, y el sistema de reproducción analizando los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis a través de cortes seriados de ovarios, como una de las etapas de un estudio multidisciplinario que llevaría a la comprensión de las relaciones genómicas y filogenéticas entre las especies, encontrando que las especies estudiadas son todas citotipos tetraploides y con sistema de reproducción sexual, con tendencia a la cleistogamia en *D.similis*, en cuanto a *D. sacchariflora* y *D. insularis* no se observaron diferencias en sus sistemas citogenéticos.

Muchas de las especies cultivadas que representan un beneficio económico para el hombre están siendo modificadas a través de la introducción de genes de interés, que permiten aumentar rasgos importantes relacionados con su productividad, es así como en la actualidad para poder utilizar eficientemente el germoplasma silvestre en los programas de mejoramiento es necesario conocer las características cromosómicas de las especies.

Mercado y Delgado (2000) caracterizaron citológicamente 31 especies del género *Phaseolus*, del cual solo nueve especies y cuatro subespecies del total del género se les había realizado dicho análisis, esta baja cantidad de especies analizadas ha sido atribuida al tamaño reducido de los cromosomas. El estudio anterior permitió investigar el posible origen híbrido de *Phaseolus coccineus* subespecie *darwinianus* mediante la aplicación de GISH (hibridación *in situ* genómica), en el que se encontró alto grado de homología entre los miembros del complejo.

De igual forma se realizó un estudio cromosómico en el género *Karwinskia* (Tapia, 2004), donde se encontró que los cambios

cromosómicos no presentaban relación con los eventos de especiación. Un estudio similar fue llevado a cabo en el género *Eucalyptus* por Mora (2005), mediante la comparación de los cariotipos de *E. globulus* y *E. cladocalix*, con el fin de aportar información citogenética útil en la generación de posibles híbridos con nuevas características promisorias.

Marasek y Orlikowska (2003), realizaron un estudio de la morfología cromosómica de varios genotipos de Lili, encontrando número cromosómico $2n = 2x = 24$, la morfología cromosómica fue determinada mediante tinción con la reacción de Feulgen y tinción con nitrato de plata, con el fin de obtener características como la longitud cromosómica y constricciones secundarias, estas últimas, fueron usadas como marcadores en la mayoría de los casos, permitiendo solo la identificación de 4 a 10 cromosomas, dependiendo del genotipo.

Lavia y Fernández (2001) analizaron los cromosomas de 8 especies silvestres diploides de *Arachis* de las secciones *Extranervosae*, *Heteranthae* y *Arachis*, donde todas las especies estudiadas, *A. macedoi*, *A. retusa*, *A. sylvestris*, *A. cruziana*, *A. herzogii*, *A. simpsonii* y *A. williamsii*, presentaron número básico $x = 10$ con $2n = 2x = 20$ cromosomas, longitud cromosómica media de $1,78 \mu\text{m}$, al menos un par de cromosomas con satélites (SAT), cuya ubicación fue variable. Los cromosomas "A", sólo fueron observados en las especies perennes de la sección *Arachis*, *A. herzogii*, *A. simpsonii* y *A. chiquitana*, los cariotipos presentaron mayor número de cromosomas metacéntricos y de 1 a 3 pares submetacéntricos, es decir, fueron más o menos simétricos, independientemente de las secciones a las que pertenecieran.

Hayirlioglu y Beyazoglu (2000) analizaron cariológicamente 17 especies de *Alchemilla* L. Encontrando que el 75% de las especies presentaron números cromosómicos desde $2n = 86$ hasta $2n = 123$, pocas especies mostraron números más bajos; comprobando que la mayoría de las

especies de la sección *Alchemilla* estudiadas hasta la fecha son poliploides.

Flores *et al.*, (2006) realizaron estudios cromosómicos de ocho especies del género *Quercus*, de las cuales cinco (*Q. candicans*, *Q. crassifolia*, *Q. elliptica*, *Q. hintonii* y *Q. urbanii*) pertenecían a la sección *Lobatae* y tres (*Q. frutex*, *Q. obtusata* y *Q. rugosa*) a la sección *Quercus*. Reportando por primera vez el número cromosómico de todas ellas excepto *Q. rugosa*. Todos los individuos analizados se trataron de diploides, $2n = 2x = 24$, con cariotipos moderadamente asimétricos.

Menéndez *et al.*, (2000), detectaron anomalías cromosómicas en células de hoja de café y sus callos derivados, las cuales se debían a alteraciones durante la mitosis; permitiendo de esta manera monitorear la viabilidad del material *in vitro* usado para regenerar plantas. Asimismo, Bueno (2004) en su trabajo cita a los estudios citogenéticos como de gran importancia para: determinar la variabilidad intraespecífica, el desarrollo de programas de mejoramiento genético, la citotaxonomía y la evaluación del germoplasma.

Murray *et al.*, (2005) analizaron los valores C de ADN de 155 especies y el número cromosómico de 55 especies de pastos endémicos y nativos de la flora de Nueva Zelanda, encontrando amplio rango de valores C, dicha variación estaría relacionada con la ubicación filogenética del género, de esta manera las plantas del clado BOP (*Bambusoideae*, *Oryzoideae*, *Pooideae*) presentaron valores C más altos que las pertenecientes al clado PACC (*Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae* + *Centothecoideae*). En la mayoría de los casos los poliploides tienen tamaños de genoma más pequeño (valor C dividido por el nivel de ploidía) que los diploides y comúnmente hay un decremento progresivo al incrementarse el nivel de ploidía, por otro lado, se confirmó la alta frecuencia de poliploides, encontrándose solo un 10% de diploides,

concluyéndose con esto que no está clara la relación entre valor C, poliploidía y el estado de conservación (rareza).

En *Dioscorea* se han realizado pocos estudios, debido a los altos niveles de ploidía y al tamaño pequeño de los cromosomas, sin embargo, Dansi *et al.*, (2000) determinaron niveles de ploidía en algunas especies mediante conteo cromosómico convencional y citometría de flujo, permitiendo este análisis la posterior obtención de genotipos élites.

Abraham (1998), encontró gran cantidad de machos hexaploides en *Dioscorea alata*, condición limitada sólo a clones hembras, esto hizo suponer que la hexaploidía en machos es producto de autoalohexaploidía. Resultados similares fueron reportados por Egesi *et al.*, (2002) quienes en su estudio encontraron un alto porcentaje de machos hexaploides comparado con el porcentaje de machos tetraploides.

Sharma y De Deepesh (1957) revelaron mediante un estudio citogenético la presencia de poliploidias en series de 30, 40, 50 y 70 cromosomas en varios individuos de *Dioscorea alata* además de mixoploidías en células meristemáticas, en el caso de *Dioscorea sativa* encontraron el número cromosómico $2n = 40$.

Lauzer *et al.*, (1992) mediante citología determinaron que el número de cromosomas para *Dioscorea abyssinica* y *Dioscorea mangelotiana*, dos especies de ñame silvestre del oeste africano, es $2n = 40$ contrario al de $2n = 72$ y $2n = 80$ reportados en otras literaturas, de igual manera detectaron la presencia de células meristemáticas atípicas con un número cromosómico $2n = 38$.

Teniendo en cuenta todas las investigaciones planteadas anteriormente se puede inferir la importancia que tiene la realización de análisis citogenéticos mediante la aplicación de técnicas clásicas y moleculares en especies vegetales, tales como el ñame, como fuente de información necesaria para efectuar el monitoreo de la variación somaclonal ocurrida durante la regeneración de plantas y el cultivo *in vitro*, identificación y selección de clones con afinidades cromosómicas para procesos de mejoramiento genético, detección de anomalías cromosómicas estructurales y numéricas, determinación de posibles relaciones filogenéticas y evolutivas entre las especies.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESCENARIO DE REFERENCIA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, la cual se encuentra localizada a 9° 58' 23,8" de latitud Norte y 74° 58' 58,4" de longitud Oeste; con una humedad relativa del 45 – 60 %, una precipitación anual de 1087 mm, altitud de 200 m.s.n.m y una temperatura promedio de 28 °C.

4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El material vegetal estaba constituido por vitroplantas jóvenes de *Dioscorea alata*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea trifida*, y *Dioscorea cayennensis* seleccionadas al azar y establecidas por la técnica de cultivo de segmentos nodales en el Banco de germoplasma del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre (Figura 2).



Figura 2. Vitroplantas en cuarto de crecimiento

4.3 CULTIVO *in vitro*

Se multiplicaron segmentos nodales de cada una de las especies sobre medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con diferentes componentes de acuerdo con los métodos de propagación estandarizados por Rodríguez y Beltrán (2002) para *Dioscorea alata*, Acosta y Beltrán (2001) para *Dioscorea rotundata*, Pérez y Brun (2003) para *Dioscorea cayennensis* y Chacón *et al.*, (2000) para *Dioscorea trifida* (Anexo 1, 2, 3, 4). Las plántulas fueron incubadas con un fotoperíodo de 12 horas, intensidad lumínica de $50 \pm 5 \mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$, humedad relativa de 45 – 60 % y una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por un período de 12 – 15 días hasta la aparición de las primeras raíces (Figura 3; a, b, c y d).

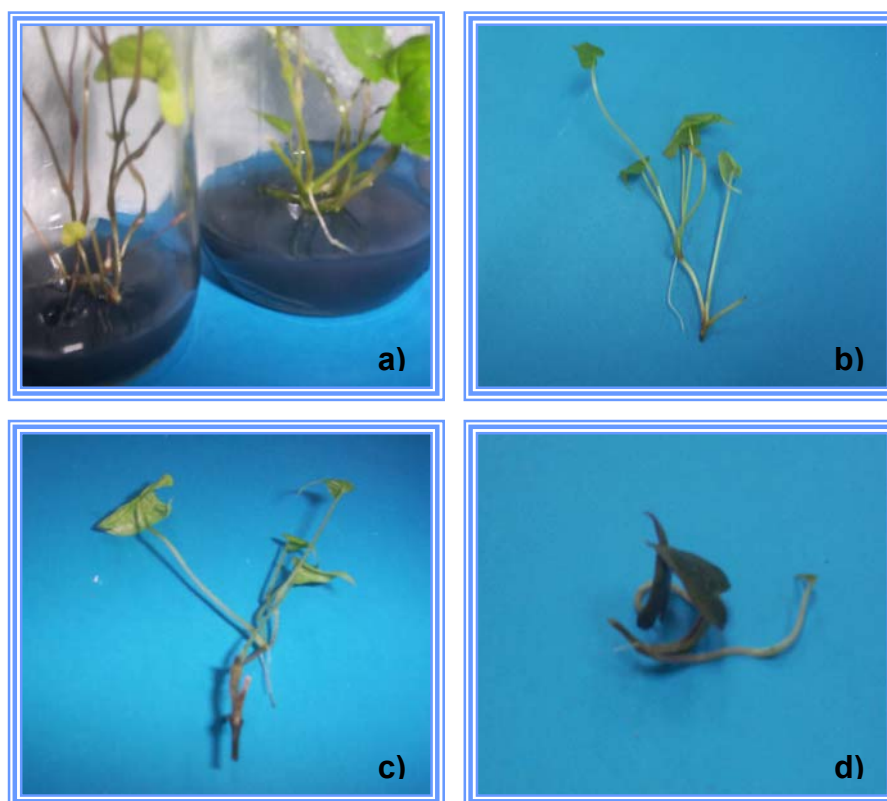


Figura 3. Vitroplantas con raíces jóvenes en a) *D. rotundata* b) *D. trifida* c) *D. cayennensis* d) *D. alata*

4.4 OBTENCIÓN DE MERISTEMOS RADICULARES

Para tal propósito se realizó el corte de raíces de aproximadamente 1 a 2 centímetros de longitud a partir de vitroplantas de 12 – 15 días de cultivo, este procedimiento se realizó entre las 8:00 y 9:00 AM, hora de mayor actividad mitótica, este rango es presentado por diversos grupos de plantas (Ackerman, 1971), y es explicado por el umbral de absorción de nutrientes y agua para suplir las necesidades en las diversas rutas metabólicas, por lo cual se incrementa la división celular en los ápices radiculares (Bueno y Rodríguez, 2006). Esta colecta se realizó en cámara de flujo laminar, colocando las raíces en una caja de petri con agua destilada para evitar la deshidratación (Figura 4; a y b).

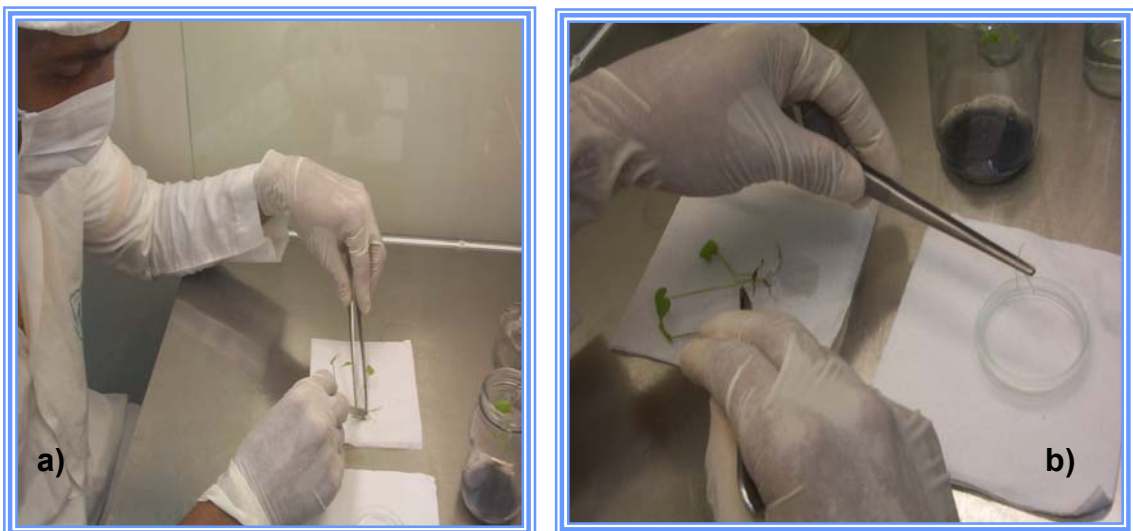


Figura 4. Obtención de meristemos radiculares. a) Corte, b) depositación de los meristemos en caja de petri.

4.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS EN METAFASE

La estandarización del protocolo para la obtención de células en metafase de ñame se realizó teniendo en cuenta tres fases: pretratamiento, hidrólisis y coloración. En el pretratamiento se emplearon varias concentraciones de un agente antimitótico (8-Hidroxiquinolina) con diferentes tiempos de exposición al mismo. Posteriormente fue realizada una hidrólisis ácida al tejido con varias concentraciones de HCl y con diferentes tiempos de exposición. La coloración de los cromosomas fue hecha empleando tres colorantes (aceto-orceína, Giemsa y reactivo de Schiff) antes de realizar el squash (aplastamiento) del modo convencional entre porta y cubreobjetos. Estas etapas tenían como fin la consecución de preparaciones con un gran porcentaje de células detenidas en metafase y con cromosomas dispersos, condiciones necesarias para el análisis cromosómico posterior.

4.5.1 Pretratamiento con inhibidor del huso mitótico

Para la obtención de células en metafase, se evaluaron cuatro concentraciones del antimitótico 8-hidroxiquinolina (0, 1, 2 y 4 mM) con tiempos de exposición de 3, 6 y 12 horas a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Estos tratamientos se realizaron sumergiendo las raíces en tubos eppendorf que contenían cada una de las concentraciones del antimitótico, realizando tres repeticiones por tratamiento.

4.5.2 Fijación

Para la fijación se siguieron las metodologías desarrolladas por Gornall y Wentworth (1993); y küpfer y Yuan (1996), donde las puntas de raíces previamente tratadas con 8-Hidroxiquinolina fueron fijadas depositando el material vegetal en tubos eppendorf que contenían una solución de etanol - ácido acético (Farmer), en proporción 3:1 por un periodo comprendido entre 24 y 48 horas, con el fin de interrumpir rápidamente los procesos

vitales de la muestra, sin variar la estructura de la célula y evitar el ataque de microorganismos.

4.5.3 Hidrólisis de la pared celular

La eliminación de la pared celular se realizó con el fin de facilitar la penetración del colorante y obtener preparaciones con células dispersas, citoplasma claro y sin plasmolisis; en este procedimiento, las raíces fueron tratadas con dos concentraciones (1 y 5 N) y cuatro tiempos de exposición (10, 60, 90 y 120 min.) al ácido clorhídrico (HCl) (Tabla 2), para lo cual inicialmente se lavaron en dos oportunidades con agua destilada con el fin de eliminar restos de antimetabólico o de fijador.

Tabla 2. Concentración de ácido clorhídrico y tiempo de exposición de cada uno de los tratamientos evaluados

Tratamiento	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Concentración (Normalidad)	1	1	1	1	5	5	5	5	5+1
Tiempo (min.)	10	60	90	120	10	60	90	120	60+10

4.5.4 Tinción

Para la tinción de los cromosomas metafásicos, se evaluó la efectividad de 3 colorantes: Aceto-orceína al 2% por 20 min., Giemsa al 4% por 20 min. y reactivo de Schiff por 120 min.

4.6 SQUASH (aplastamiento)

A las puntas de raíces teñidas anteriormente se les agregó una gota de ácido acético al 45% para ayudar a aclarar el citoplasma y retirar el colorante en exceso, cubriendo después con una lámina cubre objetos. Posteriormente se realizó presión uniforme con ayuda de una superficie blanda manteniendo inmovilizada la lámina en uno de los extremos según el procedimiento de Blas y Gonzáles (2004).

4.7 CONTEO DE CÉLULAS CON CROMOSOMAS DISPERSOS DETENIDAS EN METAFASE

Las placas teñidas fueron observadas inicialmente en objetivo de 10X para buscar células individualizadas y dispersas, luego con el objetivo de 40X se contaron la cantidad de células totales y de células con cromosomas dispersos aptas para el conteo presentes en cada campo, para determinar cual de los tratamientos con el antimitótico proporcionaba mayor porcentaje de células con cromosomas dispersos y citoplasma nítido.

Se contaron en total 20 campos por cada placa y tres placas por cada tratamiento. Los datos obtenidos fueron tabulados y luego procesados con el programa estadístico statgraphics plus® 5.1

4.8 CONTEO Y MEDICIÓN DE CROMOSOMAS

Para este paso se tuvo en cuenta el mejor pretratamiento obtenido, se seleccionaron 5 plantas por especie (Baeza, 2006; Lauzer *et al*, 1992); se realizaron placas con el pre-tratamiento de 8-Hidroxiquinolina conveniente para cada una, a partir de las cuales se fotografiaron en un microscopio óptico en objetivo de inmersión con una cámara digital. Las 5 metafases de mayor calidad, fueron editadas posteriormente para el proceso de

conteo en un computador mediante el programa Adobe Photoshop versión 7.0 (Baeza, 2006)

Para la determinación de la longitud cromosómica total se realizó medición directa en el microscopio con ayuda de un micrómetro ocular calibrado para el objetivo de 100x (Dansi *et al.*, 2000; Gamiette *et al.*, 1999; Baquar, 1980; Baeza, 2006).

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la efectividad de los pretratamientos, se utilizó un factorial estándar estimando los efectos de dos factores categóricos (tiempo de exposición y concentración de 8-hidroxiquinolina), cada uno con tres y cuatro niveles respectivamente.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se efectuó mediante un análisis de varianza; la separación de medias para medir la influencia de cada uno de los niveles de los factores sobre el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos obtenidas en cada tratamiento, se realizó mediante una prueba de Tukey.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la obtención de preparaciones adecuadas para el análisis cromosómico en ñame están involucrados varios factores como el pretratamiento con un antimitótico, el cual debe elegirse de tal manera que permita obtener un alto porcentaje de células detenidas en metafase con dispersión cromosómica, de igual forma, influyen los pasos de hidrólisis de la pared celular y la tinción de la cromatina, ya que fundamentalmente de ellos dependerá la clara observación de los cromosomas. A continuación se presentan los resultados de la estandarización de cada etapa del protocolo y el análisis cromosómico posterior en cuatro especies de *Dioscorea*.

5.1 HIDRÓLISIS DE LA PARED CELULAR

El tratamiento químico más adecuado para disolver la pared celular y clarificar el citoplasma fue el **H7**, conformado por una solución de HCl a una concentración 5 N y un tiempo de 90 minutos a 25°C (Figura 5a); los tratamientos restantes evaluados no fueron efectivos para degradar totalmente la pared celular, por ello las células permanecieron unidas y superpuestas, dificultando la penetración del colorante hecho que impedía la visualización del contenido nuclear (Figura 5b).

Estos resultados difieren con los ensayos realizados por Gamiette *et al.*, (1999), en *D. alata*, *D. rotundata* y *D. cayennensis*, quienes para la hidrólisis emplearon HCl 5 N durante 45 minutos, seguido por una inmersión en HCl 1 N por 10 minutos; al igual que los realizados por Bousalem *et al.*, (2006), en *D. trifida*, quienes además de aplicar una hidrólisis química con HCl 0.25 N por 20 min, efectuaban una digestión enzimática posterior con celulasa Onozuka R-10 al 5% y Pectinasa Y-23 al 1% durante 30 - 180 minutos dependiendo del tamaño del meristemo

radicular. Teniendo en cuenta lo anterior se observa mayor eficacia al utilizar HCl 5N como agente hidrolítico de la pared celular en relación a costos, duración del tratamiento y manipulación de la muestra.

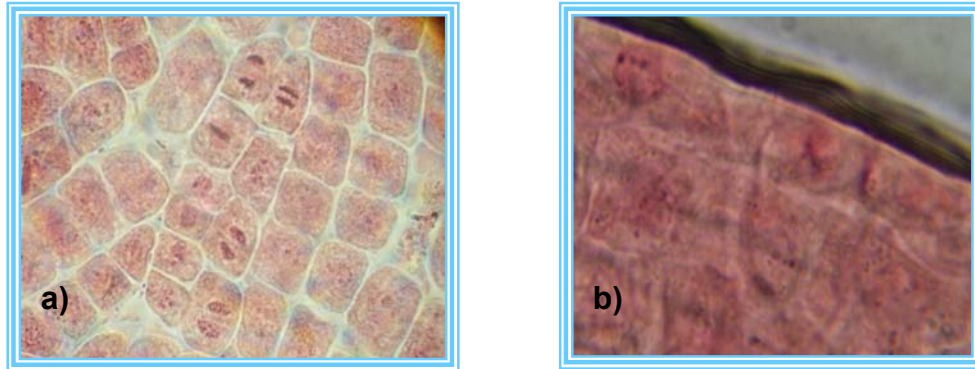


Figura 5. Hidrólisis. a) Hidrólisis con HCl 5N durante 90 minutos, b) Hidrólisis con HCl 1 N por 120 minutos

5.2 TINCIÓN DE LA CROMATINA

La coloración con aceto-orceína ha sido ampliamente utilizada para estudios cromosómicos en plantas, mostrando resultados satisfactorios en la visualización de los cromosomas de especies como: *Capsicum chinense*, ají, (Alcorcés, 2001); *C. pubescens* (Guevara *et al.*, 2000); en nuestro caso, este fue el mejor colorante para la observación e identificación de los cromosomas (Figura 6c), mientras que el resto de los colorantes ensayados, reaccionaron con otros constituyentes celulares, causando la tinción total de la célula y dificultando la apreciación de los cromosomas (Figura 6a y b).

Cabe anotar que el tratamiento con ácido clorhídrico previo a la tinción con aceto-orceína y la presencia de dicho compuesto en esta solución colorante permitió la degradación de constituyentes celulares y metabolitos secundarios que podrían intervenir en el proceso de coloración; como sucede en varias especies vegetales, rosa y cacao, productoras de taninos, polifenoles y otros metabolitos que obstaculizan la

realización de preparaciones cromosómicas de alta calidad (Andras *et al.*, 1999).

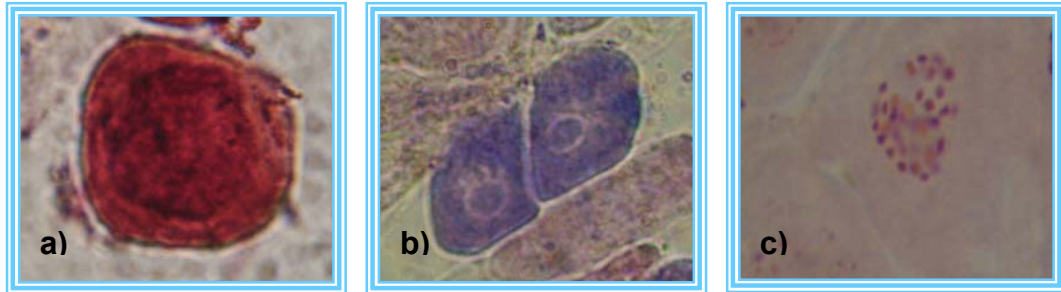


Figura 6. Tinciones. a) Tinción con Schiff, b) Tinción con Giemsa, c) tinción con aceto-orceína.

5.3 PRETRATAMIENTO CON INHIBIDOR DEL HUSO MITÓTICO

En esta etapa se evaluaron cuatro concentraciones de 8-hidroxiquinolina y tres tiempos de exposición a la misma, con el fin de determinar cual de los tratamientos proporcionaba un mayor porcentaje de células detenidas en metafase y con cromosomas dispersos, aptas para el conteo y medición cromosómica.

Para *D. alata*, *D. rotundata* y *D. cayenensis* en el tratamiento T1 (Tabla 3), se notó la presencia de algunas células en otros estados mitóticos como la anafase y telofase (Figura 7), probablemente la concentración al antimitótico no fue suficiente para inhibir la formación del huso cromático, por otro lado, en el tratamiento T6 (Tabla 3) se observaron cromosomas dilatados en toda la extensión de la célula.

En *D. rotundata* se visualizaron células con citoplasma plasmolizado en los tratamientos T8 y T9 (Tabla 3), es posible que esto sea resultado de la prolongada exposición al antimitótico, ocasionado por el desbalance osmótico al que se somete la célula durante estos tratamientos.

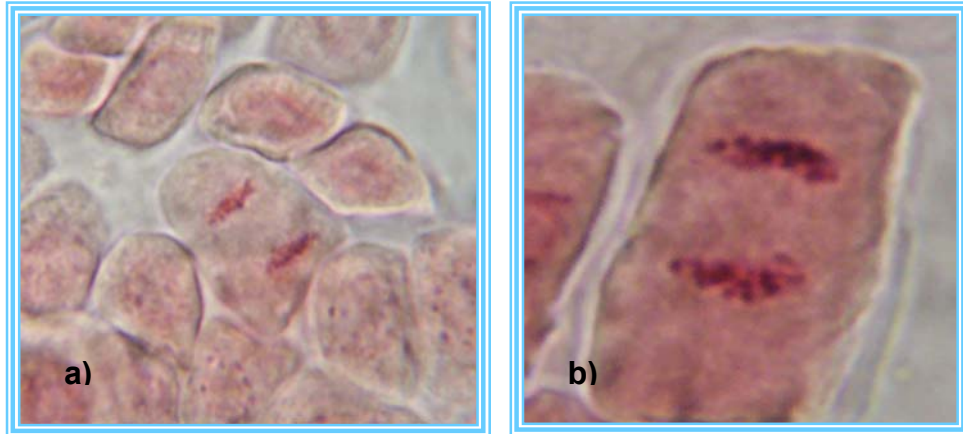


Figura 7. Células de *D. alata*. a) y b) En estado de telofase

El análisis de varianza realizado a los datos mostró diferencias significativas en el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en todas las especies de *Dioscorea* analizadas y en cada uno de los niveles de los factores y la interacción entre ellos, (Anexo 5, 8, 11, 14).

Para complementar esta diferencia se realizó una comparación de medias de cada tratamiento mediante una prueba de Tukey al 5%, encontrándose que en las especies *Dioscorea alata*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea cayenensis*, para el factor concentración los mayores porcentajes de metafases se obtuvieron en el nivel 2 mM (Figura 8a, 8b, y 8d), el cual mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de niveles (Anexo 7, 12, 15); mientras que en *Dioscorea trifida* los mejores resultados se obtuvieron con la concentración 4 mM (Figura 8c), la cual no mostró diferencia significativa con los otros niveles (Anexo 9).

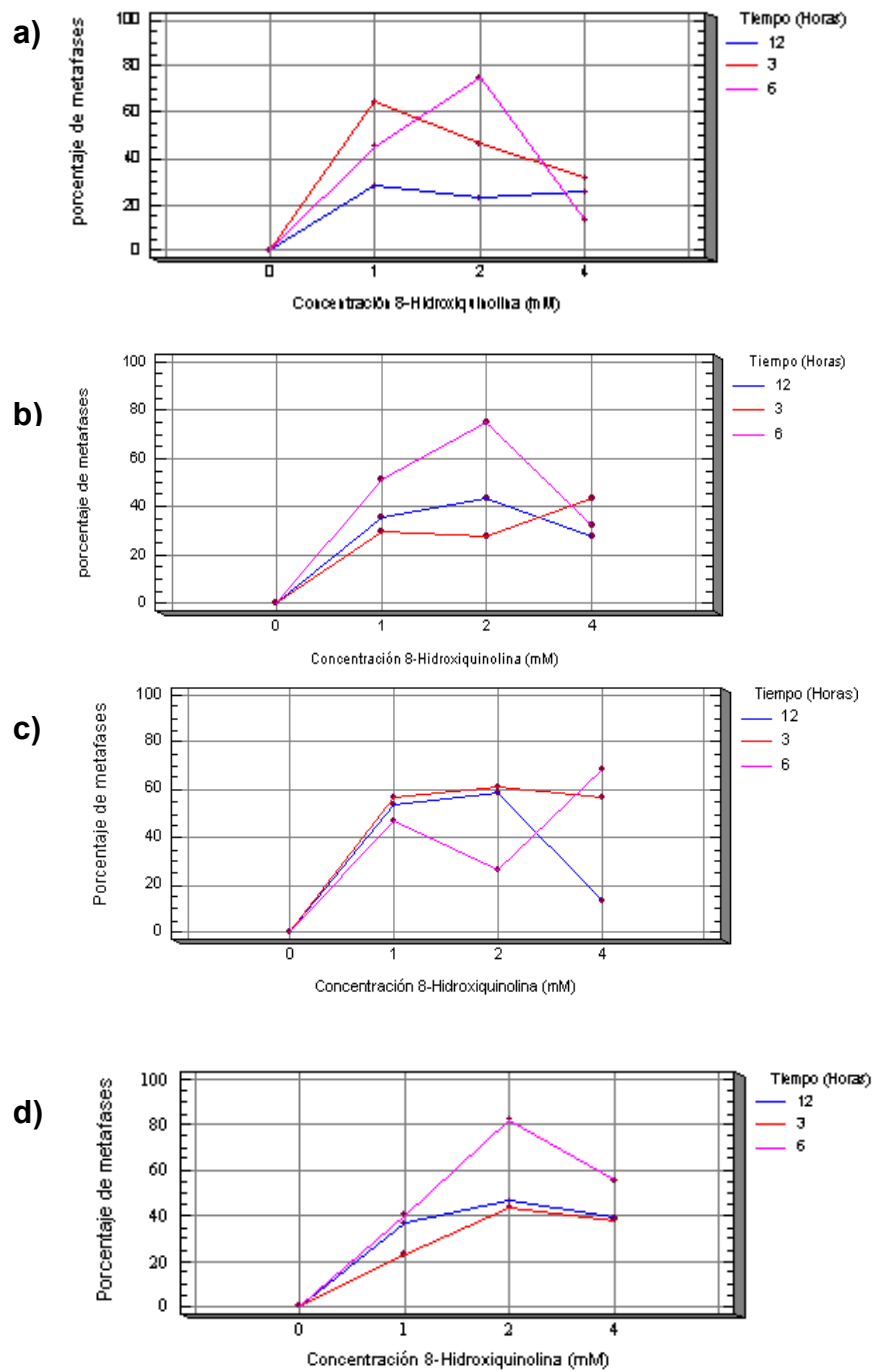


Figura 8. Influencia de la concentración de 8-Hidroxiquinolina en el porcentaje de metafases en a) *Dioscorea cayennensis*, b) *Dioscorea alata*, c) *Dioscorea trifida*, d) *Dioscorea rotundata*

El análisis realizado a los tiempos reveló en general, en el nivel 6 horas se obtuvieron los mejores resultados (Figura 9; a, b, c, y d), el cual presentó diferencias estadísticamente significativa con respecto a los demás tiempos (Anexo 6, 10, 13, 16), para todas las especies de *Dioscorea*.

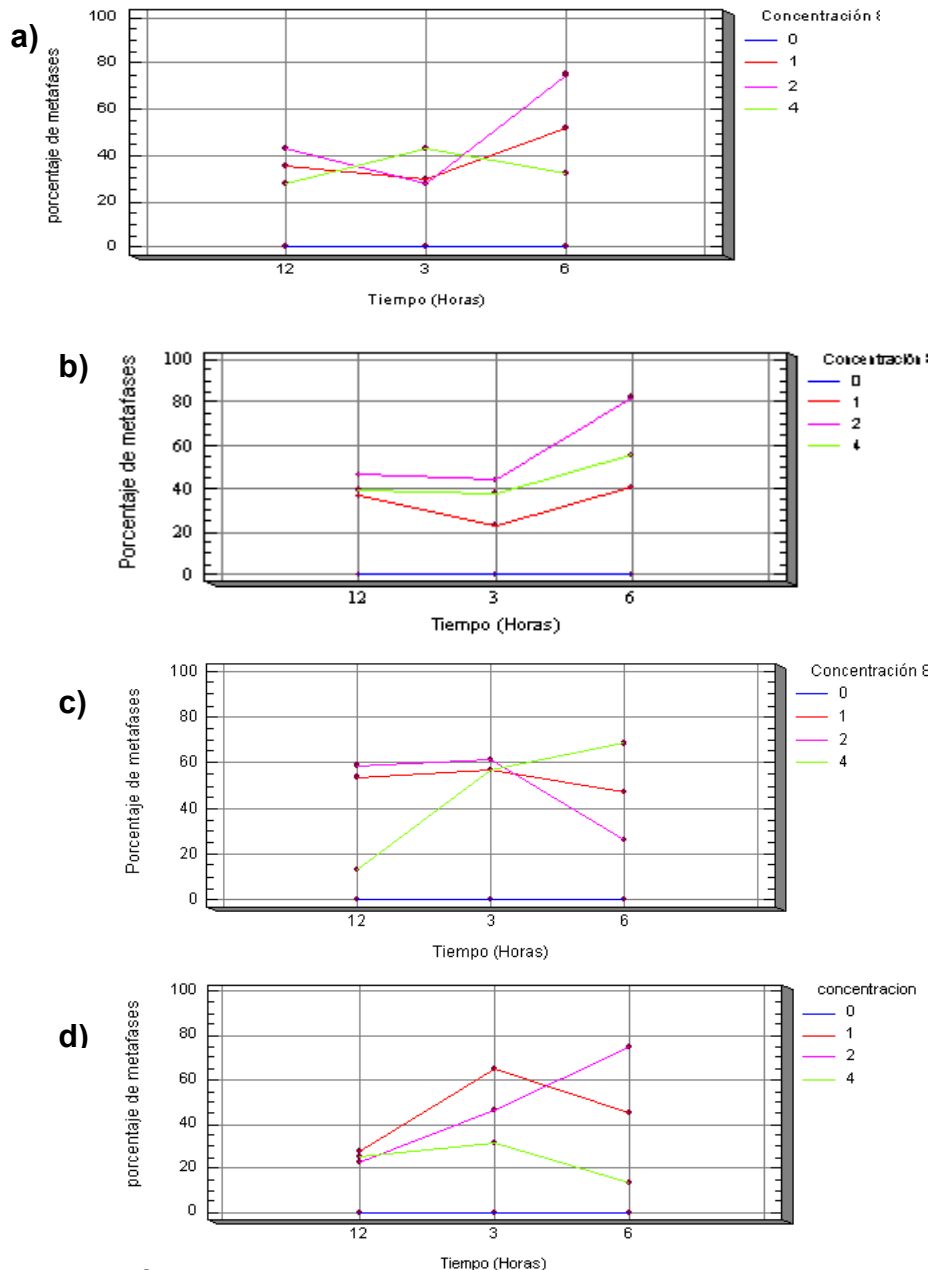


Figura 9. Influencia del tiempo de exposición a la 8-Hidroxiquinolina en el porcentaje de metafases en a) *Dioscorea alata*, b) *Dioscorea rotundata*, c) *Dioscorea trifida*, d) *Dioscorea cayennensis*.

El mejor tratamiento para detener las células en metafase para las especies *Dioscorea alata*, *Dioscorea rotundata* y *Dioscorea cayenensis* fue **T5** conformado por 8-hidroxiquinolina 2mM y un tiempo de exposición de 6 horas, con porcentajes de 75,19 %; 82,13 % y 74,86%, respectivamente (Tabla 3), esto concuerda con lo obtenido por Dansi *et al.*, (2000) quienes utilizaron este mismo pretratamiento para observar cromosomas en células de *Dioscorea alata* y en algunas especies del complejo *rotundata* – *cayenensis*; Gamiette *et al.*, (1999), quienes aplicaron esta misma concentración, pero con un tiempo de exposición menor, 5 horas, para realizar conteo cromosómico convencional en varias especies de *Dioscorea*

Para la especie *Dioscorea trifida*, el tratamiento mas adecuado fue **T6**, compuesto de 8-Hidroxiquinolina a una concentración de 4mM y un tiempo de exposición de 6 horas, con un valor de 68,29% (Tabla 3), esto no coincide con los resultados de Bousalem *et al.*, (2006), quienes utilizaron un pretratamiento compuesto por 8-Hidroxiquinolina 2 mM durante 8 horas.

Tabla 3. Resultados de la evaluación de los distintos tratamientos con 8-hidroxiquinolina.

Tratamientos	Tiempo (horas)	Hidroxiquinolina (mM)	(%) porcentaje de metafases			
			<i>alata</i>	<i>rotundata</i>	<i>cayennensis</i>	<i>trífida</i>
*T0		0	0	0	0	0
T1	3	1	29,61	23,21	64,84	57,08
T2		2	27,49	43,62	46,47	61,14
T3		4	43,48	38,08	31,34	57
T4	6	1	51,35	40,57	44,92	47,23
T5		2	75,19	82,13	74,86	26,30
T6		4	32,21	55,30	13,45	68,29
T7	12	1	35,15	36,92	28,31	53,57
T8		2	42,98	46,19	23,12	58,92
T9		4	27,77	39,32	25,42	13,23

Donde *T0 = Tratamiento control

5.4 NÚMERO, TAMAÑO Y MORFOLOGÍA CROMOSOMICA

5.4.1 *Dioscorea alata*

Esta especie presentó un número cromosómico somático $2n = 20$ (Figura 10a), en todos los individuos estudiados (Tabla 4). Esto concuerda con el reporte de Baquar (1980) quien obtuvo estos mismos resultados, aunque encontró otros niveles de ploidía. Pero no concuerda con los reportados por Dansi *et al.*, (2000, 2001) quienes encontraron que los individuos de esta especie, en Benin, Nigeria y Camerún presentaban un número cromosómico $2n = 40$; Gamiette *et al.*, (1999) determinaron niveles de ploidía de 4x, 6x y 8x mediante conteo cromosómico y citometría de flujo y

Hamon *et al.*, (1992) mediante citometría de flujo encontraron niveles de ploidía de 3x, 3,5x, 4,5x, 6x, 7x y 8,5x para dicha especie, en cuanto a estos resultados se puede decir que los diferentes niveles de ploidía mostrados por dichos autores están relacionados con las condiciones de propagación y cultivo, además del desconocimiento del estatus citológico y la carencia de estudios moleculares que apoyen las posibles causas de estos eventos a nivel cromosómico dentro del género.

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren la existencia de un número básico $x = 10$, para el clon de la variedad “pico de botella” perteneciente a la especie *Dioscorea alata* en la región Caribe colombiana, de igual manera se puede decir que este clon presenta una alta estabilidad cromosómica en el Banco de Germoplasma *in vitro* de la Universidad de Sucre, en comparación con clones *in vitro* de otras especies, como en el caso de los estudios realizados por Dansi *et al.*, (2000), en *D. rotundata* y *D. cayennensis* en Benin y Lauzer *et al.*, (1992), para *D. mangenotiana* y *D. abyssinica* en Costa de Marfil; los cuales reportan inestabilidad en el número cromosómico del germoplasma estudiado. Esto demuestra la gran adaptabilidad que ha presentado este clon para su multiplicación en condiciones *in vitro*.

Respecto a la morfología los cromosomas mostraron una apariencia redondeada, en los cuales la región centromérica no era visible, en algunos casos los cromosomas estaban agrupados dificultando el proceso de conteo. En cuanto al tamaño este osciló entre 0.65 y 1.3 μm (Tabla 4). Esto coincide con las afirmaciones hechas por Dansi *et al.*, (2000) y Gamiette *et al.*, (1999); sobre la tendencia de los cromosomas de *Dioscorea* a permanecer agrupados y presentar tamaño pequeño, haciendo tedioso el proceso de conteo, dificultando de esta manera la clasificación de acuerdo a la posición del centrómero.

5.4.2 *Dioscorea cayennensis* y *Dioscorea rotundata*

El número cromosómico mostrado por los individuos de las especies *D. cayennensis* y *D. rotundata* fue muy variado, encontrándose células con grados de ploidía 3x y 4x mostrando $2n = 30$, $2n = 38$, $2n = 40$ (Figura 11a, 11b y 11c) y, $2n = 20$, $2n = 30$ cromosomas respectivamente (Figura 10d y 10c), (Tabla 4); estos hallazgos, para el caso de *D. cayennensis*, están en concordancia con varios autores que reportan $2n = 40$ y otros números cromosómicos, tal es el caso de Baquar (1980), quien obtuvo números cromosómicos de 36 hasta 140; Gamiette *et al.*, (1999) encontró individuos con $2n = 40$ mediante citometría de flujo y conteo convencional y Dansi *et al.*, (2000) el cual reporta distintos niveles de ploidía para esta especie en Benin, donde resultaron un 90% y un 83,3% de individuos tetraploides, $2n = 40$, por conteo cromosómico y citometría de flujo respectivamente; y un 88, 8% de los 90 cultivares estudiados mostraron este mismo nivel de ploidía al ser analizados por ambos métodos. Para el caso de *D. rotundata* difieren enormemente con lo encontrado por los autores ya citados, quienes reportaron individuos tetraploides, hexaploides y octoploides, para esta especie; esta condición puede ser explicada por una posible endomitosis durante el crecimiento *in vitro* (Dansi *et al.*, 2000), puesto que el balance hormonal del medio de cultivo es crítico para el crecimiento celular y la estabilidad del genoma (Smulders *et al.*, 1995). También se plantea que la aparición y el grado de ploidía obtenido *in vitro*, puede ser el resultado de un equilibrio entre la constitución genética de la especie y la composición del medio de cultivo, estos resultados indicarían que la presión de selección del medio de cultivo puede llevar a la manifestación del control genético en el comportamiento de los cromosomas, de una manera diferencial según la especie (Chandra, 1980).

El tamaño de los cromosomas de *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* estuvo en un rango de 0,65 a 1,3 μm (Tabla 4), sin embargo no fue posible observar el centrómero; la morfología fue muy variada y en la mayoría de los individuos estuvo representada por una forma redondeada mientras que en otros era alargada.

De lo anterior se deduce que el número básico para *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* es $x = 10$, lo que concuerda con lo encontrado para los clones de Benin y Camerún, por Dansi *et al.*, (2000, 2001).

5.4.3 *Dioscorea trifida*

Para *Dioscorea trifida* se encontraron individuos con número básico de $X=10$ y número cromosómico $2n = 30$ (Figura 10b), todos los individuos investigados mostraron estos mismos números (Tabla 4), lo que demuestra un elevado grado de estabilidad cromosómica.

Estos resultados difieren de los expuestos por Bousalem *et al.*, (2006) quienes reportan octoploidia en individuos de esta especie con un número básico de $x = 20$ con $2n = 80$ cromosomas; Martín y Degras (1978) reportaron la existencia de clones con $2n = 18$, $2n = 36$ y $2n = 54$ cromosomas con un número básico $x = 9$, mientras que Essad (1984) reportó un número de $2n = 80$, pero con número básico $x = 10$ para especies proveniente de las islas del Caribe, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, todo esto pone de manifiesto el gran conflicto que se presenta al realizar estudios citológicos en esta especie

A diferencia de las especies anteriores el tamaño cromosómico en *D. trifida* fue variable en un rango de 0.65 a 2.6 μm (Tabla 4), siendo de las especies estudiadas la de mayor tamaño cromosómico; en el caso de la morfología esta presentó una apariencia redondeada.

El protocolo estandarizado y la información citológica de los clones de *Dioscorea* recopilada en este estudio abre campo para un mejor entendimiento de la genética del ñame, puesto que existen muchos procesos en este ámbito que no están claros hasta la fecha; la aplicación del protocolo facilitaría procesos como monitoreo del banco del germoplasma de ñame y verificación de la viabilidad de plantas regeneradas a través de embriogénesis indirecta; el hallazgo de clones altamente estables con respecto a número cromosómico, como *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida*, demuestra que estos son apropiados para procesos biotecnológicos como la producción de híbridos de importancia agronómica y la selección de variantes somaclonales; por otro lado, la existencia de individuos con diferentes números cromosómicos entre las especies *D. rotundata* y *cayennensis*, pone de manifiesto que se debe realizar un seguimiento más riguroso al proceso multiplicación *in vitro*, de igual manera esta información se puede usar como punto de partida para una identificación y clasificación taxonómica más precisa de las especies.

Tabla 4. Número y tamaño cromosómico en las especies de *Dioscorea* analizadas

		<i>D. alata</i>		<i>D. rotundata</i>		<i>D. cayennensis</i>		<i>D. trifida</i>	
Individuo / célula		Tamaño (μm)	N°	Tamaño (μm)	N°	Tamaño (μm)	N°	Tamaño (μm)	N°
1	1	0,65 – 1,3	20	0,65	20	1,0 – 1,3	40	0,65 – 1,3	30
	2	0,65 – 1,3	20	0,65	20	1,0 – 1,3	30	0,65 – 1,3	30
	3	0,65	20	0,65	20	1,0 – 1,3	30	1,3 – 1,95	30
	4	0,65	20	0,65	20	1,0 – 1,3	30	1,3	30
	5	0,65	20	0,65	30	0,65	40	1,3	30
2	1	0,65	20	0,65	30	0,65 – 1,3	40	1,3 - 2,6	30
	2	0,65	20	0,65	30	0,65	40	1,3	30
	3	0,65	20	1,3	30	0,65	40	1,3	30
	4	0,65	20	0,65-1,3	30	0,65	40	2,6	30
	5	0,65	20	0,65- 1,3	30	0,65	38	1,3	30
3	1	0,65	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	1,3	30
	2	0,65	20	0,65 – 1,3	20	0,65 – 1,3	38	0,65	30
	3	0,65	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	1,3	30
	4	0,65	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	0,65 -1,3	30
	5	0,65	20	0,65	30	0,65	40	1,3	30
4	1	0,65	20	0,65	30	0,65	40	0,65 -1,3	30
	2	0,65	20	0,65	20	0,65	40	1,3	30
	3	0,65	20	0,65	30	0,65	40	0,65	30
	4	0,65	20	0,65	30	0,65	40	1,3	30
	5	0,65	20	0,65	20	0,65	40	1,3	30
5	1	0,65	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	0,65 -1,3	30
	2	0,65	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	1,3	30
	3	0,65 – 1,3	20	0,65	30	0,65	38	1,3	30
	4	0,65	20	0,65	30	0,65	40	1,3	30
	5	0,65 – 1,3	20	0,65 – 1,3	30	0,65	40	0,65 – 1,3	30

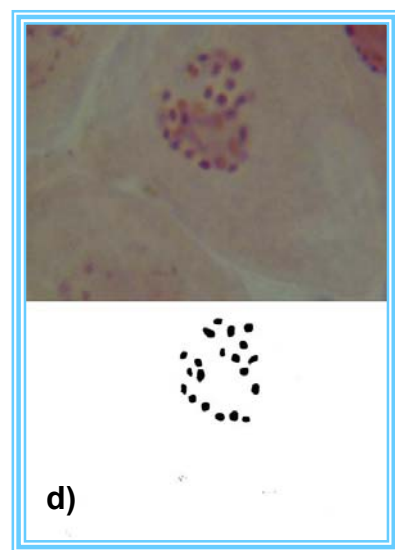
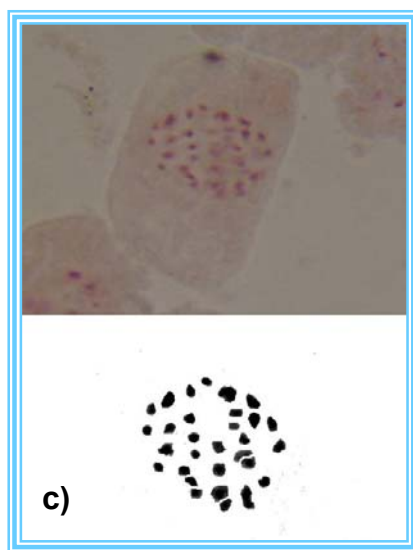
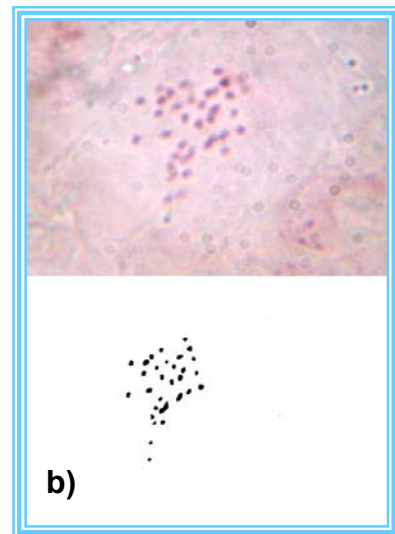
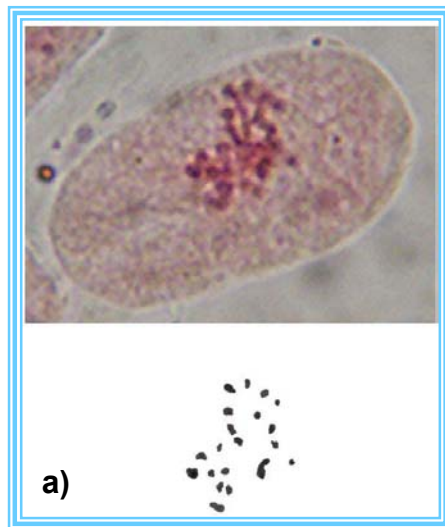


Figura 10. Células en metafase con cromosomas dispersos. a) *Dioscorea alata* ($2n = 20$), b) *Dioscorea trifida* ($2n = 30$), c) *D. rotundata* ($2n = 30$), d) *D. rotundata* ($2n = 20$).

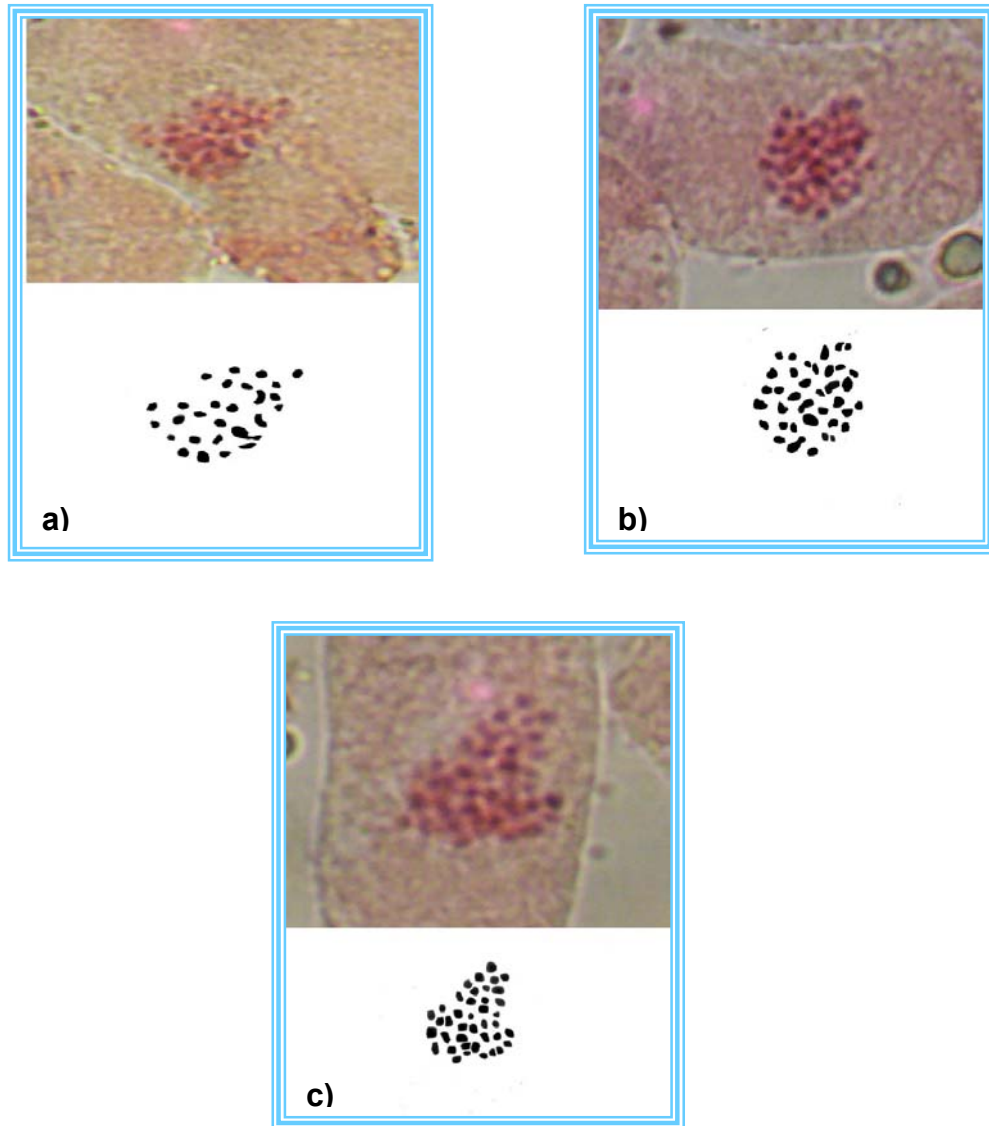


Figura 11. Células detenidas en metafase con cromosomas dispersos mostrando varios números cromosómicos en *Dioscorea cayennensis* a) $2n = 30$, b) $2n = 38$, c) $2n = 40$

6. CONCLUSIONES

- ❖ El mejor pretratamiento para obtener mayor porcentaje de células en metafase con cromosomas dispersos en *Dioscorea alata*, *D. rotundata* y *D. cayennensis* consistió en 8-hidroxiquinolina 2 milimolar durante 6 horas; mientras que para *D. trifida* fue 4 milimolar a un tiempo de exposición de 6 horas.
- ❖ La hidrólisis más efectiva para la degradación de la pared celular fue la combinación de HCl 5 normal con un tiempo de exposición de 90 minutos para todas las especies tratadas.
- ❖ El mejor colorante para la observación de los cromosomas resultó ser la aceto orceína al 2% durante 20 minutos.
- ❖ El número cromosómico básico encontrado para *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida* fue $x = 10$, con número diploide $2n = 20$, para *D. alata*, mostrando gran estabilidad cromosómica en todos los individuos analizados y $2n = 30$ en *Dioscorea trifida*, presentando clones triploides en todos los casos.
- ❖ Para las especies *Dioscorea rotundata* y *Dioscorea cayennensis* se encontró un número básico de $x = 10$, con dos números cromosómicos en los individuos de *D. rotundata*, $2n = 20$ y 30 cromosomas, mientras que en *Dioscorea cayennensis* se hallaron individuos con números cromosómicos de 30, 38 y 40; de lo que se deduce que estas especies presentan inestabilidad a nivel cromosómico cuando se cultivan en sistemas *in vitro*.

- ❖ La morfología de los cromosomas de las especies *Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. cayennensis* y *D. trifida* fue constante predominando la forma redondeada aunque también se observaron esporádicamente algunos cromosomas con forma alargada, sin evidenciarse la región centromérica y con tendencia a permanecer agrupados.

- ❖ El tamaño cromosómico osciló entre 0.65 y 1.3 μm para las cuatro especies; presentándose un mayor tamaño en *D. trifida* con cromosomas de 1.3 μm y los cromosomas más pequeños correspondieron a la especie *Dioscorea alata* con una longitud de 0.65 μm .

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar a través de citometría de flujo y conteo cromosómico el nivel de ploidía los clones del género *Dioscorea* presentes en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre.
- Realizar estudios de variabilidad genética dentro de la colección de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, utilizando marcadores moleculares para la selección de clones con mejores características citológicas los cuales podrían ser utilizados para propósitos de multiplicación y establecimiento en campo e implementación programas de mejoramiento genético.
- Evaluar el modo de acción de los reguladores del crecimiento sobre los posibles cambios en los números cromosómicos que se presentan en las especies *D. cayenensis* y *D. rotundata*.
- Implementar un programa de seguimiento a las plantas regeneradas con el fin de observar posibles cambios a nivel citológico que puedan incidir en la viabilidad y expresión de características agronómicas importantes

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABRAHAM, K. 1998. Occurrence of hexaploid males in *Dioscorea alata*. Euphytica Vol. 99, pp. 5-7. India.
- ACKERMAN, W. 1971. Genetic and cytological studies with *Camellia* and related genera. Agricultural Research Service U.S.D.A. Technical. Pp 79 - 83.
- ACOSTA, C. 1980. El Cultivo del Ñame *Dioscorea sp.* Editorial TOA. Bogotá, Colombia.
- ACOSTA, R y BELTRÁN, J. 2001. Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) mediante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.
- ALCORCÉS, N. 2001. Estudios cromosómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. Revista UDO Agrícola. Vol. 1. Pp 34 - 41
- ÁLVAREZ, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. Universidad de Córdoba. Montería. En: ñame: producción de semillas por biotecnología. Pp 33-39.
- ALZOLA, R. 2001. Guía de estudio: Técnicas histológicas. Curso de histología, embriología y teratología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos aires.

- AMMIRATO, P. 1984. Yams. En: Ammirato, P; Evans, D. Sharp, W. handbook of plant cell tissue and organ culture. Unit for advance propagation system. Department of horticulture, agriculture and environmental. University of London.
- ANDRAS, S; HARTMAN, T; MARSHALL, J; MARCHANT,R; POWER, J; COCKING, E; DAVEY, M. 1999. A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. Chromosome Research Vol 7. Pp 641 - 647.
- BAQUAR, S. 1980. Chromosome behaviour in Nigerian yams (*Dioscorea*). Genética Vol. 54. Pp 1 – 9. Disponible en: [http: www.springerlink.org](http://www.springerlink.org)
- BAEZA, C. 2006. Comunicación personal. Universidad de Concepción, Chile.
- BERGERVOET, J; VERHOEVEN, H; GILISSEN, L; BINO, R. 1996. High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. Plant Science Vol. 116. Pp 141 – 145.
- BINO, R; LANTERI, S; VERHOEVEN, H; KRAAK, H. 1993. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. Annals of Botany. Vol. 72. Pp 181-187.
- BLAS, R y GONZALES, R. 2004. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. En: raíces andinas contribuciones al conocimiento y a la capacitación. CIP (centro internacional de la papa). Lima, Perú.

- BOUSALEM, M; ARNAU, G; HOCHU, I; ARNOLIN, R; VIADER, V; SANTONI, S; DAVID, J. 2006. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscoreae*. Theor Appl Genet. Vol. 113. Pp 439 – 451.
- BROCHMAN, C y ELVEN, R. 1992. Ecological and genetic consequences of poliploidy in arctic *Draba* (*Brassicaceae*). Evolutionary trends in plants. Vol. 6. Pp 125 -134.
- BUARQUE, A; CARNEIRO, I; GUERRA, M. 2005. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of Selaginella (Pteridophyta). Annals of Botany. Vol. 95. Pp 271 – 276. disponible en: www.aob.oupjournals.org
- BUENO, M y RODRÍGUEZ, N. 2006. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (*Solanaceae*). Acta biológica colombiana. Vol. 11. n°2 Pp 75 - 85.
- BUENO, N. 2004. Estudio cromosómico de *Bomarea patinii* y *Bomarea caldasii*. Memorias del XXXVIII congreso nacional de ciencias biológicas. Ibagué.
- BURKILL, I. 1960. The organography and evolution of *Dioscoreaceae*, the family of the Yams. Journal of the Linnean Society. Bot. Vol 56. Pp 319 - 412.
- CAPONIO, I. 2001. Estudios citogenéticos de tres especies de *Digitaria* de la sección Trichachne. Revista de comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Argentina

- CARAVACA, J. 2004. Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos. Tesis de grado. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona.
- CHACON, G; SABORIO, F; GOMEZ, L.; TORRES, S; VALVERDE, R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía costarricense Vol. 24. Pp 57 - 62.
- CHANDRA, S. 1980. Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *Allium cepa*. Protoplasma. Vol. 17. Pp 1 – 6.
- CHIARINI, F. 2005. El cariotipo de *Ennealophus fimbriatus* (Iridaceae). Arnaldoa. Vol. 12. Pp 48 - 52
- CHONG, S y OZIAS-AKINS. 1992. Rapid stimation of ploidy levels *in vitro* regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. Euphytica. Vol. 64. Pp 183 - 188.
- COSTICH, D; ORTIZ, R; MEAGLER, T; BREDERTE, L. 1993. Determination of ploidy levels and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. Teorical and applied genetics. Vol. 86. Pp 1001-1006.
- DANSI, A; PILLAY, M; MIGNOUNA, H; DAINOU, O; MONDEIL, F; MOUTAÏROU, K. 2000. Ploidy levels of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis* / *Dioscorea rotundata* complex) from Benin Republic as determined by chromosome counting and flow cytometry. En: African crop science journal. Vol. 8 N^a 4. Pp 355 - 364.

- _____; ZOK, S. 2001. Ploidy variation in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*-*Dioscorea rotundata* complex) from Cameroon as determined by flow cytometry. *Euphytica*. Vol. 119. Pp 301 – 307.
- DE CARVALHO, R y GUERRA, M. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas*. Vol. 136. Pp 159–168.
- DEMATTEIS, M. 2001. Números cromosómicos y cariotipos de varias especies de la subsección *Macrocephalae* del género *Vernonia* (*Vernonieae*, *Asteraceae*). *Revista de comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*. Argentina.
- DE ROCHER, E; HARKINS, K; GALBRAITH, D; BOHNERT, H. 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science*. Vol 250. Pp 99 - 101.
- DE WET, J. 1980. Origins of polyploids in Lewis WH (Ed) poliploidy biological relevance. Plenum press: New York and London
- DRETS, M. 2002. Una saga citogenética: el descubrimiento de los métodos de bandeado. Significado y proyección bio-médica. Revisión. *Revista médica de Uruguay*. Vol. 18. Pp 107-121.
- EGESI, C; PILLAY, M; ASIEDU, R; EGUNJOBI, J. 2002. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. Germoplasm. *Euphytica*. Vol. 128. Pp 225 – 230.

- ESSAD, S. 1984. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploidie dans le genre *Dioscorea* à propos du dénombrement des espèces *transversa* Brown, *pilosiuscula* Bert et *trífida*. *Agronomie*. Vol. 4. Pp 611 - 617
- EVANS, L. 1993. *Crop evolution adaptation and yield*. Cambridge University Press. Great Britain.
- FLORES, S; FLORES, I; ROMERO, S; ROJAS, C; RUBIO, L. 2006. Análisis cariológico de ocho especies de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en México. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Vol. 63. Pp 245 - 250.
- GAMIETTE, F; BAKRY, F; ANO, G. 1999. Ploidy determination of some yam species (*Dioscorea spp.*) by flow cytometry and conventional chromosomes counting. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Vol. 46. Pp 19 – 27.
- GORNALL, R y WENTWORTH, J. 1993. Variation in the chromosome number in *Pamasia palustris* L. in the British Isles. *New Phytologist*. Vol. 123. Pp 383 - 388.
- GUERRA, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*. Vol. 71. Pp 234 – 241.
- GUERRA, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 23. Pp 1029 – 1041.

- GUEVARA, M; SILES, M; BRACAMONTE, O. 2000. Análisis cariotípico de *capsicum pubescens* (solanaceae) "rocoto". Revista Peruana de Biología Vol.7. Nº 2.
- HAHN, S. 1995. Yams *Dioscorea spp.* (Dioscoreaceae) in Smartt J. Y Simmonds NW. Editors. Evolution of Crop Plants. Second Edition. Longman Scientific and Technical. U.K. Pp 112 - 120.
- HAMON, P; BRIZARD, J; ZOUNDJIHEKPON, J; DUPERRAY, C; BERGE, A. 1992. Etude des index d'ADN de huit especes d'ignames (*Dioscorea spp*) par cytometrie en flux. Can J Bot . Vol. 70. Pp 996-1000.
- HAYIRLIOGLU, S y BEYAZOGLU, O. 2000. Chromosome numbers in species of *Alchemilla ser. Elatae* (Rosaceae) in Turkey. ann. Bot. Fennici. Vol. 37. Pp 173 - 182.
- HILU, K. 1993. Poliploidy and the evolution of domesticated plants. American Journal of botany. Vol. 80. Pp 1494-1499.
- KOWLES, R; YERK, G; HAAS, K; PHILLIPS, R. 1997. Maternal effects influencing DNA endoreduplication in developing endosperm of *Zea mays*. Genome. Vol. 40. Pp 798 – 805.
- KRESS, H. 1996. Polytene chromosomes: a general model for the eucaryotic interphase state. International Journal of Insect Morphology and Embryology Vol. 25. Pp 63 – 91.

- KUDO, N y KIMURA, Y. 2001. Flow cytometric evidence for endopolyploidization in cabbage (*Brassica oleracea* L.) flowers. Sexual Plant Reproduction. Vol. 13. Pp 279 – 283.
- KÜPFER, P y YUAN, Y. 1996. Karyological studies on *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* (*Gentianaceae*) from China. Plant Systematics and Evolution. Vol. 200. Pp 161- 176.
- LAUZER, D; LAUBLIN, G; VINCENT, G; CAPPADOCIA, M. 1992. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica hoch* and *Dioscorea mangenotiana miege*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 28. Pp 215 - 223.
- LAVIA, G y FERNÁNDEZ, A. 2001. Caracterización cromosómica de germoplasma de maníes silvestres pertenecientes a las secciones *Extranervosae*, *Heteranthae* y *Arachis*. Revista de comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- LEITCH, I y BENNET, M. 1997. Polyploidy in angiosperms. Trends in plant science. Vol. 2. Pp 470 - 476.
- LEVAN, A y MÜNTZING, A. 1991. Terminology of chromosome numbers. In: Tsuchiya T. and Gupta PK [eds.], Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, 15 – 26. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- LEWIS, W. 1980. Poliploidy biological relevance. Plenum press: New York and London.

- LILLO, M. 2007. Preparaciones microscópicas. En: cátedra de genética. Universidad Nacional de Tucumán. Disponible en: www.geneticafcnat.com.ar/practicos/prep_mic.html
- LÓPEZ, J. 1999. Tendencias evolutivas en la variación cromosómica y morfofisiológica de *Dioscorea remotiflora* kunth y *D. remotiflora* var. *maculata* Uline (Dioscoreaceae) bajo selección artificial. Tesis de doctorado en ciencias agrícolas y forestales. Universidad de Colima, México.
- MAJUMDAR, S; BANERJEE, S; KUMAR DE, K. 2004. Meiotic behaviour of chromosomes in PMCs and karyotype of *Trifolium repens* L. From Darjeeling Himalaya. Acta biológica cracoviensia. Series botánica. Vol. 46. Pp 217 – 220.
- MARASEK, A y ORLIKOWSKA, T. 2003. karyology of nine lily genotypes. Acta biológica cracoviensia. Series Botánica. Vol. 45. Pp 159 – 168.
- MARCON, A; BARROS, I; GUERRA, M. 2003. A karyotype comparison between two closely related *Acrostichum* L. (Pteridaceae) species. American Fern Journal. Vol. 93. Pp 116 – 125.
- MARTIN, F y DEGRAS, L. 1978. Tropical yams and their potencial. Par 6 Minor cultivated *Dioscorea* species. Agricultural handbook n° 538. anonymous science and education administration, US department of agriculture (USDA) and USAID. Pp 23.
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for poliploidy in majority of angiosperms. Science. Vol. 264. Pp 421 - 424.

- McVAUGH, R. 1989. Flora novogaliciana. Vol: 15 (*Bromeliaceae* to *Dioscoreaceae*). The University of Michigan Herbarium.
- MELARAGNO, J; MEHROTRA, B; COLEMAN, A. 1993. Relation ship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. Plant Cell Genética. Vol. 54. Pp 1661 – 1668.
- MENENDEZ, A; DA SILVA, R; RIOS, L; XENA, N. 2000. Mitotics aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv catimor) leaf explants and their derived embriogenic calli. Acta Biológica Venezolana. Vol. 9. Pp 12 -16
- MERCADO, P y DELGADO, A. 2000. Cytogenetics studies in *Phaseolus* L (Fabaceae). Gent. Mol.biol (online). Vol 23 N° 4. Pp 985 - 987.
- MISHIMA, M; OHMIDO, N; FUKUI, K; YAHARA, T. 2002. Trends in site number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). Chromosome. Vol. 110. Pp 550 – 558.
- MONTALDO, A. 1983. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. San José. Costa Rica. Pp 284.
- MORA, F. 2005. Comparación del cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalix*. Agricultura técnica. Vol. 65. N° 1. Pp 20 – 25.
- MOSCONE, E; LOIDL, J; EHRENDORFER, F; HUNZIKER, A. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. American Journal of Botany. Vol. 82. Pp 276 – 287.

- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. Pp 473 - 497.
- MURRAY, B; DE LANGE, P; FERGUSON, A. 2005. Nuclear DNA variation, chromosome numbers and polyploidy in the endemic and indigenous grass flora of New Zealand. *Annals of Botany*. Vol. 96. Pp 1293 – 1305.
- NAGL, W. 1969. Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. *Nature*. Vol. 221. Pp 70 – 71.
- NARANJO, C y POGGIO, L. 2004. Citogenética. En: biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte II, Cáp. 5. INTA. Buenos aires, Argentina.
- NOHALES, G. 2002. Estudio del ADN nuclear mediante citometría de imagen en los tumores vesicales superficiales. Su valor predictivo con respecto a la recidiva tumoral. Tesis de doctorado en Biología molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.
- PANZERA, F; PANZERA, Y; PÉREZ, R. 2006. Mitosis. Sección Genética Evolutiva Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Disponible en: www.genetica.fcien.edu.uy/general.htm
- PARDUE, M. 1994. Looking at polytene chromosomes. *Methods in Cell Biology*. Vol. 44. Pp 333 – 351.

- PEREA, M y BUITRAGO, G. 2000. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo del ñame. En: Ñame: Producción de semillas por biotecnología. Pp 17-32.
- PEREZ, W y BRUN, A. 2003. Aplicación de la técnica *in vitro* para la propagación de *Dioscorea cayenensis* Cv “ñame amarillo” a partir de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.
- PINTO, C. 2006. Cytogenetics of coffee. Minireview. Braz. J. Plant Physiol. Vol. 18. Pp 37 - 44.
- POGGIO, L; MUDRY, M; PAPESCHI, A; MOLA, L. 2006. Guía de trabajos prácticos de citogenética. Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
- PRZYWARA, L; KUTA, E; KLOS, J. 2003. Kariology of *Plagiomnium*. II. *Plagiomnium undulatum* (hedw) T. Kop. Acta biológica cracoviensia. Series botánica. Vol. 45. Pp 105 - 110.
- RAN, Y; MURRAY, B; HAMMETT, K. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and in situ hybridization. Euphytica. Vol. 106. Pp 139 – 147.
- RIEGER, R; MICHAELIS, A; GREEN M. 1991. Glossary of genetics: classical and molecular. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- RODRÍGUEZ, C y BELTRAN, J. 2002. Cultivo in Vitro de ñame (*Dioscorea alata*) Cv “pico de botella” a partir de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.
- SANCHEZ, C y HERNANDEZ, L. 2005. Descripción de aspectos productivos, de postcosecha y comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. Centro de investigación turipaná. CORPOICA.
- SCARCELLI, N; DAÏNOU, O; AGBLANGA, C; TOSTANI, S; PHAM, J. 2005. Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* (2n = 40). Theor Appl Genet. Vol. 111. Pp 226 – 232.
- SCHWEIZER, D y AMBROS, P. 1994. Chromosome banding. In: Gosden JR, ed. Methods in molecular Biology. Vol. 29. Pp 97 – 112.
- SESEK, P; KUMP, B; BOHANEK, B. 2005. Interphase structure of endoreduplicated nuclei in diploid and tetraploid *Brassica oleracea* L. Acta biológica cracoviensia. Series botánica. Vol. 47. Pp 93 – 99.
- SHARMA, A y DE DEEPESH, N. 1957. Poliploidy in *Dioscorea*. Genética. Vol. 28. Pp 112 - 120.
- SMULDERS, M; RUS-KORTEKAAS, W; GILISSEN, L. 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. Plant Science Limerick. Vol. 97. Pp 53 – 60.

_____ ; VOSMAN, B. 1995. Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet.* Vol. 91. Pp 57 – 64.

- SOLÍS, N; VIVIANA, G; FERNÁNDEZ, A. 2005. Evidencias citológicas del origen autoploiploide del complejo *Turnera sidoides* (Turneraceae). *Revista de comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste.* Argentina.
- STEBBINS, G. 1985. Poliploidy, hibridization, and the invasion of new habitats. *Annals of missouri botanical garden.* Vol. 72. Pp 824 – 832.
- TALLEDO, D y ESCOBAR, C. 2004. Genética de las células somáticas de raíces y tuberosas andinas. En: *Raíces andinas-contribuciones al conocimiento y a la capacitación.* Centro internacional de la papa (CIP) Lima, Perú.
- TAPIA, F. 2004. Estudio cromosómico en tres especies de *Karwinskia* (Rhamnaceae) endémicas de México. *Anales del instituto de Biología, Universidad nacional autónoma de México. Serie Botánica.* Vol. 75. Pp 1 – 10.
- THERMAN, E. 1995. Chromosome behaviour in cell differentiation: a field ripe for exploration?. *Genetics.* Vol 141. Pp 799 – 804.
- THOMPSON, J y LUMARET, R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in ecology and evolution.* Vol. 7. Pp 302 - 306.

- TRAAS, J; HÜLSKAMP, M; GENDREAU, E; HÖFTE, H. 1998. Endoreduplication and development: rule without dividing? Current Opinion in Plant Biology. Vol. 1. Pp 498 – 503.
- TWYFORD, C y MANTELL, S. 1996. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the greater yam. Plant cell tissue and organ culture. Unit for advance propagation system. Department of horticulture, agriculture and environment. University of London.
- United States Department of Agriculture. USDA. 2007. Natural Resources Conservation Service. Plants database.
- ZAMORA, L. 1993. Del barbasco a la progesterona en: la investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaria de Salud, México.

ANEXOS

Anexo 1. Medio de multiplicación para *Dioscorea alata*

Componente	Concentración
Sales MS	100%
mioinositol	0.1 g/L
Tiamina HCl	1 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
Carbón activado	1g/L
ANA	0.5 mg/L
BAP	4 mg/L
pH	5.7 – 5.8

Anexo 2. Medio de multiplicación para *Dioscorea rotundata*

Componente	Concentración
Sales MS	100%
Mioinositol	0.1 g/L
Tiamina HCl	1 mg/L
sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
Carbón activado	1g/L
ANA	0.1mg/L
BAP	0.3mg/L
pH	5.7 – 5.8

Anexo 3 Medio de multiplicación para *Dioscorea trifida*

Componente	Concentración
Sales MS	100%
Mioinositol	0.1 g/L
Tiamina HCl	0.5 mg/L
Sacarosa	40 g/L
Agar	7 g/L
Carbón activado	1g/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina	0.5 mg/L
pH	5.9

Anexo 4. Medio de multiplicación para *Dioscorea cayennensis*

Componente	Concentración
Sales MS	100 %
Mioinositol	0.1 g/L
Tiamina HCl	0.1 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
Carbón activado	1g/L
Acido nicotínico	0.5 mg/L
BAP	1.2 mg/L
Nitrato de amonio	800 mg/L
Piridoxina	0.5 mg/L
Glicina	2 mg/L
L - cisteína	20 mg/L
Ácido ascórbico	20 mg/L
pH	5.7 – 5.8

Anexo 5. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en *Dioscorea alata*.

Fuente de variación	Gl	SC	CM	Cociente F	Valor P
Concentración A	3	12055,3	4018,47	*63,13	0,0000
Tiempo B	2	1551,77	775,885	*13,35	0,0001
Interacción (AB)	6	3160,3	526,717	*9,06	0,0000
Residuos	24	1395,05	58,1273		
Total (corregido)	35	18162,5			

Anexo 6. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Tiempo	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
3	12	25,1458	2,2009	X
12	12	26,4767	2,2009	X
6	12	39,6908	2,2009	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
12 - 3	1,33083	7,77538
12 - 6	* 13,2142	7,77538
3 - 6	*14,545	7,77538

*Indican una diferencia significativa

Anexo 7. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor concentración

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Concentración	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
0	9	0,0	2,54138	X
4	9	34,49	2,54138	X
1	9	38,7056	2,54138	XX
2	9	48,5556	2,54138	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
0 – 1	*38,7056	9,91711
0 – 2	*48,5556	9,91711
0 – 4	*34,49	9,91711
1 – 2	9,85	9,91711
1 - 4	4,21	9,91711
2 - 4	*14,0656	9,91711

*Indica una diferencia significativa

Anexo 8. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en *Dioscorea trifida*.

Fuente de variación	Gl	SC	CM	Cociente F	Valor P
Concentración A	3	16527,0	5506,98	*131,45	0,0000
Tiempo B	2	955,818	477,909	*11,40	0,0003
Interacción (AB)	6	6550,32	1091,72	*26,05	0,0000
Residuos	24	1005,81	41,9067		
Total (corregido)	35	25038,9			

Anexo 9. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor concentración

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Concentración	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
0	9	0,0	2,1579	X
4	9	46,1756	2,1579	X
2	9	48,7878	2,1579	X
1	9	52,7278	2,1579	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
0 – 1	*52,6278	8,42067
0 – 2	*48,7878	8,42067
0 – 4	*46,1756	8,42067
1 – 2	3,84	8,42067
1 - 4	6,45222	8,42067
2 - 4	2,61222	8,42067

* indica diferencia significativa

Anexo 10. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Tiempo	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
12	12	31,4333	1,86879	X
6	12	35,455	1,86879	X
3	12	43,085	1,86879	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
12 – 3	*12,3717	6,60212
12 – 6	4,02167	6,60212
3 – 6	*8,35	6,60212

*Indica diferencia significativa

Anexo 11. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en *Dioscorea cayennensis*.

Fuente de variación	Gl	SC	CM	Cociente F	Valor P
Concentración A	3	13756,6	4585,53	*129,25	0,0000
Tiempo B	2	1898,97	949,486	*26,76	0,0000
Interacción (AB)	6	4635,04	772,507	*21,77	0,0000
Residuos	24	854,474	35,4781		
Total (corregido)	35	21142,1			

Anexo 12. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases para el factor concentración.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Concentración	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
0	9	0	1,98545	X
4	9	23,4078	1,98545	X
1	9	46,03	1,98545	X
2	9	48,1573	1,98545	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
0 – 1	*46,03	7,74774
0 – 2	*48,1533	7,74774
0 – 4	*23,4078	7,74774
1 – 2	2,12333	7,74774
1 – 4	*22,6222	7,74774
2 – 4	*24,7456	7,74774

*indica diferencia significativa

Anexo 13. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Tiempo	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
12	12	19,2167	1,71945	X
6	12	33,3125	1,71945	X
3	12	35,6642	1,71945	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
12 – 3	*16,4475	6,07452
12 – 6	*14,0958	6,07452
3 – 6	2,35167	6,07452

* indica una diferencia significativa

Anexo 14. Análisis de varianza para el porcentaje de metafases con cromosomas dispersos en *Dioscorea rotundata*.

Fuente de variación	Gl	SC	CM	Cociente F	Valor P
Concentración A	3	16238,8	5412,97	*71,09	0,0000
Tiempo B	2	2185,06	1092,54	*14,35	0,0001
Interacción (AB)	6	1653,22	275,536	*3,62	0,0107
Residuos	24	1827,36	76,1401		
Total (corregido)	35	21904,5			

Anexo 15. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases para el factor concentración.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Concentración	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
0	9	0	2,90861	X
1	9	33,5689	2,90861	X
4	9	44,2356	2,90861	X
2	9	57,3144	2,90861	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
0 – 1	*33,5689	11,3502
0 – 2	*57,3144	11,3502
0 – 4	*44,2356	11,3502
1 – 2	*23,7456	11,3502
1 – 4	10,6667	11,3502
2 – 4	*13,0789	11,3502

* indica diferencia significativa

Anexo 16. Contraste de rangos múltiples para porcentaje de metafases con cromosomas dispersos para el factor tiempo.

Porcentaje HSD de Tukey 5%

Tiempo	Recuento	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
3	12	26,2275	2,51893	X
12	12	30,6083	2,51893	X
6	12	44,5033	2,51893	X

Contraste	Diferencias	+/- Limites
12 – 3	4,38063	8,89894
12 – 6	*13,895	8,89894
3 – 6	*18,2758	8,89894

* indica una diferencia significativa