

Estudios citogenéticos en cuatro taxones de *Canna* (Cannaceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina

Graciela E. González¹, María de las Mercedes Ciciarelli² y Cristina H. Roller²

Recibido: 16 noviembre 2016 / Aceptado: 10 febrero 2017

Resumen. Se investigaron los números cromosómicos y los cariotipos de tres especies y un híbrido del género *Canna*, que crecen en la Argentina y también se encuentran distribuidos en el neotrópico. Mediante una tinción cromosómica convencional se analizaron *C. indica*, *C. fuchsina*, *C. coccinea* y el híbrido *C. x generalis*. Todos los taxones estudiados resultaron diploides ($2n = 18$). Las tres especies presentaron cariotipos similares simétricos, con cromosomas pequeños, mayormente metacéntricos aunque con algunos pares cromosómicos submetacéntricos. En *C. coccinea* y *C. fuchsina*, y por primera vez en el género, se aplicó la técnica de bandeo fluorescente DAPI sobre interfases y metafases mitóticas, con el objetivo de detectar regiones de heterocromatina constitutiva rica en Adenina-Timina (A-T). Los resultados obtenidos permitieron el reconocimiento de pares cromosómicos y demostraron la utilidad de este método para detectar la variación interespecífica en la distribución cromosómica de la heterocromatina rica en A-T en *Canna*. Se sugiere que el material estudiado de *C. x generalis* es un diploide en el que el $2n = 18$ no contradice la hipótesis sobre su origen, ya que el número hallado coincide con el de uno de los progenitores, *C. indica*, y con el que se conoce para otras especies parentales.

Palabras clave: Número cromosómico; cariotipo; bandeo cromosómico DAPI.

[en] Cytogenetic studies in four taxa of *Canna* (Cannaceae) from Buenos Aires province, Argentina

Abstract. Chromosome numbers and karyotypes of three species and a hybrid of the genus *Canna* growing in Argentina, and also distributed in the Neotrópico, were investigated here. Chromosome counts were performed in *C. indica*, *C. fuchsina*, *C. coccinea* and the hybrid *C. x generalis* with the conventional chromosomal stain techniques. All studied taxa proved to be diploid ($2n = 18$). Three species showed similar symmetric karyotypes, with mainly metacentric small and short chromosomes, though some submetacentric chromosome pairs were observed. Fluorescent DAPI chromosome banding technique was applied on interphases and mitotic metaphases of *C. coccinea* and *C. fuchsina*, this procedure for the first time in the genus, with the aim to detect the presence of regions of constitutive heterochromatin rich in Adenine-Thymine (A-T). The results obtained allowed the recognition of chromosomal pairs and demonstrated the usefulness of this method to detecting the interspecific variation in the chromosomal distribution of A-T rich heterochromatin in *Canna*. The diploid number $2n=18$ found in the studied material of *C. x generalis* does not contradicts the hypothesis on its origin, since this chromosome count coincide with the present in one of the progenitors, *C. indica*, and is also known for other parental species.

Keywords: Chromosome numbers; karyotypes; chromosome DAPI banding.

Cómo citar: González, G. E.; Ciciarelli, M. M. y Roller, C. H. (2017). Estudios citogenéticos en cuatro taxones de *Canna* (Cannaceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Bot. complut.* 41: 93-98.

Introducción

Las Cannaceae Juss. (Zingiberales Grisebach) son originarias de América tropical y subtropical y se distribuyen desde el sur de Estados

Unidos y México hasta el norte y centro de Argentina (Ciciarelli 1989). Las especies que se citan para Europa, Micronesia, Melanesia, Polinesia, África y Asia han derivado de plantas, rizomas o semillas que fueron llevadas desde

¹ Departamento de Ecología, Genética y Evolución (LACYE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
Autor correspondencia. E-mail: mamilila@yahoo.com

el neotrópico; muchas de las cuales se naturalizaron volviéndose incluso invasivas (Ciciarelli 2015).

Tanaka & Koyama (2000) y Tanaka (2001, 2008) realizaron análisis morfológicos y moleculares y reconocieron unas 20 especies silvestres del género. En la Argentina crecen unas 16 especies (Ciciarelli & Roller 2008, Ciciarelli et al. 2010a,b; Passarelli et al. 2014). En la provincia de Buenos Aires y en gran parte de la Argentina, tanto especies como híbridos de *Canna* crecen cultivadas en jardines, plazas o, escapadas del cultivo, en el borde de los caminos. El valor ornamental de estas plantas ha conducido a su hibridación y así numerosos taxones carecen de semillas y se reproducen vegetativamente por medio de rizomas (Ciciarelli et al. 2010a). El rasgo más conspicuo de los híbridos es la presencia de estaminodios anchos, reflejos, de colores diversos como amarillo moteado de anaranjado o pardo, anaranjado, rosado, colorado o púrpura. Bailey (1949) los incluyó sub *C. x generalis* Bailey (presencia de pétalos erguidos) o sub *C. x orchioides* Bailey (presencia de pétalos reflejos). Estudios genéticos previos consideraron a algunos de estos taxones como diploides desinápticos estériles o alotriploides (Khoshoob & Mukherjee 1970). Ciciarelli & Passarelli (2015) señalaron que la viabilidad del polen era elevada (82,5%) en la especie silvestre parental *C. warscewiczii*, mientras que muy baja (4,5%) en un híbrido del grupo *C. x orchioides*.

Los recuentos cromosómicos de Mahanty (1970) propusieron para *Canna* un número básico de $x=9$, que sería derivado de un tipo ancestral con $x=11$, presente en otras familias de Zingiberales. Tanaka et al. (2009) estudiaron el número cromosómico y el cariotipo de 22 taxones de *Canna*, y señalaron que casi todas las especies del género son diploides, con un $2n=18$, con excepción de *C. discolor* que es triploide, con un $2n=27$. La relevancia de los estudios citológicos radica en el hecho que los números cromosómicos y los caracteres cariotípicos de un organismo son la expresión fenotípica más inmediata del genoma, independientes de efectos externos que puedan distorsionarlos, por lo que su conocimiento es importante para encarar estudios sistemáticos y filogenéticos (Guerra 2015). A pesar de que las características cariotípicas de un grupo de especies relacionadas son generalmente consistentes, frecuentemente ocurren variaciones estructurales en el número, tamaño y localización de los bloques de hete-

rocromatina constitutiva que pueden producir cambios en el tamaño y la simetría de los cromosomas (Poggio et al. 2010). Por lo tanto, el estudio de la distribución cromosómica de la heterocromatina constitutiva es uno de los aspectos importantes al abordar un análisis citogenético. Por ello resulta de gran utilidad la técnica de bandeado fluorescente con DAPI que permite identificar regiones cromosómicas constituidas por secuencias de ADN altamente repetido rico en Adenina-Timina (A-T), las cuales se observan como bandas DAPI-positivas o DAPI+ (Sumner 1990).

En la mayoría de los estudios citológicos realizados en *Canna* se determinaron los números cromosómicos (Offerrijns 1936, Roy & De 1965, Mahanty 1970, Segeren & Maas 1971, Tanaka 2001, Chen et al. 2003), aunque en sólo uno se analizaron características cariotípicas (Tanaka et al. 2009) y en ninguno se estudió la distribución de la heterocromatina sobre los cromosomas. Por lo tanto, no se conoce la utilidad del bandeado DAPI en el análisis cariotípico de las especies de *Canna*.

Con el objeto de avanzar en el conocimiento de la citología del género, se estudiaron los números cromosómicos y las características cariotípicas de tres especies silvestres bonaerenses y de un híbrido: *C. indica*, *C. fuchsina*, *C. coccinea* y *C. x generalis*, empleando técnicas de tinción cromosómica convencional. Se aplicó bandeado fluorescente DAPI sobre metafases mitóticas de *C. coccinea* y *C. fuchsina* para detectar bloques de heterocromatina constitutiva que permitan identificar pares de cromosomas y conocer la potencialidad de esta metodología en la caracterización citogenética de los taxones de *Canna*.

Material y Métodos

Se recolectaron rizomas de *C. indica*, *C. fuchsina*, *C. coccinea* y *C. x generalis* en humedales de la provincia de Buenos Aires (Argentina). El material de referencia se encuentra depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (LP) y se cita a continuación:

Canna indica L. ARGENTINA. Buenos Aires: La Plata: City Bell, Arroyo Rodríguez, Ciciarelli 43 (LP); Calle 473 e/ 23 y 24, Ciciarelli 44 (LP); Ringuet, 511 y 23, Ciciarelli 45 (LP).

Canna fuchsina Ciciar. ARGENTINA. Buenos Aires: La Plata: Gonnet, Camino Belgrano e/ 507 y 508, Ciciarelli 44 (LP); City Bell,

Calle 20 y 475, Ciciarelli 45 (LP); Pellegrini e/ 5 y 6, Ciciarelli 46 (LP).

Canna coccinea Mill. ARGENTINA. Buenos Aires: La Plata: City Bell, 18 casi Güemes; Ciciarelli 40 (LP); Ringuelet, 526 esq. 10, Ciciarelli 41 (LP); Ensenada: Isla Santiago, Ciciarelli 42 (LP).

Canna x generalis Bailey. ARGENTINA. Buenos Aires: La Plata: Gonnet, Camino Belgrano y 488, con estaminodios anchos, reflejos amarillos, moteados de anaranjado. Ciciarelli 47 (LP); Ringuelet, 512 y 22 bis; Ciciarelli 48 (LP).

Los rizomas se colocaron en condiciones de hidroponía, las raíces adventicias se pre-trataron con 8-hidroxiquinoleína (0.002 M) por 3 h a temperatura ambiente, se fijaron en una solución de alcohol etílico absoluto-ácido acético (3:1) y se conservaron en etanol 70% a 4 °C. Para la realización de las preparaciones cromosómicas los ápices radiculares se lavaron en solución McIlvaine (ácido cítrico-citrato de sodio, 0.01M) y se trataron con una solución enzimática de 2% de celulasa (Onozuka R10, Merck) y 20% de pectinasa (SIGMA P4716) durante 20 min a 37 °C. Para los recuentos cromosómicos y estudios cariotípicos se aplastaron los ápices radiculares sobre portaobjetos conteniendo una gota de hematoxilina acética (2%). En microscopio óptico de luz directa se estudiaron y fotografiaron al menos 15 placas metafásicas por cada individuo analizado.

Para los bandeos fluorescentes con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) se aplicó el protocolo de Sumner (1990). Se aplastaron los ápices radiculares de *C. coccinea* y *C. fuchsina* sobre portaobjetos con una gota de ácido acético (45%). Las preparaciones se tiñeron con 100 µL de DAPI (1 µg mL⁻¹ en solución McIlvaine) por 30 min, se lavaron en 4 x SSC (Saline-Sodium Citrate) y se montaron con una gota de Vectashield (Vector). Luego se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Axiophot, Carl Zeiss) y se fotografiaron con una cámara digital (CCD, Leica). Las imágenes se integraron con Adobe Photoshop CS2 v9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA).

Sobre las imágenes digitalizadas se midieron los parámetros cariotípicos empleando Micro-Measure 3.3 (<http://www.colostate.edu/depts/biology/micromeasure>). Se determinaron las fórmulas cariotípicas estimando el largo relativo de los cromosomas y los índices centroméricos (IC=longitud brazo corto / longitud brazo largo + longitud brazo corto) de cada par cromosómico. La nomenclatura cromosómica empleada fue la propuesta por Levan et al. (1964).

Resultados y Discusión

Los recuentos cromosómicos mostraron que las especies analizadas son diploides, con $2n=18$ cromosomas (Fig. 1), en concordancia con lo reportado previamente tanto para estas especies procedentes de otras localidades como para otras especies del género (Offerijns 1936, Roy & De 1965, Mahanty 1970, Segeren & Maas 1971, Tanaka 2001, Chen et al. 2003, Tanaka et al. 2009).

Los cromosomas son de tamaño pequeño (1-2,7 µm) con variación gradual. La morfología cromosómica es similar entre las especies estudiadas, con cromosomas mayormente metacéntricos (m), ya que presentan IC entre 0,49 y 0,40. Además, se observó un par cromosómico submetacéntrico-subtelocéntrico (sm-st), con IC promedio menor a 0,375. Por lo tanto, los cariotipos son simétricos. Estos resultados coinciden con trabajos mencionados anteriormente y sugieren la uniformidad del número cromosómico en el género *Canna*.

C. indica posee una fórmula cariotípica de $8m+1sm-st$, donde el par sm-st (IC: 0,33) mide 1,75 µm (Fig. 1A). En *C. fuchsina* y *C. x generalis*, $2n=18$ (Fig. 1C), el bajo número de células en metafase y el reducido tamaño cromosómico no permitieron determinar sus fórmulas cariotípicas. Los numerosos taxones que incluye el grupo *C. x generalis* proceden de cruzamientos entre *C. indica* y *C. glauca*, y entre *C. iridiflora* y *C. warscewiczii*, y han sido considerados diploides desinápticos estériles o alotriploides (Khoshoo & Mukherjee 1970). El número cromosómico del material de *C. x generalis* analizado aquí no entra en contradicción con la hipótesis de su origen, ya que *C. indica*, uno de los padres presuntos, muestra el mismo número cromosómico, que es igual al reportado para las demás especies progenitoras (Tanaka et al. 2009). El material de *C. x generalis* aquí estudiado es un híbrido estéril, que no forma semillas a la madurez; si bien se forman óvulos en el ovario estos no aumentan de tamaño y no se desarrollan y es posible que la viabilidad baja registrada por Ciciarelli & Passarelli (2015) para híbridos del grupo *C. x orchoides* también se presente aquí. En consecuencia, el resultado aquí obtenido en el material de *C. x generalis* procedente de humedales bonaerenses, no contradice la idea de Khoshoo & Mukherjee (1970), aunque resta corroborar esta propuesta mediante futuros estudios de comportamiento meiótico.

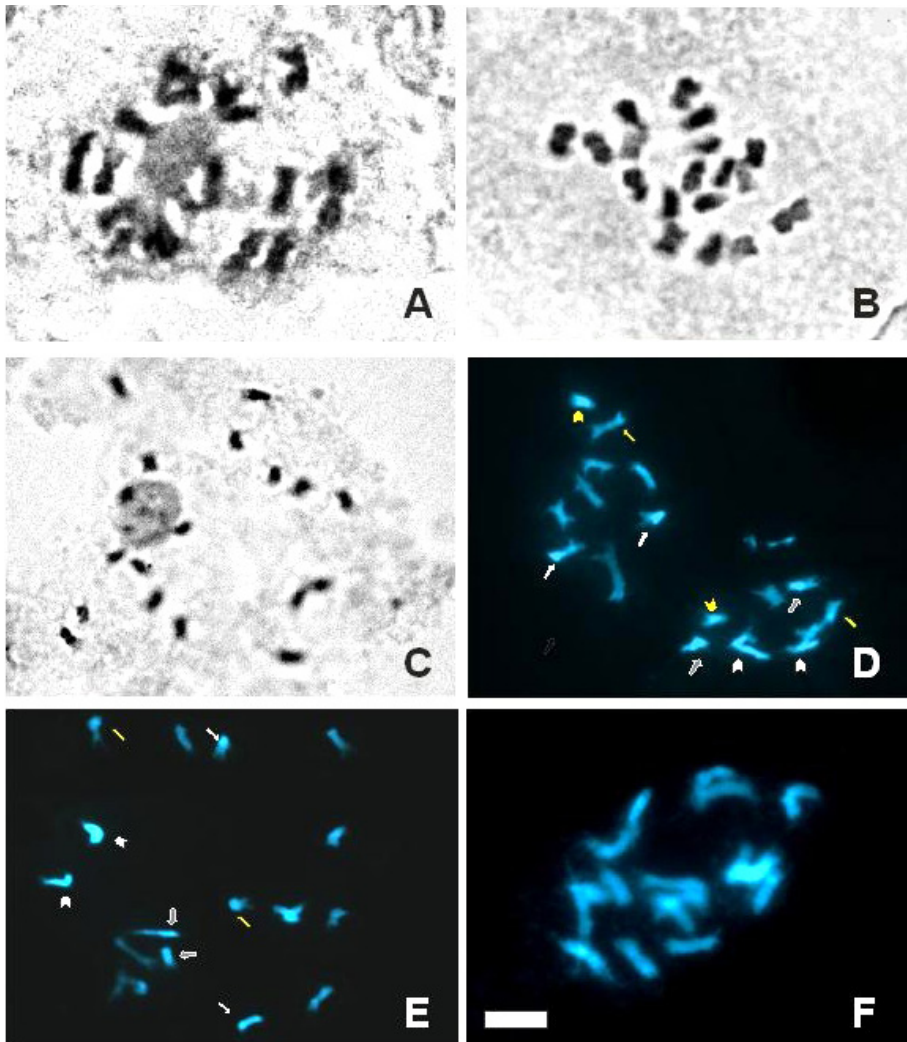


Figura 1. Citología de especies e híbridos de *Canna*. **A:** Metafase mitótica de *C. indica*. **B:** metafase mitótica de *C. coccinea*. **C:** metafase mitótica de *C. x generalis*. **D-F:** patrón de bandeo DAPI en *C. coccinea*. **D y E:** metafases mitóticas. **F:** pro-metafase mitótica. Las flechas blancas señalan un par de cromosomas con una banda telomérica, las flechas amarillas indican un par cromosómico con una banda pequeña subteloamérica, las puntas de flecha blancas señalan un par cromosómico con una banda que conforma casi todo el cromosoma, las puntas de flecha amarillas indican un par cromosómico con una banda pericentromérica y las flechas grises marcan a un par cromosómico con una banda que constituye casi todo un brazo del cromosoma. Barra: 5 µm.

C. coccinea posee una fórmula cariotípica de $8m+1sm-st$, donde el par $sm-st$ (IC: 0,35) mide $1,95 \mu m$ (Fig. 1B). Para esta especie, Tanaka et al. (2009) reportaron un par cromosómico subteloecéntrico (st) en lugar del par $sm-st$ observado en el material analizado aquí. Las diferencias cariotípicas observadas entre ambos materiales, provenientes de regiones distintas de la Argentina, podrían atribuirse a diferencias en la localización cromosómica de bloques de heterocromatina constitutiva (Gueira 2000, Poggio et al. 2010).

El bandeo fluorescente DAPI sobre células mitóticas de *C. coccinea* y *C. fuchsina* fue positivo. Los resultados permitieron confirmar el número cromosómico de ambas especies. En núcleos interfásicos y en los primeros estados de la mitosis se detectaron bloques de heterocromatina rica en A-T, como bandas DAPI+. En los estados metafásicos de *C. coccinea* se identificaron 5 pares de cromosomas con bloques heterocromáticos: un par con una banda telomérica en un brazo, un par con una banda subteloamérica en un brazo, un par con una banda que consti-

tuye gran parte del cromosoma, un par con una banda que conforma todo un brazo y un par con una banda pericentromérica (Fig. 1D y E). Esto coincide con el número de bloques heterocromáticos DAPI+ que se observan en las células pre-metafásicas donde los cromosomas están menos condensados (Fig. 1F). Si bien en *C. fuchsina* el bajo número de células en metafase y el tamaño cromosómico pequeño no permitieron aún la identificación de pares cromosómicos, en células pre-metafásicas se observó un menor número de bandas DAPI+ que el revelado en *C. coccinea*. Esto sugiere que, a pesar de la similitud en la morfología cariotípica de las especies de *Canna*, el bandeo DAPI podría detectar la variación interespecífica en la distribución cromosómica de la heterocromátina e identificar pares cromosómicos. Este método permitirá avanzar con la caracterización citogenética de estas especies ya que ha dado buenos resultados en una amplia variedad de géneros tales como *Zea* L. (González & Poggio 2011, González et al. 2013, Fourastié 2015), *Citrus* L. (Guerra 1993), *Crotalaria* L. (Mondin et al. 2007) y *Opuntia* Mill. (Realini et al. 2014), entre otros.

Se puede resumir que en este trabajo se confirman y/o dan a conocer los números cromosómicos y caracteres cariotípicos de tres especies y un híbrido: *C. indica*, *C. fuchsina*, *C. coccinea* y *C. x generalis*, todos diploides ($2n = 18$), con cromosomas pequeños y cariotipos simétricos. Los resultados de la técnica de bandeo DAPI, obtenidos por primera vez en el género, demuestran la utilidad de esta metodología en futuros estudios citotaxonómicos y de caracterización cariotípica de las especies de *Canna*.

Agradecimientos

Este trabajo es parte de un proyecto acreditado del Programa de Incentivos para Docentes Investigadores de la Universidad Nacional de Las Plata (PI 11/N 697). Las autoras agradecen a la Dra. Lilian Passarelli, Subdirectora del Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), por la lectura crítica de este manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Bailey, L.H. 1949. Manual of cultivated plants most commonly grown in the continental United States and Canada. MacMillan, Nueva York.
- Chen, R.Y., Song, W.Q., Li, X.L., Li, M.X., Liang, G.L. & Chen, C.B. 2003. Chromosome atlas of major economic plants genome in China, vol. 3: Chromosome Atlas of garden flowering plants in China. Science Press, Beijing.
- Ciciarelli, M.M. 1989. Las *Cannaceae* Link argentinas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Argentina.
- Ciciarelli, M.M. 2015. *Canna tandilensis* Ciciar. (Cannaceae-Zingiberales), una especie nueva para Argentina. *Bot. Complut.* 39: 87-96.
- Ciciarelli, M.M. & Rolleri, C.H. 2008. Morfología, taxonomía y caracterización de siete especies neotropicales del género *Canna* (Cannaceae). *Bot. Complut.* 32: 157-184.
- Ciciarelli, M.M., Rolleri, C.H. & González Duboux, M.C. 2010a. *Canna fuchsina*, una especie nueva para la ciencia, sus relaciones con otras especies silvestres del género y con el grupo *C. x generalis* (Cannaceae-Zingiberales). *Bot. Complut.* 34: 49-55.
- Ciciarelli, M.M., Passarelli, L.M. & Rolleri, C.H. 2010b. Morfología del polen en especies de *Canna* (Cannaceae-Zingiberales) y su implicancia sistemática. *Rev. Biol. Trop.* 58(1): 63-59.
- Ciciarelli, M.M. & Passarelli, L.M. 2015. Estudios palinológicos en especies de *Canna* L. (Cannaceae-Zingiberales) e híbridos relacionados. XXI Simposio de Paleobotánica y Palinología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. Resúmenes: 90.
- Fourastié, M.F. 2015. Estudios citogenéticos en razas de maíz del NOA: caracterización cariotípica, evaluación del tamaño del genoma y frecuencia de cromosomas B. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- González, G.E. & Poggio, L. 2011. Karyotype of *Zea luxurians* and *Zea mays* ssp. *mays* using DAPI/FISH and meiotic behavior of hybrids. *Genome* 54(1): 26-32.

- González, G. E., Fourastié, M.F. & Poggio, L. 2013. Número y composición de secuencias de los knobs (DAPI-FISH) y su utilidad en la caracterización de accesiones de maíz y teocintle. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 36(2):127-135.
- Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71:234-271
- Guerra, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23(4): 1029-1041.
- Guerra, M. 2015. Citotaxonomía: erros e acertos. Actas de 4ª Reunión Brasileira de Citogenética. Atibaia, São Paulo, Brasil.
- Levan, A., Fredga, K. & Sanberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 205-220.
- Khoshoo, T.N. & Mukherjee, I. 1970. Genetic-evolutionary studies on cultivated cannas. *Theor. App. Genet.* 40(5): 204-217.
- Mahanty, H.K. 1970. A cytological study of the Zingiberales with special reference to their taxonomy. *Cytologia* 35: 13-49.
- Mondin, M., Santos-Serejo, J.A. & Aguiar-Perecin, M.L.R. 2007. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. *Genet. Mol. Biol.* 30: 65-72.
- Offerijns, F.I.M. 1936. Meiosis in the pollen mother cells of some Cannas. *Genetica* 18:1-60.
- Passarelli, L.M., Roller, C.H., Ciciarelli, M.M., Dedomenici, A.C. & González, G.E. 2014. Flora vascular de humedales permanentes y transitorios bonaerenses (Buenos Aires, Argentina). *Bot. Complut.* 38: 139-154.
- Poggio, L., González, G.E., Ferrari, M.R., García, A.M., Wulff, A., Greizerstein, E., Tomás, P. & Schrauf, G. 2010. Citogenética. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Parte 5(1). En: G. Levitus et al.: 379-388. Ediciones INTA.
- Realini, M.F., Gottlieb, A.M., Font, F., Picca, P.I., Poggio, L. & González, G.E. 2014. Cytogenetic characterization of southern South American species of *Opuntia* (Cactaceae-Opuntioideae). *Succulent Plant Research* 8: 31-49. Recent studies in the Opuntioideae. Ed. David Hunt.
- Roy, A.K. & De, D.N. 1965. Cytological studies on *Canna generalis* Bailey. *Bull. Bot. Soc. Bengal* 19: 18-22.
- Segeren, W. & Maas, P.J.M. 1971. The genus *Canna* in northern South America. *Acta Bot. Neerl.* 20: 663-680.
- Sumner, A.T. 1990. Chromosome banding. London: Unwind Hyman.
- Tanaka, N. 2001. Taxonomic revision of the family Cannaceae in the New World and Asia. *Makinoa New Series* 1: 1-75.
- Tanaka, N. 2008. A new species of the genus *Canna* (Cannaceae) from eastern Honduras. *J. Japan. Bot.* 83: 7-10.
- Tanaka, N. & Koyama, T. 2000. A new species of *Canna* (Cannaceae) from Northern Argentina. *J. Japan. Bot.* 75: 89-91.
- Tanaka, N., Uchiyama, H., Matoba, H. & Koyama, T. 2009. Karyological analysis of the genus *Canna* (Cannaceae). *Plant Syst. Evol.* 280: 45-51.