

Estudios cromosómicos en *Acmella bellidioides* (Sm.) R.K.Jansen (Asteraceae) del nordeste de Argentina

Chromosomal studies in *Acmella bellidioides* (Sm.) R.K.Jansen (Asteraceae) from north-east Argentina

PATRICIA M. AGUILERA^{1,2}, ANA I. HONFI¹ & JULIO R. DAVIÑA¹

¹Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal (PEFyGV), Universidad Nacional de Misiones, Rivadavia 2370, 3300 Posadas, Misiones, Argentina.

²Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Universidad Nacional del Nordeste, C.C. 209, 3400 Corrientes, Argentina.

ahonfi@invs.unam.edu.ar

RESUMEN

Acmella bellidioides es una hierba perenne pequeña, que crece naturalmente en las provincias del nordeste de Argentina, en Brasil, Paraguay y Uruguay. Pertenece a la sección *Megaglottis*, presenta número cromosómico gamético $n = 13$ y exhibe un amplio rango de variación morfológica que ha hecho difícil separarla de especies muy cercanas de la misma sección. *Acmella bellidioides* fue coleccionada en campos abiertos, de suelo arenoso y rocoso y se aplicaron técnicas citogenéticas convencionales para analizar sus cromosomas en mitosis, su comportamiento en la microsporogénesis y para confeccionar su cariotipo. *Acmella bellidioides* es diploide con $2n = 2x = 26$ cromosomas de tamaño pequeño (2,22 - 4,01 μm) y 39,25 $\mu\text{m}/\text{genoma}$. Su cariotipo, $12m + 10sm + 4st$, es unimodal ($A_2 = 0,16 / R = 1,80$) y levemente asimétrico ($A_1 = 0,42 / i = 35,88 / r > 2 = 0,54 / AI = 3,69$) (Categoría 3A de Stebbins). El par 9 (*sm*) presenta un macrosatélite terminal y constricción secundaria en el brazo corto. La microsporogénesis es normal y produce polen viable (>90%). El comportamiento meiótico es regular. En CMP en diacinesis y metafase I se observan 13 bivalentes. Éste es el primer estudio cariotípico en *Acmella*. Nuestro registro de $2n = 2x = 26$ cromosomas coincide con el número básico $x = 13$ propuesto para el género y para *Megaglottis*, la sección más ancestral. Por lo tanto, ésta es la descripción del cariotipo básico de *Acmella*.

PALABRAS CLAVE: Cariotipo, microsporogénesis, comportamiento meiótico.

ABSTRACT

Acmella bellidioides is a perennial small herb that naturally grows in north-east Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. The species belongs to section *Megaglottis* and it has a chromosome number of $n = 13$. It exhibits a wide range of morphological variation that has created difficult in distinguishing it from closely related species of this section. *Acmella bellidioides* was collected in open fields with sandy and stony soils. Classical cytogenetic techniques were applied to analyze chromosomes at mitosis, examine behavior during microsporogenesis, and determine its karyotype. *Acmella bellidioides* is diploid with $2n = 2x = 26$ small size chromosomes (2.22 - 4.01 μm) and 39.25 $\mu\text{m}/\text{genome}$. Its karyotype, $12m + 10sm + 4st$ is unimodal ($A_2 = 0.16 / R = 1.80$) and slightly asymmetrical ($A_1 = 0.42 / i = 35.88 / r > 2 = 0.54 / AI = 3.69$) (3A Stebbins category). Chromosome pair No. 9 (*sm*) has a terminal macrosatellite in the short arm. Microsporogenesis is normal and produces viable pollen grains (>90%). Meiotic behavior is regular. In PMC at diakinesis and metaphase I, 13 bivalents were observed. This is the first karyotypic study in *Acmella*. Our record of $2n = 2x = 26$ chromosomes agrees with the basic number $x = 13$ proposed for the genus and for section *Megaglottis*, regarded as most ancestral. This might be regarded, therefore, as the basic karyotypic description for *Acmella*.

KEYWORDS: Karyotype, microsporogenesis, meiotic behavior.

INTRODUCCIÓN

Acmella Rich. es un género de hierbas anuales y perennes, con distribución pantropical. Citológicamente se conocen

los números cromosómicos de 27 de las 30 especies y 9 variedades de *Acmella* (Jansen 1985a). Todos los taxones, excepto dos, presentan números cromosómicos de $n = 13$

o múltiplo de 13. Las dos excepciones poseen $n = 12$ y 24 y probablemente se originaron por reducción aneuploide (Jansen 1985a). El género presenta tres secciones: *Acmella*, *Annuae* y *Megaglottis* (Jansen 1985b).

Acmella fue tratado como parte de *Spilanthes* Jacquin, pero luego las evidencias morfológicas y cromosómicas permitieron reconocer a estos dos géneros como diferentes (Jansen 1985b).

El número cromosómico básico para *Acmella* ha sido muy discutido. Turner *et al.* (1967) reportan $n = ca. 26$ para *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron., aceptan como número monobásico $x = 13$ y definen su postura frente a otros autores que, para especies de *Spilanthes*, citan $n = 7$ y $n = 12$. Keil & Stuessy (1975) confirman el número básico $x = 13$ para *Acmella* y los recuentos cromosómicos de Jansen & Stuessy (1980) concuerdan con la propuesta de $x = 12$ ó 13. Jansen (1985a) concluye que $x = 13$ es el número básico de *Acmella* ya que todos los taxones, excepto dos de ellos, presentan números cromosómicos de $n = 13$ o múltiplos de 13. Adicionalmente, todas las especies de *Megaglottis*, la sección más ancestral, son parte de una serie euploide basada en $x = 13$.

Acmella está representado en el NE de Argentina por 10 especies (Sáenz 2008) y para cada una de ellas, excepto para *A. psilocarpa* R.K.Jansen, existen antecedentes de recuentos cromosómicos (Jansen 1985b), pero no se han descripto sus cariotipos.

Acmella bellidioides (Smith) R.K.Jansen es una hierba perenne pequeña que crece naturalmente en las provincias del NE de Argentina (Misiones, Corrientes, Chaco, Entre Ríos), así como en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Santiago del Estero y en los países limítrofes Brasil, Paraguay y Uruguay. Se la encuentra en suelos arenosos secos o húmedos, arcillosos, pedregosos y especialmente en praderas donde florece profusamente, de julio a abril (Jansen 1985b). *A. bellidioides* pertenece a la sección *Megaglottis* (Jansen 1985b), posee $n = 13$ cromosomas (Turner *et al.* 1979, Jansen 1985a, 1985b) y una variación morfológica muy notable, considerando que se trata de una especie diploide (Jansen 1985b).

El presente trabajo describe por primera vez el cariotipo de una especie dentro del género *Acmella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acmella bellidioides fue coleccionada en Argentina, Provincia de Misiones, Departamento Capital, Posadas, en campos abiertos, de suelo arenoso y rocoso, con pasturas y terreno algo modificado (27° 23' 42" S; 55° 57' 45" W / 27° 24' 17" S; 55° 54' 56" W), 200 m, 10/04/2006 Honfi 1300, 11/05/2007 Honfi 1321, 4/11/2006 Aguilera 11 (MNES). Su identificación taxonómica fue realizada con métodos clásicos de análisis morfológico comparativo utilizando claves *ad hoc*.

El análisis mitótico se realizó en meristemas apicales de raicillas en crecimiento activo tratadas previamente con solución saturada de 1-bromonaftaleno por 3 horas a temperatura de laboratorio, fijadas en etanol absoluto : ácido acético glacial (3:1) durante al menos 12 horas a temperatura de laboratorio. Las raicillas fueron coloreadas siguiendo la técnica de Feulgen (hidrólisis ácida en HCl 1N durante 10 min. a 60 °C y tinción con reactivo de Schiff) y se maceraron en una gota de orceína acética al 2% con posterior aplastado.

El análisis meiótico se llevó a cabo en botones florales jóvenes fijados en etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) y las anteras fueron coloreadas con carmín acético al 2%. Las estimaciones de bivalentes por célula se realizaron en 30 células madres del polen (CMP) en diacinesis o metafase I. La viabilidad del polen se estimó sobre 1.300 granos coloreados con carmín glicerina.

Para la descripción del cariotipo, los cromosomas fueron agrupados de acuerdo al índice centromérico y la nomenclatura empleada fue la propuesta por Levan *et al.* (1964). Los satélites fueron clasificados según Battaglia (1955). Al menos 10 metafases óptimas fueron usadas para la confección del idiograma. La medición de la longitud de los brazos cromosómicos y satélites se realizó mediante dibujos en cámara clara (x2600). La asimetría cariotípica fue estimada calculando las categorías de Stebbins (1971), los índices A_1 y A_2 de Romero Zarco (1986) y el índice AI de Paszko (2006).

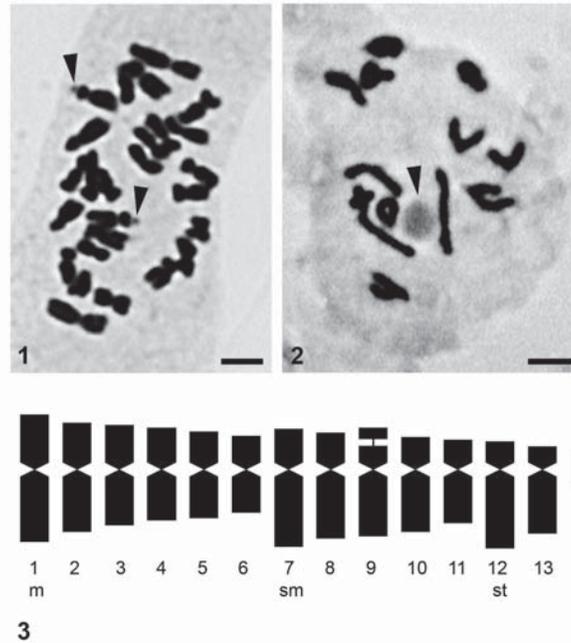
RESULTADOS

Acmella bellidioides es diploide con $2n = 2x = 26$ cromosomas (Fig. 1) y su cariotipo está compuesto por 12 cromosomas metacéntricos, 10 submetacéntricos y 4 subtelocéntricos ($12 m + 10 sm + 4 st$) (Tablas I, II; Fig. 3). El par cromosómico 9 (*sm*) presenta un macrosatélite terminal en el brazo corto y constricción secundaria (Fig. 3). Solamente en el 20 % de las metafases analizadas se presentaron ambos satélites del par visibles. En las células restantes se observaron 1 (30 %) o ningún satélite visible (50 %). La longitud total del complemento cromosómico es de 78,50 μm (39,25 μm por genoma). La longitud de los cromosomas varía entre 4,01 μm y 2,22 μm (ambos cromosomas *m*) y el promedio de los valores de este parámetro es de 3,02 μm , hecho que evidencia el tamaño pequeño de los cromosomas (Tabla II). El cariotipo de *A. bellidioides* es unimodal debido a la uniformidad respecto a la longitud cromosómica, característica que se evidencia con los índices A_2 (0,16) y R (1,80) (Tabla II). El índice centromérico medio i es de 35,88 (Tabla II), debido a que la mayoría de los cromosomas de *A. bellidioides* son *sm* o *st*. Los índices de asimetría intracromosómica A_1 (0,42) y $r > 2$ (0,54) (Tabla II) denotan la asimetría del cariotipo que, además, pertenece a la categoría 3A de Stebbins (1971).

El índice de asimetría de Paszko (2006) (AI) es de 3,69 e indica heterogeneidad cariotípica (Tabla II).

La microsporogénesis de *A. bellidioides* es normal y el comportamiento meiótico regular. El número gamético es $n = 13$. Se analizaron células madre del polen (CMP) en diacinesis y metafase I donde se observaron regularmente

13 II (Fig. 2). El promedio de bivalentes por CMP es de 12,6 y su presencia varía de 9 a 13 bivalentes. Ocasionalmente se observaron hasta 2 cuadrivalentes en una frecuencia de 0,2 IV por CMP (Tabla III). La viabilidad de los granos de polen fue elevada (94,93%).



FIGURAS 1-3. *Acmella bellidioides*. 1. Cromosomas somáticos en metafase mitótica $2n = 2x = 26$. Las puntas de flechas indican los macrosatélites. 2. Célula madre del polen en diacinesis con 13 bivalentes. La punta de flecha indica el nucléolo. Escala = $2 \mu\text{m}$. 3. Idiograma de *A. bellidioides* ($6 m + 5 sm + 2 st$). Escala = $1 \mu\text{m}$.

FIGURES 1-3. *Acmella bellidioides*. 1. Somatic chromosomes at mitotic metaphase $2n = 2x = 26$. The arrowheads indicate the macrosatellites. 2. Pollen mother cell at diakinesis with 13 bivalents. The arrowhead indicates the nucleolus. Scale = $2 \mu\text{m}$. 3. Idiogram of *A. bellidioides* ($6 m + 5 sm + 2 st$). Scale = $1 \mu\text{m}$.

TABLA I. Parámetros morfométricos de los cromosomas de *Acmella bellidioides*.

TABLE I. Morphometrical parameters of the chromosomes of *Acmella bellidioides*.

Par	s (μm) \pm ES	l (μm) \pm ES	c (μm) \pm ES	i	L. R. %	Tipo
1	1,71 \pm 0,10	2,30 \pm 0,10	4,01 \pm 0,19	42,64	10,22	m
2	1,41 \pm 0,08	1,96 \pm 0,09	3,37 \pm 0,16	41,83	8,58	m
3	1,34 \pm 0,07	1,71 \pm 0,06	3,05 \pm 0,12	43,93	7,77	m
4	1,25 \pm 0,05	1,54 \pm 0,08	2,79 \pm 0,13	44,80	7,11	m
5	1,10 \pm 0,05	1,45 \pm 0,05	2,55 \pm 0,10	43,13	6,50	m
6	0,95 \pm 0,05	1,27 \pm 0,09	2,22 \pm 0,13	42,79	5,66	m
7	1,20 \pm 0,06	2,48 \pm 0,13	3,68 \pm 0,20	32,60	9,37	sm
8	1,07 \pm 0,05	2,19 \pm 0,11	3,26 \pm 0,17	32,82	8,31	sm
9	1,00 \pm 0,05	2,11 \pm 0,11	3,11 \pm 0,16	32,15	7,92	sm sat
10	0,91 \pm 0,04	1,96 \pm 0,11	2,87 \pm 0,15	31,70	7,31	sm
11	0,80 \pm 0,04	1,64 \pm 0,09	2,44 \pm 0,13	32,78	6,22	sm
12	0,76 \pm 0,04	2,54 \pm 0,16	3,30 \pm 0,21	23,03	8,41	st
13	0,58 \pm 0,02	2,02 \pm 0,09	2,60 \pm 0,10	22,30	6,62	st

Longitud media del brazo corto (s); longitud media del brazo largo (l); longitud cromosómica total media (c); índice centromérico medio (i); longitud cromosómica relativa (LR); error estándar (ES). / (s) mean short arm length; (l) mean long arm length; (c) mean chromosome length; (i) mean centromeric index; (LR) relative chromosome length; (ES) standard error.

TABLA II. Síntesis de parámetros cariotípicos de *Acmella bellidioides*.

TABLE II. Synthesis of karyotype parameters of *Acmella bellidioides*.

$2n$	26
x	13
Fórmula cariotípica	$12 m + 10 sm + 4 st$
LTC	$78,50 \mu m$
ES LTC	$0,13 \mu m$
S LTC	$0,48 \mu m$
c	$3,02 \mu m$
c máx	$4,01 \mu m$
c mín	$2,22 \mu m$
i	35,88
A_1	0,42
A_2	0,16
R	1,80
$r > 2$	0,54
AI	3,69
Categoría de Stebbins	3A

Longitud total del complemento (LTC); error estándar y varianza de la longitud total del complemento (ES LTC, S LTC); longitud cromosómica media (c); longitud cromosómica máxima y mínima (c máx, c mín); índice centromérico medio (i); índices de asimetría intra e intercromosómica (A_1 , A_2); relación entre la longitud del par mayor y menor del complemento (R); proporción de pares cromosómicos con relación entre brazos >2 ($r > 2$); índice de asimetría de Paszko (AI). / (LTC) total complement length, (c) mean chromosome length; (c max, c min) maximum and minimum chromosome length; (i) mean centromeric index; (A_1 , A_2) intrachromosomal and interchromosomal asymmetry indexes; (R) largest/smallest chromosome ratio; ($r > 2$) proportion of chromosome pairs with arm ratio >2 ; (AI) Paszko asymmetry index.

TABLA III. Análisis del comportamiento meiótico de *Acmella bellidioides*.

TABLE III. Analysis of meiotic behavior in *Acmella bellidioides*.

	$2n$	CMP	Asociaciones cromosómicas	
			II	IV
<i>A. bellidioides</i>	26	30	12,6 (9 – 13)	0,2 (0 – 2)

Células madre del polen analizadas (CMP); bivalentes (II); cuadrivalentes (IV). / (CMP) Pollen mother cells analyzed; (II) bivalents; (IV) quadrivalents.

DISCUSIÓN

Acmella bellidioides es una de las 10 especies del género que habitan el NE argentino. Hasta el momento, de las 6 especies de *Acmella* presentes en Misiones, habían sido analizadas sólo dos procedencias, ambas con 13 II en meiosis masculina y se trata de *A. leptophylla* (DC.) R.K.Jansen (Salto Tabay) y *A. serratifolia* R.K.Jansen (Iguazú) (Jansen 1985b), ambas de la misma sección *Megaglottis* que *A. bellidioides*. En la provincia de Misiones, *A. bellidioides* fue registrada en los departamentos de Guaraní y San Martín. Este es el primer estudio que se realiza en poblaciones del S de la provincia.

Las mismas son cercanas también a las poblaciones ya estudiadas del N de la provincia de Corrientes.

Nuestro registro de $2n = 2x = 26$ cromosomas para *A. bellidioides* concuerda con los guarismos hallados previamente. Turner *et al.* (1979) reportaron $n = 13$ para poblaciones de *A. bellidioides* (como *Spilanthes arnicoides* DC. y *S. grisea* (Chodat) A.H.Moore) de Catamarca, Argentina, y Jansen (1985b), cita 13 II en meiosis para poblaciones de Ituzaingó, Corrientes, Argentina. Tanto *Spilanthes arnicoides* como *S. grisea* son sinónimos de *Acmella bellidioides*, especie que no está citada actualmente para la provincia de Catamarca, Argentina. De acuerdo

a estos datos se trata de una especie que presenta un solo número cromosómico.

El comportamiento meiótico observado con presencia regular de bivalentes indica que se trata de un taxón diploide con base en $x = 13$, número básico propuesto para el género y que caracteriza a la ancestral sección *Megaglottis*.

El cariotipo de *A. bellidioides* constituye la primera descripción cariotípica que se realiza en el género. La asimetría del cariotipo se ve reflejada en los valores de los índices calculados (A_1 , A_2 , AI y categoría de Stebbins).

Todas las especies y variedades de la sección *Megaglottis*, la más ancestral, son parte de una serie euploide basada en $x = 13$ (Jansen 1985a). Si consideramos al total de especies del género que fueron analizadas cromosómicamente (27/30), solamente se han citado dos guarismos que difieren de ser múltiplos de $x = 13$ (Jansen 1985a). Por estas razones, el número básico propuesto para el género es $x = 13$. Por lo tanto, el cariotipo descrito en este trabajo constituye la definición del cariotipo básico del género. Dado que las especies de *Acmella* que habitan en Misiones, como en el N de Argentina, son los diploides más ancestrales del género, es de interés que en el futuro se establezcan comparaciones con las demás especies diploides para conocer si se trata de un cariotipo básico conservado y a la vez caracterizar el centro de diversidad del género. A estos fines, los índices de asimetría A_2 y AI serán los parámetros de elección para estudiar y comparar cariotipos de taxones muy relacionados.

A. bellidioides presenta extremada variabilidad de caracteres morfológicos, considerando que es una especie diploide. Sumado a esto, está relacionada de manera cercana a *A. grisea* (Chodat) R.K.Jansen, especie con la cual suele ser confundida (Jansen 1985b). Ambas especies presentan una distribución simpátrica y además fueron citadas con el mismo número gamético $n = 13$. Por lo tanto, estudios futuros que incluyan análisis del cariotipo de poblaciones de estas especies constituirán un buen ejemplo de la utilidad de los análisis citogenéticos en la resolución de problemas taxonómicos. Asimismo, el conocimiento de características citogenéticas aparentemente sencillas de una especie, como el número cromosómico, el comportamiento de los cromosomas en la meiosis, el modo de reproducción de los individuos y la fertilidad de éstos, puede contribuir a comprender mejor los patrones complejos de variación morfológica y ayudar a definir límites taxonómicos.

AGRADECIMIENTOS

P. Aguilera recibió una beca de investigación del Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT, Gobierno Provincia de Misiones, Argentina) durante la realización de este trabajo. Los autores agradecen a la Sra. Bib. Irma Stella Insaurralde por la colaboración en la identificación taxonómica de los materiales de herbario y al Dr. Mauro Grabile por la revisión crítica y confección digital de las imágenes. Este trabajo fue financiado parcialmente por PICT-O 36907 (ANPCyT - SECyT, Argentina), y por una beca doctoral del CONICET (Argentina) a P. Aguilera.

BIBLIOGRAFÍA

- BATTAGLIA, E. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8: 179-187.
- JANSEN, R.K. 1985a. Systematic significance of chromosome numbers in *Acmella* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 72: 1835-1841.
- JANSEN, R.K. 1985b. The systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae). *Systematic Botany Monographs* 8: 1-115.
- JANSEN, R.K. & T.F. STUESSY. 1980. Chromosome counts of Compositae from Latin America. *American Journal of Botany* 67: 585-594.
- KEIL, D.J. & T.F. STUESSY. 1975. Chromosome counts of Compositae from the United States, Mexico and Guatemala. *Rhodora* 77: 171-195.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A.A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- PASZKO, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258: 39-48.
- ROMERO ZARCO, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-531.
- SAENZ, A.A. 2008. Heliantheae. En F.O. Zuloaga, O. Morrone & J.M. Belgrano (eds.), *Catálogo de las plantas vasculares del cono sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*. Volumen 2. Dicotyledoneae: Acanthaceae-Fabaceae (Abarema-Schizolobium). *Missouri Botanical Garden*, pp. 1159-1161.
- STEBBINS, G.L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. New York: Addison-Wesley Co. 209 pp.
- TURNER, B.L., A.M. POWELL & J. CUATRECASAS. 1967. Chromosome numbers in the Compositae. XI. Peruvian species. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54: 172-177.
- TURNER, B.L., J. BACON, L. URBATSCH & B. SIMPSON. 1979. Chromosome numbers in South American Compositae. *American Journal of Botany* 66: 173-178.

Recibido: 28.07.10
Aceptado: 26.11.10