



Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Carrera de Ciencias Biológicas

“DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CROMOSÓMICO Y  
CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DEL GÉNERO  
*EXODECONUS* (SOLANACEAE)”

Tesinista: Hedemann, Laura Gabriela.

Firma: .....

Director: Scaldaferro, Marisel A.

Firma: .....

Co-director: Barboza, Gloria E.

Firma: .....

Lugar de trabajo: Laboratorio de Citogenética – Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) – Ciudad Universitaria.

Año 2017



*“Cuando camines, camina junto a los soñadores, a los que confían, a los que tienen coraje, a los alegres, a los que hacen planes, a los que actúan, todos aquellos que tienen la cabeza en las nubes pero los pies en la tierra. Deja que su espíritu encienda tu fuego interno para que entonces puedas también dejar el mundo mejor de lo que lo encontraste”*

(Autor desconocido)

## ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	5
II.	INTRODUCCIÓN .....	6
	• Objetivos.....	14
	• Hipótesis .....	14
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
IV.	RESULTADOS .....	19
V.	DISCUSIÓN .....	40
VI.	CONCLUSIONES .....	47
VII.	AGRADECIMIENTOS .....	48
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
IX.	MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	56

## I. RESUMEN

Se realizaron por primera vez estudios citogenéticos en metafases somáticas y núcleos interfásicos del género *Exodeconus* Raf. Se obtuvieron datos cromosómicos de cuatro de las seis especies que lo conforman (*E. maritimus*, *E. prostratus*, *E. flavus* y *E. integrifolius*). Se determinó el número cromosómico como  $2n = 2x = 24$ . Se realizó la caracterización citológica mediante bandeos de fluorescencia, técnica de tinción clásica (Feulgen) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El patrón de bandeo difiere entre las especies, reflejando la dinámica de la diferenciación cromosómica y divergencia evolutiva. Se encontraron bandas terminales, intercalares y pericentroméricas. Se hallaron tres tipos de heterocromatina, CMA+/DAPI-, CMA+/DAPIo, siendo éstas las más abundante en el género, y CMA+/DAPI+ restringida a una sola especie, *E. maritimus*. Las fórmulas cariotípicas varían entre las especies, habiendo predominancia de cromosomas metacéntricos. En todas las especies fue posible localizar los loci de ARN ribosómico 45S, resultando en un patrón con distribución similar entre especies y constante dentro de cada una, excepto en *E. maritimus*, que presentó un patrón diferencial. Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) varían desde un par en *E. maritimus*, *E. flavus* y *E. integrifolius* hasta dos pares en *E. prostratus*. El único polimorfismo detectado en el género corresponde con el tamaño de la NOR en *E. flavus*. Los datos citológicos obtenidos corroboraron la filogenia existente para el género propuesta por Axelius, 1994.

## II. INTRODUCCIÓN

*Exodeconus* Raf. (incertae sedis, Solanoideae) es un pequeño género poco conocido de la familia Solanaceae, que comprende solo 6 especies [*E. flavus* (I.M. Johnst.) Axelius & D'Arcy, *E. integrifolius* (Phil.) Axelius, *E. maritimus* (Benth.) D'Arcy, *E. miersii* (Hook. f.) D'Arcy, *E. prostratus* (L'Hér.) Raf. y *E. pusillus* (Bitter) Axelius]. Se encuentra principalmente en Perú (5 especies), norte de Chile (3 especies), Ecuador (2 especies), una única especie endémica de las Islas Galápagos (*E. miersii*, Axelius, 1994), y una que llega al noroeste de Argentina (*E. integrifolius*; Hunziker & Barboza, 1998; Navarro *et al.*, 2012; Barboza, 2013). Crecen en zonas áridas y pedregosas, por la costa o en la cordillera costera (Dillon, 2005), distribuyéndose mejor a menores altitudes, con un bajo número de especies a partir de los 2500 msm (Navarro *et al.*, 2012). Son plantas pequeñas, anuales, viscosas, a menudo postradas (Figs. 1-6 A), con cáliz fructífero acrescente a muy acrescente, inflado o no, y con un marcado desarrollo reticulado de su nerviación. *Exodeconus flavus* se caracteriza por sus flores con corolas amarillas y hojas por lo general ampliamente cordadas, con márgenes más o menos enteros (Fig. 1 B-C). *Exodeconus integrifolius*, con flores pequeñas menores a 2 cm de largo, corolas blancas, violetas, azuladas, verdosas o una combinación de ellas y hojas más o menos enteras (Fig. 2 B-C). En *E. maritimus*, las flores son por lo general infundibuliformes, con corolas blancas y garganta violeta, hojas triangulares a cordadas, largas o tan largas como anchas, sin senos profundos a los lados de la base (Fig. 3 B-C). *Exodeconus miersii* presenta flores infundibuliformes con corolas blancas y garganta violácea, y hojas triangulares a cordadas, más anchas que largas, con profundos senos a los lados de la base (Fig. 4 B-C). *Exodeconus prostratus* posee flores ampliamente infundibuliformes, corolas azuladas a violáceas, y hojas ovadas con ápice redondeado y base muy desigual (Fig. 5 B-C). Por último, *E. pusillus* se caracteriza por sus flores no mayores a 1,5-2 cm de largo, corolas blancas, violetas, azuladas, verdosas o una combinación de ellas y hojas lanceoladas a romboidales (Fig. 6 B-C).

La circunscripción del género ha sido ya esclarecida (Axelius, 1994; Hunziker, 2001), y los análisis de parsimonia de los datos morfológicos lo resuelven como un grupo

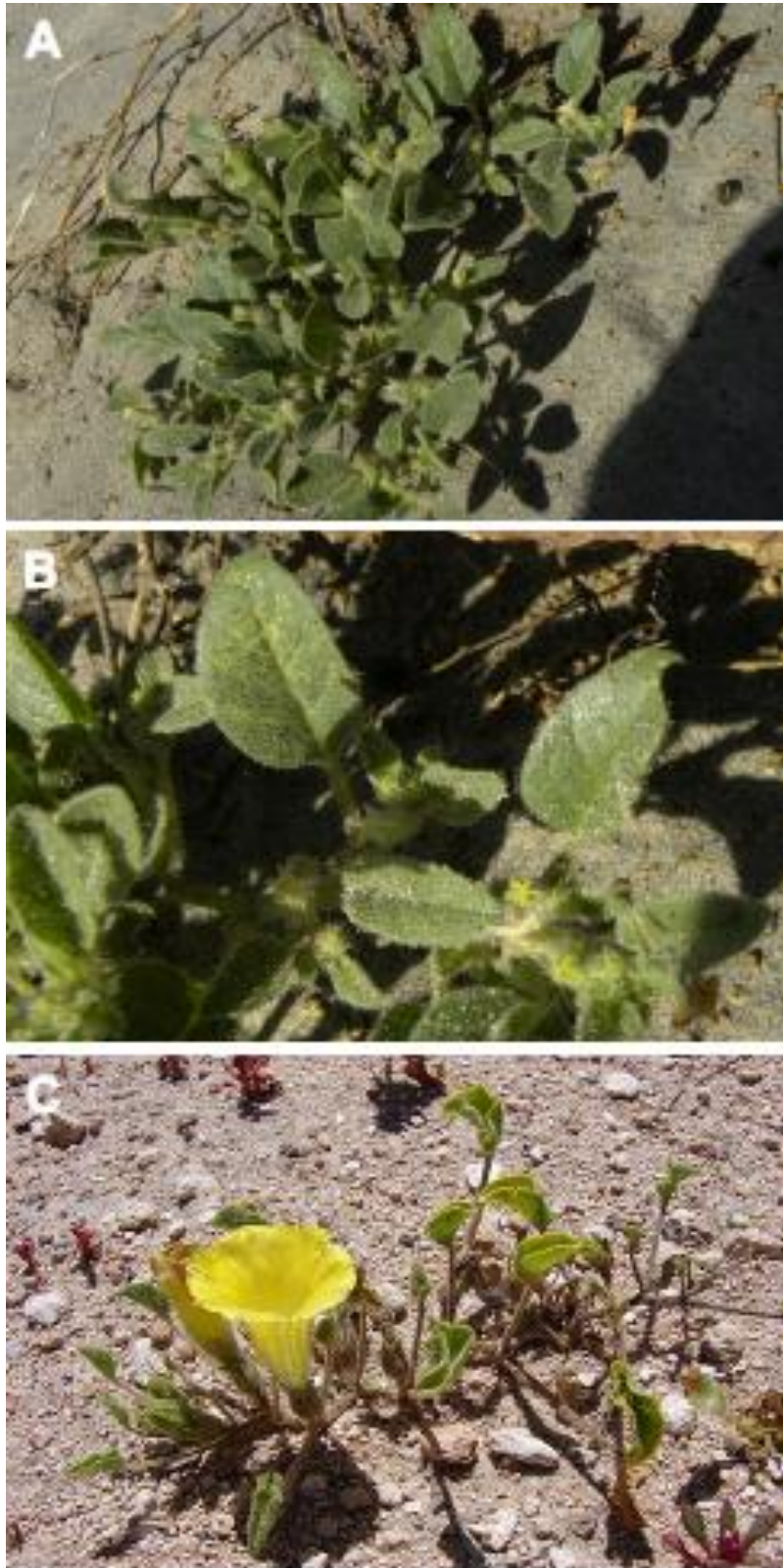
monofilético, con relaciones interespecíficas que muestran buena coherencia con la biogeografía de este grupo de especies (Axelius, 1994).

Por su parte, los análisis cariotípicos cumplen un rol importante en la cuantificación e identificación de cromosomas de muchas especies, probando ser un complemento valioso en estudios sistemáticos y evolutivos. Los modos y mecanismos de evolución cariotípica pueden conocerse a través de la comparación de los cromosomas de diferentes taxones (Weiss-Schneeweiss & Schneeweiss, 2013). Existen numerosos estudios cromosómicos en Solanaceae (Badr *et al.*, 1997; Acosta *et al.*, 2005; Moscone, 2007; Rego *et al.*, 2009; Chiarini *et al.*, 2010). Dentro de la subfamilia Solanoideae, la mayoría de los taxones posee  $x = 12$  (Badr *et al.*, 1997; Hunziker, 2001; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini *et al.*, 2010). Asimismo, se han encontrado algunas excepciones con  $x = 10, 11, 13, 14, 17$  y  $23$  (Darlington & Janaki-Ammal, 1945; Menzel, 1950; Baylis, 1963; Sheidai *et al.*, 1999; Tie-Yao *et al.*, 2005; Chiarini & Bernardello, 2006; Moscone *et al.*, 2007; Scaldaferrero *et al.*, 2013).

Además, cabe recordar que diversas características citogenéticas (p.e. fórmula cariotípica, tipo de heterocromatina, presencia y posición de bandas cromosómicas heterocromáticas, número y localización de sitios activos de ADNr, etc.) han resultado de relevancia para establecer afinidades entre especies en otros géneros de Solanaceae (p.e. *Capsicum* L. -Moscone *et al.*, 1995; Scaldaferrero *et al.*, 2013-, *Solanum* L.-Bernardello *et al.*, 1994; Chiarini & Bernardello, 2006; Acosta *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2012, *Nicotiana* L. -Lim *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001-, *Nierembergia* Ruiz & Pav. -Acosta *et al.*, 2006; Tate *et al.*, 2009-, *Larnax* Miers y *Deprea* Raf. -Deanna *et al.*, 2014, etc.), y han aportado información sustancial que permitieron inferir tendencias evolutivas (p.e. *Capsicum* -Moscone *et al.*, 2007). Algunas técnicas citogenéticas como el bandedo cromosómico y la hibridación *in situ* (FISH), permiten establecer homologías y homeologías cromosómicas entre las especies a examinar. Las homeologías intra- e interespecíficas revelan características cromosómicas compartidas indicando posiblemente homología ancestral (Scaldaferrero *et al.*, 2016).

A pesar de que el género en estudio es pequeño, a la fecha no se conoce ningún dato citogenético referido a sus especies.

**Fig. 1.** Foto *E. flavus*. **A.** Hábito **B.** Hojas **C.** Flores. Fotos de S. Leiva González.

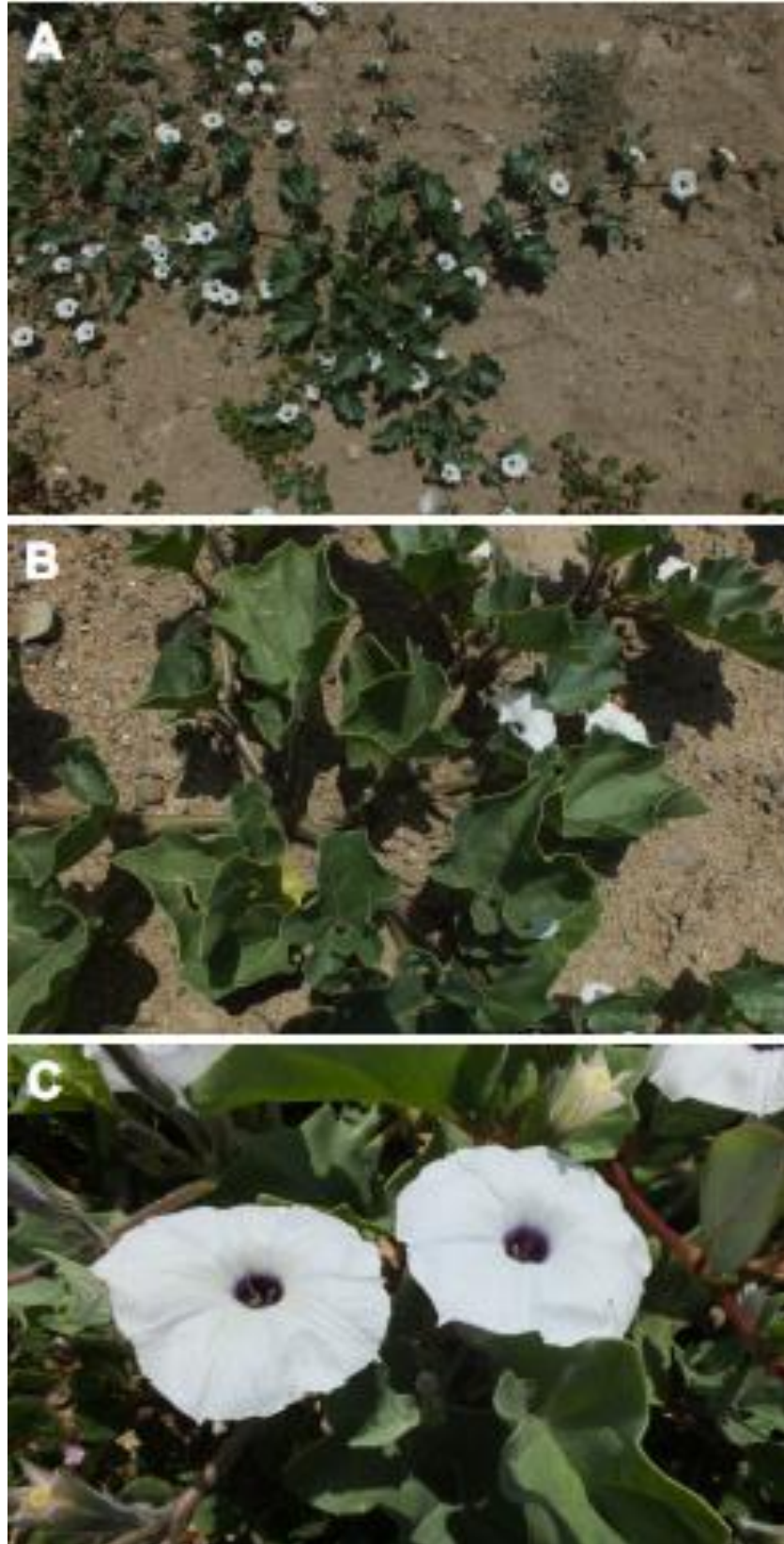




**Fig. 2.** Foto *E.integrifolius*. **A.** Hábito **B.** Hojas **C.** Flores. Fotos de S. Leiva González.



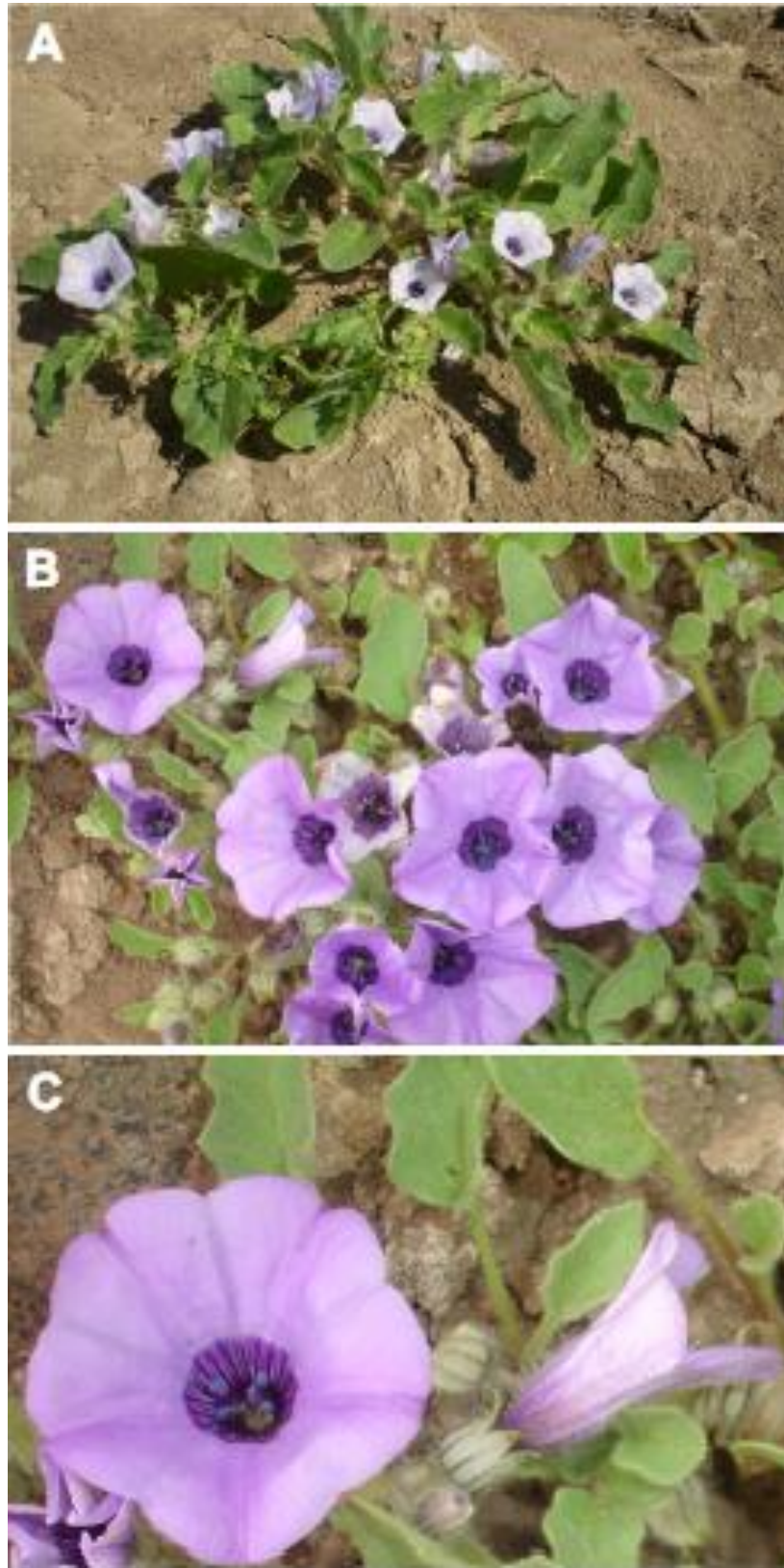
**Fig. 3.** Foto *E. maritimus*. **A.** Hábito **B.** Hojas **C.** Flores. Fotos de S. Leiva González.



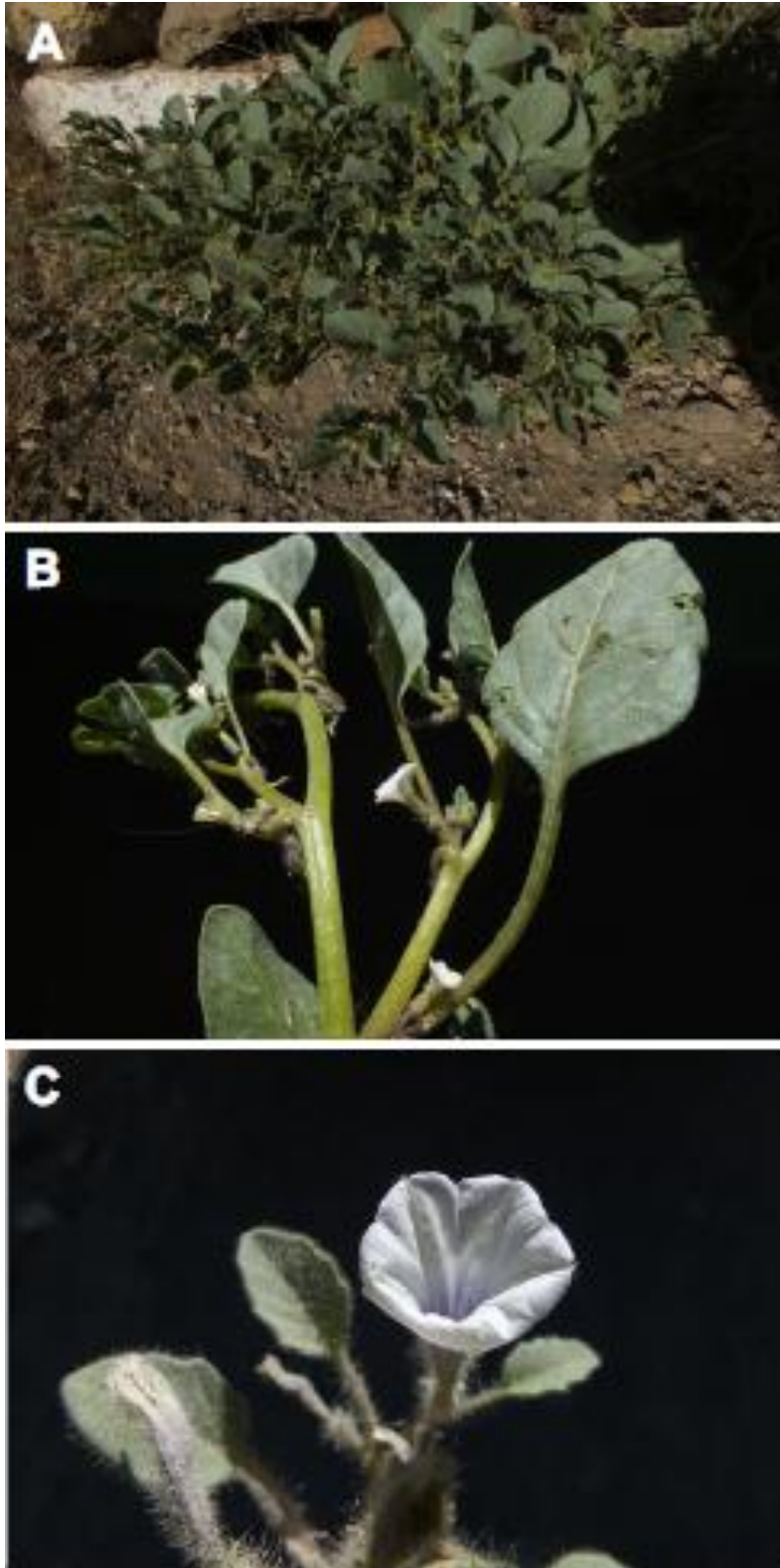
**Fig. 4.** Foto *E.miersii*. A. Hábito B. Hojas C. Flores. Fotos de S. Leiva González.



**Fig. 5.** Foto *E. prostratus*. **A.** Hábito **B.** Hojas **C.** Flores. Fotos de S. Leiva González.



**Fig. 6.** Foto *E. pusillus*. **A.** Hábito **B.** Hojas **C.** Flores. Fotos de S. Leiva González.



Por ello, este trabajo tiene como finalidad realizar estudios citogenéticos clásicos y moleculares a fin de obtener los primeros registros cromosómicos en el género, y a su vez, delimitar las especies mediante el análisis de sus cariotipos. La importancia de este estudio radica en que los resultados brindan información significativa sobre la constitución cromosómica en *Exodeconus*, y proporcionan herramientas para comenzar a entender las relaciones evolutivas entre sus especies. Por lo cual, los datos obtenidos pueden ser contrapuestos con antecedentes de filogenia de datos morfológicos, y así evaluar y comparar las relaciones evolutivas del género en cuestión.

### **OBJETIVO GENERAL**

Contribuir al conocimiento de la constitución cromosómica de *Exodeconus* (Solanaceae).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el número cromosómico en especies de *Exodeconus* (*E. flavus*, *E. integrifolius*, *E. maritimus*, *E. prostratus* y *E. pusillus*).
- Caracterizar a las especies mediante tinción con técnica tradicional, bandeo cromosómico de fluorescencia y FISH.
- Identificar los cromosomas mediante marcadores tales como la longitud cromosómica, la posición del centrómero, el patrón de bandeo heterocromático y el tamaño y la localización de los organizadores nucleolares de las especies a estudiar.
- Analizar la presencia de variación interespecífica en el género.
- Establecer homologías y homeologías cromosómicas entre las especies a examinar.

De acuerdo a la problemática y a los objetivos presentados, se plantea la siguiente **hipótesis** de trabajo:

- Las especies del género *Exodeconus* pueden ser delimitadas mediante el análisis de sus cariotipos, y tienen un número cromosómico  $2n = 24$ , como ha sido observado en otros géneros de la subfam. Solanoideae (Solanaceae).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El material examinado fue recolectado en Perú por la Dra. Gloria E. Barboza y por el Prof. Segundo Leiva González; los datos de colector y procedencia se detallan en la Tabla 1. Se recolectaron cinco de las seis especies que comprende el género (*E. flavus*, *E. prostratus*, *E. maritimus*, *E. integrifolius* y *E. pusillus*), ya que no fue posible adquirir el material proveniente de las Islas Galápagos (*E. miersii*). De las muestras recolectadas, sólo se utilizaron los frutos para la obtención de semillas para su germinación. Los ejemplares de herbario están depositados en el Museo Botánico de Córdoba (CORD), Argentina y en el herbario de la Universidad Privada A. Orrego (HAO), Trujillo, Perú.

**TABLA 1. Lista de taxones estudiados, procedencia, colector y ejemplar de herbario.**

Abreviatura del nombre de los colectores: GEB = Gloria E. Barboza; SLG = Segundo Leiva González. CORD = Herbario del Museo botánico de Córdoba, Argentina. HAO = Herbario de la Universidad Privada A. Orrego, Trujillo, Perú.

Taxón	Procedencia	Colector	Herbario
<i>E. maritimus</i>	Perú: Dpto. La Libertad, Prov. Trujillo	SLG 5586	HAO
<i>E. prostratus</i>	Perú: Dpto. Ancash, Prov. Pallasca	SLG 5657	HAO-CORD
<i>E. flavus</i>	Perú: Dpto. Arequipa, Prov. Arequipa	SLG s/nº	HAO
<i>E. integrifolius</i>	Perú: Dpto. Arequipa, Prov. Arequipa	GEB 3944	CORD

Se realizaron preparaciones de cromosomas somáticos por aplastamiento de cuatro de las cinco especies, debido a que no fue exitosa la germinación de las semillas obtenidas de *E. pusillus*. Se utilizaron ápices radicales previamente tratados con inhibidores del huso

acromático (para-diclorobenceno). Cuando fue dificultosa la germinación de las semillas, se procedió a la aplicación de 200-500 ppm de ácido giberélico (Ellis *et al.*, 1985), y en caso de necesitarse un tratamiento más intenso, las semillas se embebieron en ácido giberélico durante 24 hs previo a su germinación.

El material se fijó en una mezcla de alcohol etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1) durante 24 hs a 8°C, y luego se conservó a -18°C hasta su utilización. Se aplicaron métodos de: 1) tinción clásica (Jong, 1997); 2) bandeado cromosómico de fluorescencia CMA/DA/DAPI (Schweizer, 1980; Schweizer & Ambros, 1994); y, 3) hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Moscone *et al.*, 1996, con modificaciones).

### **1) Técnica de tinción clásica**

Para la observación de los cromosomas somáticos y su análisis morfométrico, las raíces fueron tratadas empleando la tinción de Feulgen según Jong (1997), con pequeñas modificaciones. Se analizaron entre 4 a 10 metafases de 3 a 5 individuos por especie. Las preparaciones se hicieron permanentes mediante remoción del cubreobjetos por congelamiento con CO<sub>2</sub> (Bowen, 1956) y montadas en Euparal.

Para la realización de los bandeos cromosómicos y FISH, las raíces fijadas fueron digeridas con una solución enzimática de celulasa (1 % p/v) y pectinasa (1 % v/v), según la técnica de Schwarzacher *et al.* (1980).

### **2) Bando de fluorescencia - Tinción triple CMA/DA/DAPI**

Esta técnica se utilizó para examinar la presencia, el tipo y la distribución de la heterocromatina constitutiva.

Se llevó a cabo la técnica de tinción triple (CDD) con los fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub>, distamicina A y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (CMA/DA/DAPI) según Schweizer (1980), que revela simultáneamente bandas heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos GC (bandas CMA/DA positivas y DA/DAPI negativas), AT (bandas CMA/DA negativas y DA/DAPI positivas), y heterocromatina rica en GC y moderadamente rica en AT (bandas CMA/DA positivas y DA/DAPI neutro). Mediante este método se analizaron entre 5 a 10 metafases de 3 a 5 individuos por especie.



### **3) Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**

Para localizar los loci de ADN ribosómicos 45S, se trabajó con sondas de los genes de ARN ribosómico 18S-5,8S-25S (45S).

Luego del bandeado de fluorescencia los preparados fueron secuencialmente sometidos a la técnica de FISH. Los mismos fueron desteñidos mediante inmersión en mezcla 3:1 de alcohol etílico 95% y ácido acético glacial durante 12 hs, posteriormente se lavaron en alcohol absoluto por 2 min. y se secaron al aire (Schweizer, 1981).

La sonda utilizada fue pTa71: fragmento de la unidad de repetición de los genes de ARNr 18S-5,8S-25S (45S) de *Triticum* sp. marcado con biotina (Gerlach & Bedbrook, 1979).

El marcado de las sondas con biotina por “nick-translation”, el pre-tratamiento de las preparaciones, las condiciones de hibridación, los lavados y el bloqueo de las preparaciones, la detección de la sonda marcada mediante anticuerpos conjugados con fluorocromo [anti-biotina con rodamina (TRITC)] y la tinción de los cromosomas con DAPI, se llevó a cabo según los protocolos de Moscone *et al.* (1996) con modificaciones. Esta técnica se aplicó a un representante por especie.

### **Análisis cromosómico**

Los cromosomas fueron observados y fotografiados en un microscopio óptico Zeiss Axiophot EL-Einsatz utilizando luz transmitida o epifluorescencia según el caso, obteniéndose microfotografías mediante una cámara digital monocromática Leica DFC300 FX y provistas por el analizador de imágenes Leica Application Suite 3.6.0 (Leica Microsystems CMS GmbH, 2010). Para el análisis morfométrico del cariotipo se efectuaron mediciones a los cromosomas utilizando el programa OPTIMAS 6.1 (Optimas Corporation, 1996).

En cada metafase se obtuvieron longitudes cromosómicas absolutas y relativas referidas a los brazos corto (p) y largo (q), y total (c), además de las bandas heterocromáticas y la longitud total del complemento haploide (LTCH, para los valores relativos, la longitud total del complemento = 100%).

Para cada cromosoma se calculó la posición del centrómero según el índice braquial,  $r = q/p$  (Levan *et al.*, 1964), y la posición de las bandas heterocromáticas intercalares mediante el índice  $d_i = d \times 100/a$  ( $d$  = distancia desde el centrómero hasta el centro de la banda,  $a$  = longitud del brazo cromosómico respectivo; Greilhuber & Speta, 1976). La terminología adoptada para denominar las bandas heterocromáticas fue la siguiente: *pe* = banda pericentromérica, cuando ocupa el centrómero y regiones adyacentes de ambos brazos cromosómicos; *t* = banda terminal, cuando se encuentra en posición telomérica; *i* = banda intercalar, cuando se ubica en cualquier posición a lo largo de los brazos cromosómicos, exceptuando las antes mencionadas. Las diferentes longitudes correspondientes a un mismo brazo o banda de cromosomas homólogos fueron combinadas en valores medios. Las mediciones absolutas incluyen media y desviación estándar.

Con los datos obtenidos se elaboraron los idiogramas correspondientes, utilizándose para la descripción y ordenamiento de los cromosomas la nomenclatura de Levan *et al.* (1964) del siguiente modo: “m” o metacéntrico ( $r = 1,00 - 1,69$ ), “sm” o submetacéntrico ( $r = 1,70 - 2,99$ ), “st” o subteloicéntrico ( $r = 3,00 - 6,99$ ). En los idiogramas los cromosomas se acomodaron en grupos conforme al índice braquial creciente y, dentro de cada grupo, se los ordenó acorde a su longitud total ( $c$ ) decreciente. Cuando los cromosomas no poseían marcadores para su segura identificación, fueron agrupados según su parentesco morfológico. En las diferentes especies, los cromosomas que tienen el mismo número no son necesariamente homeólogos.

En el caso de los satélites se empleó la terminología de Battaglia (1955), según se señala a continuación: “microsatélite”, un satélite esferoidal de pequeño tamaño, es decir, tiene un diámetro igual o menor que la mitad del diámetro cromosómico que lo porta, y “macrosatélite”, un satélite esferoidal de gran tamaño, es decir, que tiene diámetro mayor que la mitad del diámetro cromosómico que lo porta. La longitud de los satélites fue adicionada a la longitud de los brazos cromosómicos correspondientes. La longitud de las constricciones secundarias (regiones organizadoras nucleolares o NORs) siempre fue excluida de las mediciones.

Se cuantificó la asimetría cariotípica según los índices propuestos por Romero Zarco (1986),  $A_1$  y  $A_2$ , a saber:

$$\text{Índice de asimetría intracromosómica o } A_1 = 1 - [(\sum b_i/B_i) / n]$$

donde  $\underline{b}_i$  y  $\underline{B}_i$  son las medias de los brazos cortos y largos, respectivamente, correspondientes a cada par de cromosomas homólogos y  $\underline{n}$  es el número de pares de cromosomas homólogos del complemento.

-Índice de asimetría intercromosómica o  $A_2 = s/x$

donde  $\underline{s}$  es la desviación estándar y  $\underline{x}$  es la media de las longitudes cromosómicas del complemento.

También se empleó la clasificación de Stebbins (1971) que establece categorías de asimetría de cariotipos teniendo en cuenta, por un lado, la razón entre las longitudes del par mayor y el par menor del complemento (R), y por otro lado, la proporción de pares de cromosomas con r mayor o igual a 2.

Por último, se llevó a cabo un análisis filogenético mediante algoritmos de parsimonia empleando TNT (Goloboff *et al.*, 2003) que permite la utilización de caracteres cuantitativos continuos y la optimización de caracteres. El soporte de los clados se evaluó con “jackknife” con mil repeticiones. Para ello, se registraron 16 características citológicas y una morfológica (ver Tabla 10) de las especies de *Exodeconus* aquí analizadas y una especie de *Deprea*.

#### IV. RESULTADOS

Se estudiaron los cromosomas mitóticos de 4 especies de *Exodeconus*, mediante los métodos que se detallan a continuación.

##### 1) Tinción clásica

Los 4 taxones estudiados poseen  $2n = 2x = 24$  y un cariotipo constituido por 6 pares m (nos. 1-6), 4 pares sm (nos. 7-10) y 2 pares st (nos. 11 y 12) en *E. maritimus*; 7 pares m (nos. 1-7), 3 pares sm (nos. 8-10) y 2 pares st (nos. 11 y 12) en *E. prostratus* y *E. flavus*, y 9 pares m (nos. 1-9) y 3 pares sm (nos. 10-12) en *E. integrifolius*. Los cromosomas de las especies estudiadas son pequeños, variando la longitud cromosómica (c) entre 0,86  $\mu\text{m}$  y 1,44  $\mu\text{m}$ . Metafasas somáticas teñidas con la técnica de Feulgen se presentan en la Fig. 7. En la Tabla 2, se detallan las fórmulas y las longitudes cariotípicas (LTCH). La longitud total (absoluta y relativa), índice braquial y tipo de cromosoma se detallan en la Tabla 3

(ver Material Suplementario); los idiogramas elaborados con las medidas respectivas se muestran en la Fig. 8.

**TABLA 2. Comparación entre los cariotipos de cuatro especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) mediante tinción con Feulgen.** Abreviaturas: LTCH, longitud total del complemento haploide; m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subtelocéntrico. \* Valor promedio y desviación estándar.

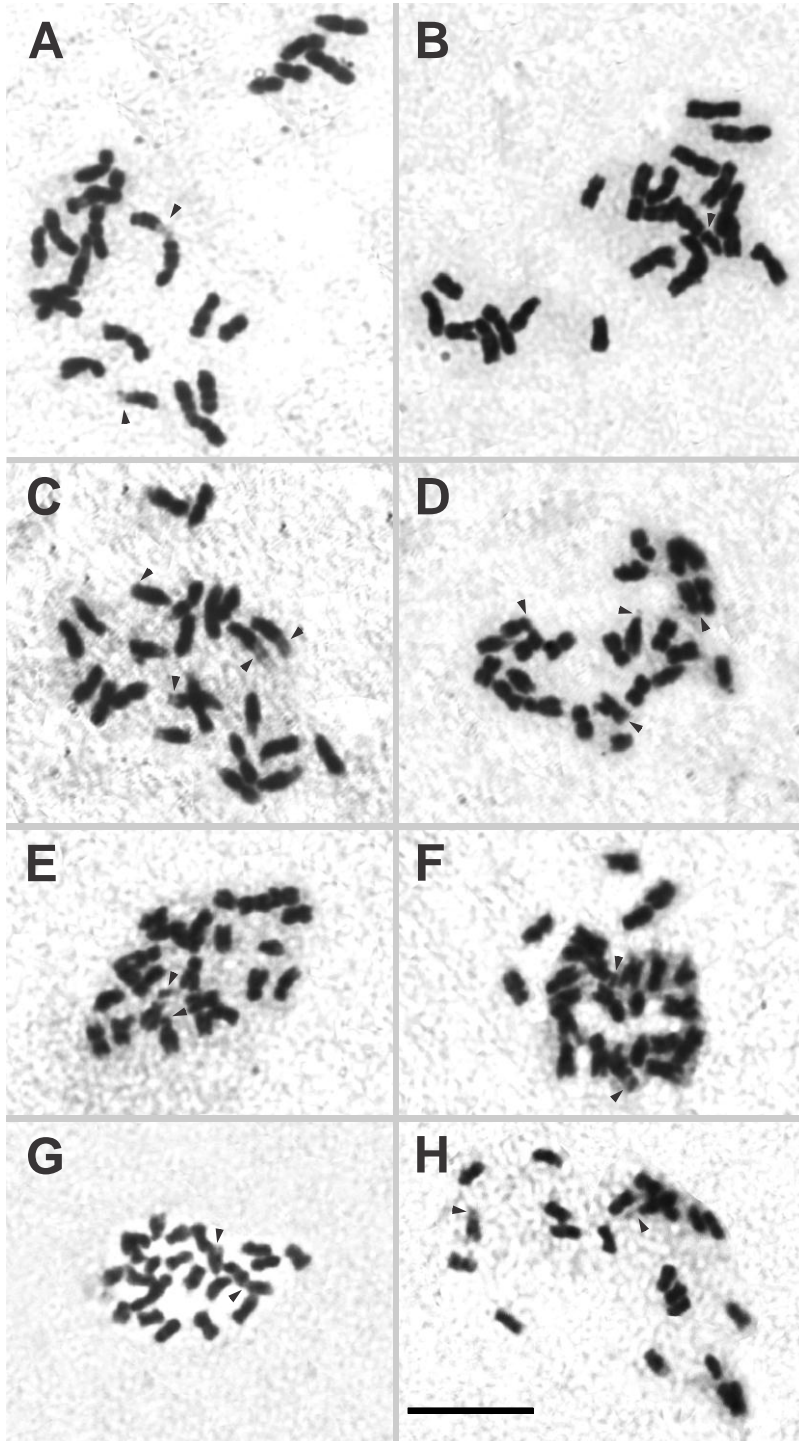
Taxón	Fórmula cariotípica (n)	LTCH* ( $\mu\text{m}$ )
<i>E. maritimus</i>	6 m + 4 sm + 2 st	17,69 (3,66)
<i>E. prostratus</i>	7 m + 3 sm + 2 st	13,91 (1,43)
<i>E. flavus</i>	7 m + 3 sm + 2 st	12,79 (2,36)
<i>E. integrifolius</i>	9 m + 3 sm	12,93 (1,22)

### 1) Bandeo de fluorescencia

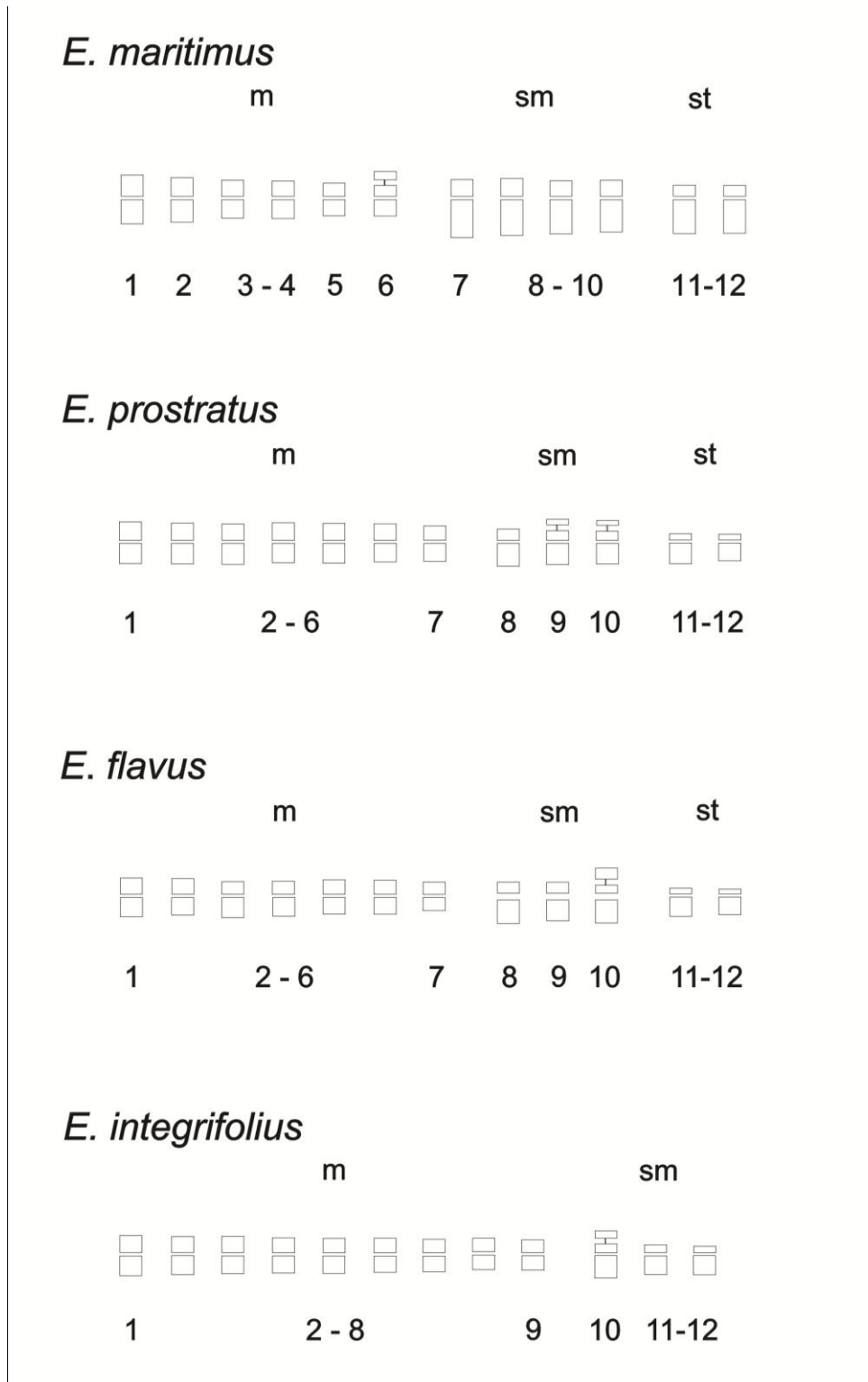
Núcleos interfásicos y metafases somáticas teñidos con fluorocromos se muestran en las Figs. 9 - 13 respectivamente (ver Figs. 10-13 en Material Suplementario).

En la Tabla 4 se detallan la fórmula y la longitud cariotípica (LTCH), los pares cromosómicos con NORs, la cantidad y tipo de heterocromatina, el máximo número de bandas por complemento y de pares con bandas que presenta cada taxón estudiado y la posición de las bandas. En la Tabla 5 (ver Material Suplementario) se detallan las mediciones cromosómicas efectuadas en las muestras examinadas, con las cuales se elaboraron los idiogramas respectivos (Fig. 14).

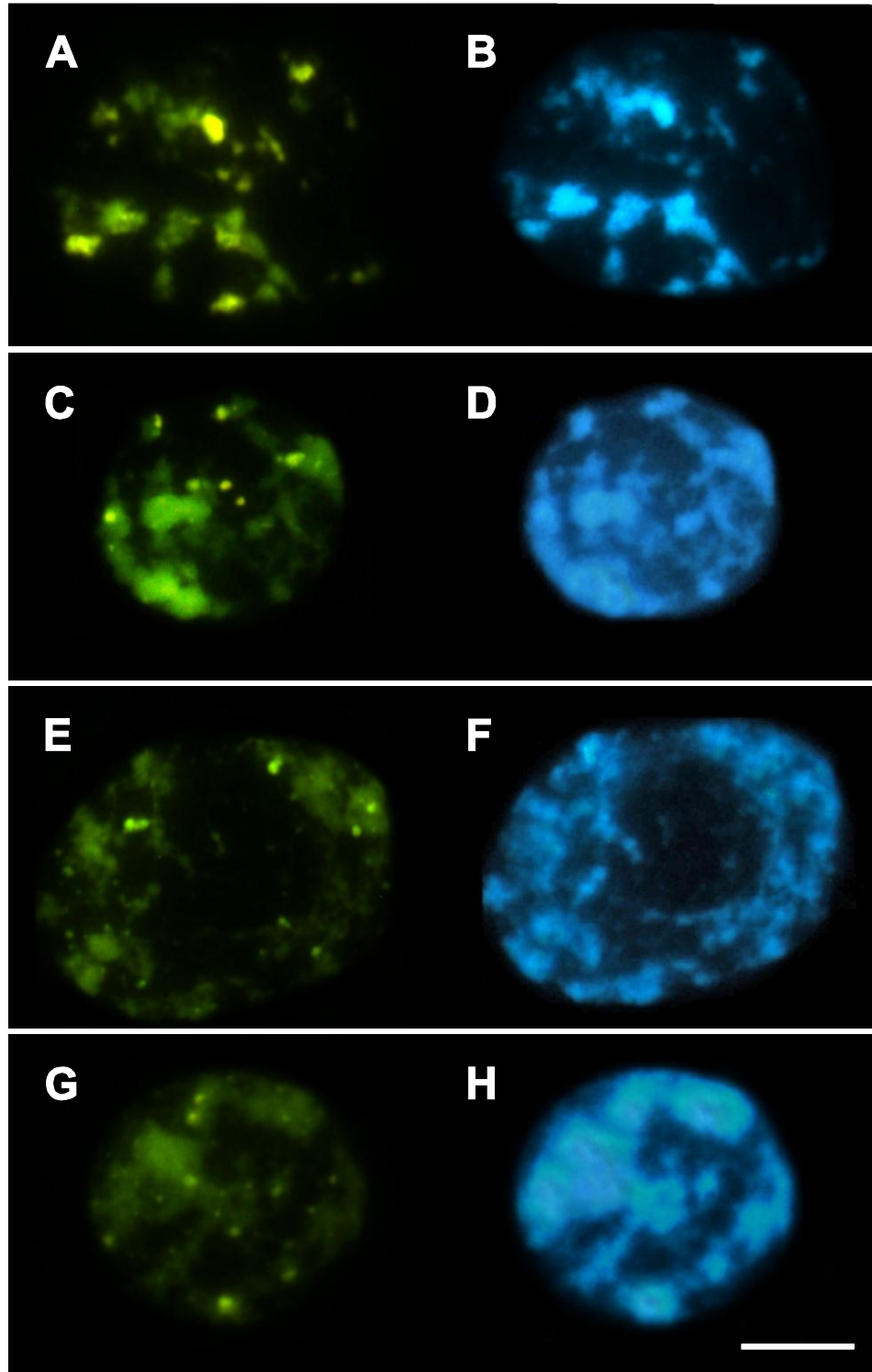
**Fig. 7.** Metafasas somáticas de especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) teñidas con Feulgen. **A-B.** *E. maritimus*. **C-D.** *E. prostratus*. **E-F.** *E. flavus* **G-H.** *E. integrifolius*. En **B.** y **H.** falta un cromosoma. Las puntas de flecha indican los satélites. Escala= 10  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Idiogramas de las especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) representando el complemento cromosómico haploide, obtenido mediante tinción con Feulgen. Se agruparon los cromosomas con alta similitud. Escala = 5  $\mu$ m.



**Fig. 9.** Núcleos interfásicos de especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) con bandeo de fluorescencia. **A, C, E, G.** Bando CMA. **B, D, F, H.** Bando DAPI. **A-B.** *E. maritimus*. **C-D.** *E. prostratus*. **E-F.** *E. flavus*. **G-H.** *E. integrifolius*. Escala = 10  $\mu$ m.



**TABLA 4. Comparación entre los cariotipos de cuatro especies de *Exodeconus* (2n = 24) medidos mediante bandeos de fluorescencia.** Abreviaturas: NOR, región organizadora nucleolar; LTCH, longitud total del complemento haploide; Hc, heterocromatina; bhc, bandas heterocromáticas; m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subtelocéntrico; *t*, banda terminal; *i*, banda intercalar; *pe*, banda pericentromérica. \* Valor promedio y desviación estándar ( ). \*\* Valores expresados como porcentajes de LTCH, referidos al contenido de heterocromatina luego de la triple tinción CMA/DA/DA.

Taxón	Pares con NOR	LTCH* (µm)	Contenido de Hc**					Máx. n° de bandas por complemento haploide	Máx. n° de pares con bandas	Posición de bhc
			Total	NOR-asociada	Intercalar	Pericentromérica	Terminal			
<i>E. maritimus</i>	1, 2, 6 (m), 5 y 7 (sm)	29,13 (4,18)	24,68	3,41	0,82	-	20,46	21	12	19 <i>t</i> ; 2 <i>i</i> (1 NOR asociada)
<i>E. prostratus</i>	9 y 10 (sm)	19,56 (1,67)	6,70	1,94	-	2,86	1,89	7	7	2 <i>t</i> ; 5 <i>pe</i> (2 NOR asociadas)
<i>E. flavus</i>	10 (sm)	18,94 (1,48)	18,25	1,34	-	1,27	15,63	25	12	23 <i>t</i> ; 2 <i>pe</i> (1 NOR asociada)
<i>E. integrifolius</i>	10 (sm)	20,88 (2,85)	7,60	2,25	-	1,82	3,50	6	4	5 <i>t</i> ; 1 <i>pe</i> (1 NOR asociada)





### **Cantidad, tipo y distribución de heterocromatina**

En general, el patrón de bandeo cromosómico obtenido con CMA/DA es inverso al patrón obtenido con DA/DAPI. Todas las especies presentan heterocromatina constitutiva CMA positiva, DAPI negativa (a partir de ahora designadas como CMA+/DAPI-, es decir, brillantes con cromomicina, apagadas con DAPI) y heterocromatina CMA/DA positiva DA/DAPI neutro (denominadas como CMA+/DAPI<sub>0</sub>, lo que es brillante con cromomicina, neutras con DAPI); mientras que en el caso excepcional de *E. maritimus* se observó heterocromatina CMA positiva y DAPI positiva (designada como CMA+/DAPI+, lo que es brillante con cromomicina y brillante con DAPI).

La heterocromatina asociada a las NORs, presente en cromosomas con satélites es siempre CMA+/DAPI-; incluyendo la región distal del satélite y en algunos casos una pequeña porción del brazo que lo porta, próximo a las NORs (Fig. 14). En todas las células, las NORs se muestran como constricciones secundarias en los cromosomas teñidos con fluorocromos, siempre CMA+/DAPI- (Figs. 10 - 13).

Los satélites adheridos a los cromosomas que llevan la NOR se observan en ambos miembros del par cromosómico respectivo. Según la nomenclatura de Battaglia (1955), todas las especies estudiadas poseen macrosatélites, de tamaños constantes y esferoidales.

Siempre se encontró correlación entre el número y tamaño de los cromocentros CMA+ en los núcleos interfásicos y las bandas heterocromáticas CMA+/DAPI- ó CMA+/DAPI<sub>0</sub>, considerando además el caso particular de *E. maritimus* que presenta la misma correlación con los cromocentros DAPI+ de los núcleos interfásicos y las bandas CMA+/DAPI+ (Figs. 9 y 10 – 13 respectivamente).

La cantidad de heterocromatina entre los taxones varía entre 24,68% y 6,70% (Tabla 4). Las especies con escasa heterocromatina corresponden a *E. prostratus* (6,70%) y *E. integrifolius* con 7,60%, mientras que *E. maritimus* es la especie que presenta el mayor porcentaje de heterocromatina constitutiva (24,68%), y le sigue *E. flavus* con 18,25%.

En general, la proporción de heterocromatina asociada a las NORs resulta ser superior a la distribuida en otras localizaciones cromosómicas, con excepción de *E. maritimus*.

A continuación, se describe el patrón de bandeo fluorescente obtenido con la triple tinción CMA/DA/DAPI para cada taxón, que permitió la segura identificación de los

cromosomas por la aparición de bandas heterocromáticas valiosas como marcadores distintivos. Dicho patrón de bandeo resultó constante en todos los individuos examinados de cada muestra, registrándose homomorfismo entre las bandas de cromosomas homólogos, salvo en casos excepcionales según se indica para cada taxón en particular.

### ***Exodeconus maritimus***

El cariotipo de este taxón contiene el mayor contenido de heterocromatina de todas las especies analizadas y el patrón de bandeo más complejo, caracterizado por regiones heterocromáticas terminales de diferente tamaño en uno o ambos brazos de todos los cromosomas del complemento, con excepción de los cromosomas del par n° 9 que presentan únicamente dos bandas intercalares en el brazo largo. Todos los pares del complemento presentan bandeo (Figs. 10 y 14).

Los pares cromosómicos submetacéntricos, n° 7, n° 8 y n° 10 presentan grandes bloques heterocromáticos ubicados en el brazo largo, abarcando casi la mitad del mismo, y produciendo constricciones, que no corresponden con regiones organizadoras nucleolares; mientras que presentan bandas de un tamaño considerablemente menor en el brazo corto y poco llamativas. Los pares metacéntricos n° 1- 5, presentan bandas terminales CMA+/DAPI<sup>0</sup> menos conspicuas en ambos brazos, siendo más llamativas en los pares n° 1, n° 2 y n° 4, y menos llamativas en los pares n° 3 y n° 5. El último par metacéntrico, el n° 6 presenta una única banda terminal en el brazo corto CMA+/DAPI<sup>-</sup>, asociada a la NOR.

Los pares n° 11 y n° 12, ambos subtelocéntricos, presentan una única banda terminal en el brazo largo, de gran tamaño, y considerablemente notable que produce constricciones en el mismo, no correspondiéndose nuevamente con regiones organizadoras nucleolares.

Como característica distintiva, esta especie en particular, presenta heterocromatina CMA+/DAPI<sup>+</sup> en las bandas correspondientes a los pares n° 7, 8, 10-12 (Fig. 10), las cuales corresponden con las bandas heterocromáticas de mayor tamaño.

El patrón de bandeo fluorescente resultó constante en todos los individuos analizados.

### ***Exodeconus prostratus***

Este taxón se caracteriza por presentar solamente siete pares del complemento bandedados, de los cuales cinco presentan banda CMA+/DAPIo pericentromérica y los restantes dos, bandas terminales CMA+/DAPI- asociadas a NORs (Figs. 11 y 14).

Las bandas pericentroméricas rodean de ambos lados al centrómero en los pares metacéntricos n° 2 y n° 4 - 6, y en el par submetacéntrico n° 8; presentan un tamaño uniforme y constante en todos los pares cromosómicos y en todos los individuos analizados.

Los pares submetacéntricos n° 9 y n° 10 presentan las bandas heterocromáticas más conspicuas correspondientes al satélite distal y una banda en el brazo corto, vecina a las NORs. Finalmente en los pares metacéntricos n° 1, n° 3 y n° 7, y en los subtelocéntricos n° 11 y n° 12 no se observan bandas.

El patrón de bandeo es constante en todos los individuos analizados, registrando homomorfismo entre las bandas de cromosomas homólogos y entre los satélites de los pares correspondientes.

### ***Exodeconus flavus***

El cariotipo de este taxón se caracteriza por presentar el segundo patrón de bandeo más complejo del género (Figs. 12 y 14).

Todos los pares del complemento presentan bandas terminales CMA+/DAPIo distribuidas en ambos brazos de forma simétrica respecto al tamaño, con excepción de los pares n° 3 y n° 10. En el par metacéntrico n° 3, las bandas son asimétricas, siendo la banda del brazo largo más grande que la del brazo corto; mientras que el par submetacéntrico n° 10 se caracteriza por presentar una banda CMA+/DAPI-, más conspicua en el brazo corto asociada a la NOR y una menos conspicua en el brazo largo.

Por otro lado, los pares metacéntricos n° 2 y n° 6 se caracterizan por presentar bandas pericentroméricas CMA+/DAPIo además de las terminales.

Finalmente, el par subtelocéntrico n° 12, presenta únicamente una banda terminal en el brazo largo.

El patrón de bandeo es constante en todos los individuos analizados, registrando homomorfismo entre cromosomas homólogos, excepto en el par n° 10, donde uno de los

homólogos presenta la región organizadora nucleolar y la banda terminal asociada a la misma notablemente más grandes que la de su compañero, manifestando polimorfismo.

### ***Exodeconus integrifolius***

Presenta nueve pares cromosómicos metacéntricos (nos. 1 - 9), siendo la especie con mayor cantidad de este tipo de cromosomas de todo el género. Solamente uno de ellos, el par n° 9, presenta bandas terminales CMA+/DAPI<sub>0</sub>, poco llamativas y en ambos brazos mientras que en el resto de los pares no se evidenció bandeo alguno (Figs. 13 y 14).

Los restantes tres pares son submetacéntricos. Los pares n° 10 y n° 12 se caracterizan por presentar una banda terminal, CMA+/DAPI<sub>0</sub> para el par n° 12 y CMA+/DAPI<sub>-</sub> para el par n° 10, la cual se encuentra además asociada a NOR. El par n° 12 también, presenta una banda terminal en el brazo largo menos conspicua que la del brazo corto.

El par n° 11 presenta una banda pericentromérica CMA+/DAPI<sub>0</sub>.

## **2) Hibridación *in situ* fluorescente**

Se estudiaron 4 muestras pertenecientes a los 4 taxones analizados. En todas las muestras examinadas fue posible localizar los loci ribosómicos 45S (Fig. 15).

En el complemento diploide de los taxones estudiados el número de loci 45S varía desde 1 a 5 pares y su patrón de distribución de FISH se asemeja, aunque no completamente, al correspondiente patrón de bandeo heterocromático específico CMA+/DAPI<sub>-</sub> luego de la tinción fluorescente con CMA/DA/DAPI (Tabla 6, Fig. 15).

En todas las especies, excepto en *E. maritimus* se encontró que la señal de FISH de este locus es de localización terminal en pares cromosómicos submetacéntricos de tamaño grande a mediano. En *E. prostratus* corresponde con los pares n° 9 y n° 10 CMA+/DAPI<sub>-</sub> (Fig. 15 B), en *E. flavus* corresponde con el par n° 10 CMA+/DAPI<sub>-</sub> (Fig. 15 C), y en *E. integrifolius* corresponde con el par n° 10 CMA+/DAPI<sub>-</sub> (Fig. 15 D).

*Exodeconus maritimus* en cambio, presenta cinco loci 45S, tres de ellos poseen localización terminal en pares cromosómicos metacéntricos correspondientes a los pares n° 1, n° 2 y n° 6, mientras que los otros dos poseen localización intercalar en los pares

cromosómicos submetacéntricos correspondientes al par nº 7 y al par nº 9 (Fig. 15 A). Solamente el par nº 6 posee un sitio 45S activo.

Los idiogramas respectivos se muestran en la Fig. 16.

**TABLA 6. Datos cromosómicos de los taxones de *Exodeconus* examinados con referencia a los genes ribosómicos localizados mediante FISH.** Abreviaturas: m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subtelocéntrico; p y q, brazo corto y largo, respectivamente. Todos los loci 45S son terminales, excepto aquellos marcados con \* que son intercalares.

Taxón	Nº de orden de los cromosomas con constricciones secundarias	Número y posición de sitios de ADN <sub>r</sub>
		45S
<i>E. maritimus</i>	6 (m)	5 [1 mayor, 4 menores] (1 q; 2 q; 6 p; 7 q*; 9 q*)
<i>E. prostratus</i>	9 y 10 (sm)	2 [2 mayores ] (9 p; 10 p)
<i>E. flavus</i>	10 (sm)	1 [1 mayor] (10 p)
<i>E. integrifolius</i>	10 (sm)	1 [1 mayor] (10 p)

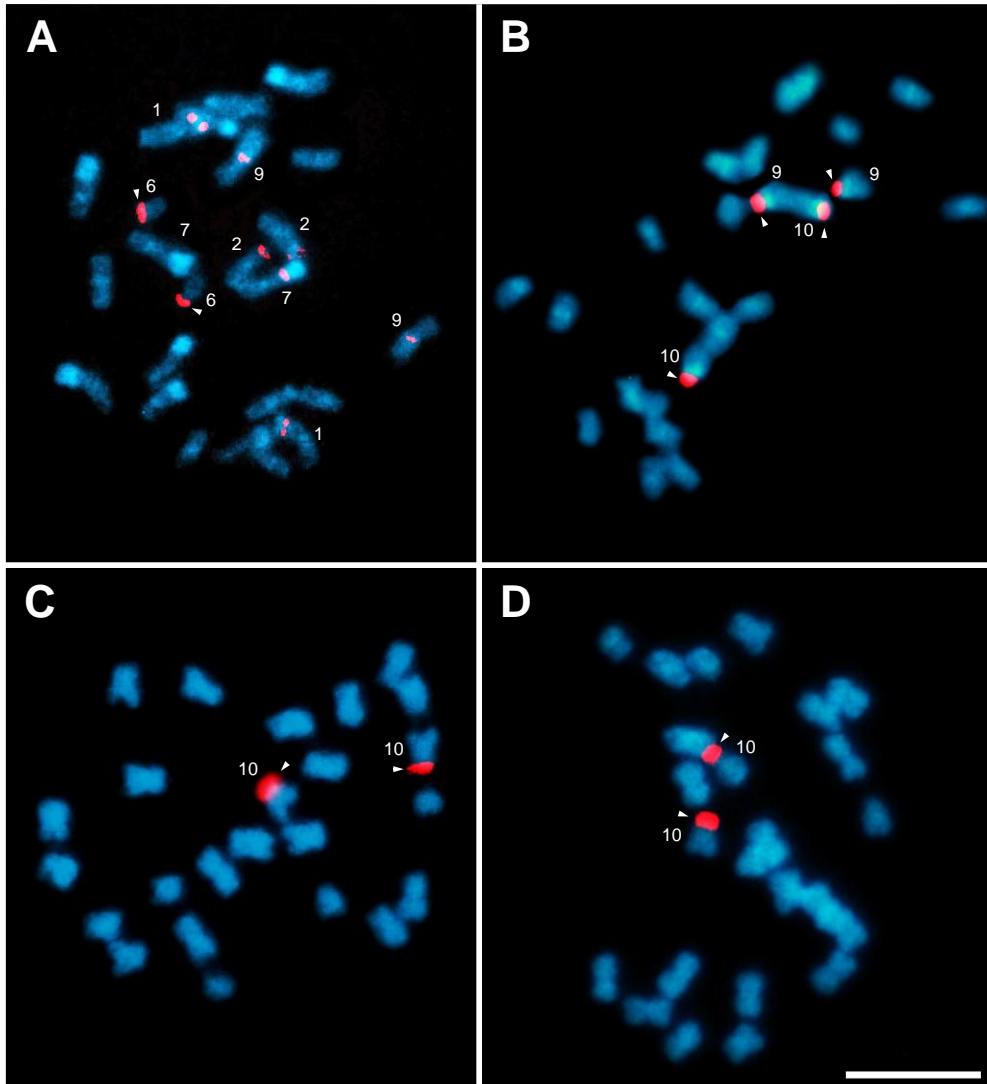
Por último, el bandeo DAPI observado posterior a FISH evidenció un patrón similar sino igual al generado durante la tinción triple CMA/DA/DAPI en todas las especies estudiadas, con excepción de *E. maritimus* y *E. integrifolius* (Tabla 7). En *E. maritimus*, se evidenciaron bandas pericentroméricas antes no observadas, ubicadas en los pares metacéntricos nº 1 - 5 y en los submetacéntricos nº 7, nº 8 y nº 10, no así en el par metacéntrico nº 6 portador del locus 45S y los pares subtelocéntricos, nº 11 y 12 (Fig. 17 A). Por otro lado, en *E. integrifolius* se evidenció un patrón de bandeo distintivo

caracterizado por bandas pericentroméricas en algunos de los cromosomas metacéntricos (Fig. 17 D).

**TABLA 7. Tipos de bandas y heterocromatina luego de aplicar bandeado fluorescente y FISH en cuatro especies de *Exodeconus*.** Abreviaturas: NOR, región organizadora nucleolar; o, DAPI neutro; + DAPI positivo; - DAPI negativo. \* Las bandas terminales de *E. prostratus* están asociadas a las NORs.

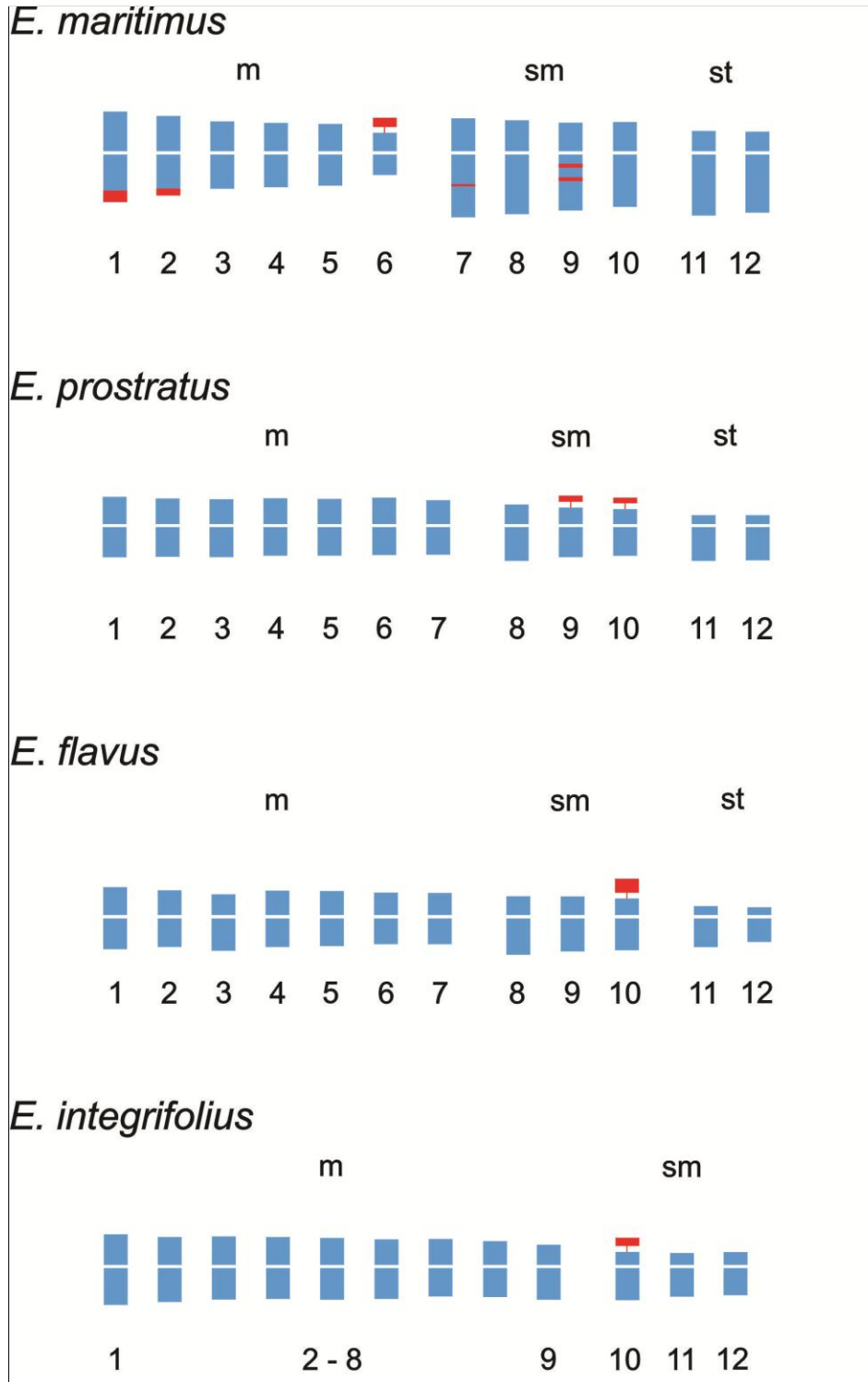
Especies	Heterocromatina	Triple tinción	DAPI/FISH
<i>E. matirimus</i>	NOR	CMA+/DAPI-	(o)
	Bandas terminales	CMA+/DAPIo	(+)
		CMA+/DAPI+	(+)
	Bandas intercalares	CMA+/DAPIo	(+)
	Bandas pericentroméricas	-	-
<i>E. prostratus</i>	NOR	CMA+/DAPI-	(o)
	Bandas terminales*	CMA+/DAPIo	(+)
	Bandas intercalares	-	-
	Bandas pericentroméricas	CMA+/DAPIo	(+)
<i>E. flavus</i>	NOR	CMA+/DAPI-	(+)
	Bandas terminales	CMA+/DAPIo	(+)
	Bandas intercalares	-	-
	Bandas pericentroméricas	CMA+/DAPIo	(+)
<i>E. integrifolius</i>	NOR	CMA+/DAPI-	(+)
	Bandas terminales	CMA+/DAPIo	(+)
	Bandas intercalares	-	-
	Bandas pericentroméricas	CMA+/DAPIo	(+)

**Fig. 15.** Hibridación in situ fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de *Exodeconus* utilizando sondas de los genes de ARNr 45S. La fluorescencia roja indica hibridación de la sonda 45S marcada con biotina, que fue detectada con anticuerpos conjugados con TRITC. Los cromosomas fueron teñidos con DAPI (azul). **A.** *E. maritimus*. **B.** *E. prostratus*. **C.** *E. flavus*. **D.** *E. integrifolius*. En *E. maritimus* la sonda 45S no se observa para los dos homólogos del par n°7 para esta metafase en particular, pero si se observó en otras metafases analizadas. Los cromosomas homólogos identificados que portan sitios ribosómicos se indican con la misma numeración que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flecha señalan las NORs activas. La escala representa 10  $\mu$ m.

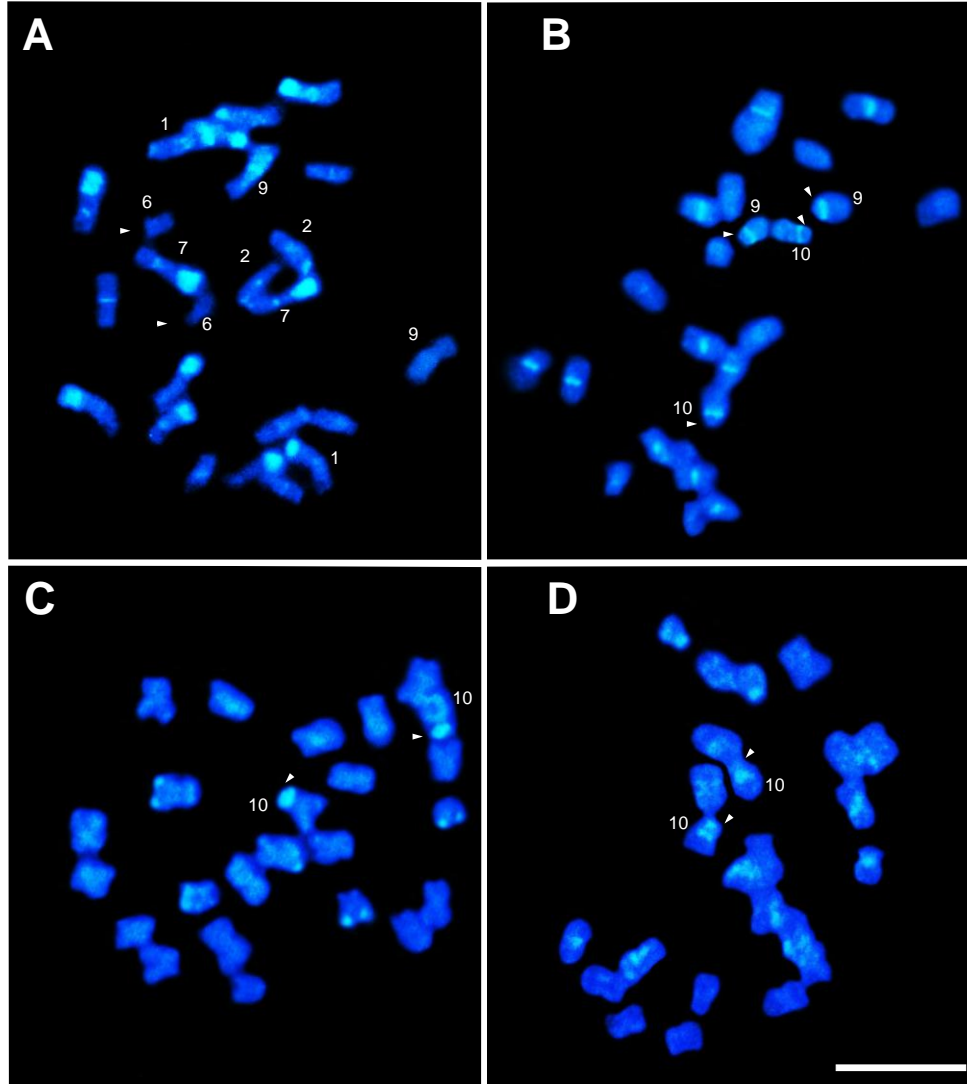




**Fig. 16.** Idiogramas de las especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) representando el complemento cromosómico haploide, obtenido mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Las bandas de color rojo indican los sitios 45S. Escala= 5 $\mu$ m.



**Fig. 17.** Patrón de bandeado DAPI luego de hibridación *in situ* (FISH) en cromosomas metafásicos de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ). **A.** *E. maritimus*. **B.** *E. prostratus*. **C.** *E. flavus*. **D.** *E. integrifolius*. Los cromosomas homólogos identificados que portan sitios ribosómicos se indican con la misma numeración que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flecha señalan las NORs activas. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



### **Asimetrías y similitudes cromosómicas**

En general los cariotipos son simétricos, teniendo como referencia tanto la posición del centrómero como las longitudes cromosómicas (Tabla 8). Una visión integral de la similitud cromosómica entre las especies analizadas se muestra en la Figs. 8 y 14.

En su mayoría los cariotipos de las especies están constituidos por cromosomas m, completándose generalmente la fórmula cariotípica con cromosomas sm y otras veces también con cromosomas st.

Los índices braquiales obtenidos en los cromosomas m presentan un rango de 1,08 a 1,59, mientras que el rango de r para los cromosomas sm es de 1,74 a 2,48 y para los st es de 3,02 a 3,89 (Tabla 8).

La longitud cromosómica promedio de todas las especies se ubica entre 1,00 a 3,11  $\mu\text{m}$ .

Según la clasificación de asimetría cariotípica de Romero Zarco, la cuantificación del índice  $A_1$  alcanza valores ubicados entre 0,27 y 0,34. Mientras que el índice  $A_2$  alcanza valores ubicados entre 0,11 y 0,19 (Tabla 8).

*E. maritimus* posee el cariotipo con la mayor asimetría intracromosómica ( $A_1 = 0,34$ ), mientras que *E. integrifolius* muestra el menor índice ( $A_1 = 0,27$ ). Por otra parte, *E. maritimus* muestra, además, la mayor asimetría intercromosómica ( $A_2 = 0,19$ ) y la mayor relación entre el par cromosómico más largo y el par más corto ( $R = 2,46$ ). Las muestras con cromosomas más similares entre sí, es decir, con la menor asimetría intercromosómica e índice R más bajos son *E. prostratus* ( $A_2 = 0,11$ ;  $R = 1,37$ ) y *E. flavus* ( $A_2 = 0,13$ ;  $R = 1,89$ ).

Acorde a la clasificación de Stebbins (1971), la mayoría de las especies (75%) pertenecen a la categoría 2A (*E. prostratus*, *E. flavus* y *E. integrifolius*), mientras que el 25% restante a la categoría 2B (*E. maritimus*).

Por último, el tamaño de los cromosomas medidos en CMA y medidos en Feulgen varía en una razón de 0,65 en promedio, detallándose los valores para cada especie en la Tabla 9.

**TABLA 8. Asimetrías y similitudes cromosómicas de cuatro especies de *Exodeconus*.** Abreviaturas: NOR, región organizadora nucleolar; bhc, bandas heterocromáticas; m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subteloecéntrico; r, índice braquial; AS, clasificación de Stebbins (1971); A<sub>1</sub>, índice de asimetría intracromosómica; A<sub>2</sub>, índice de asimetría intercromosómica; R, razón entre la longitud del par mayor y el menor del complemento.

Taxón y colector	Índice braquial (r)	Longitud cromosómica promedio(mín. – máx.)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	AS	R
<i>E. maritimus</i>	m = 1,13 - 1,20 sm = 1,80 - 1,92 st = 3,02 - 3,07	1,26 - 3,11	0,34	0,19	2B	2,46
<i>E. prostratus</i>	m = 1,11 - 1,22 sm = 1,74 - 1,94 st = 3,83 - 3,89	1,35 - 1,85	0,31	0,11	2A	1,37
<i>E. flavus</i>	m = 1,10 - 1,59 sm = 1,79 - 1,94 st = 3,08 - 3,28	1,00 - 1,89	0,33	0,13	2A	1,89
<i>E. integrifolius</i>	m = 1,08 - 1,57 sm = 2,15 - 2,48	1,28 - 2,19	0,27	0,15	2A	1,71

**TABLA 9. Promedios de la relación de las medidas cromosómicas luego de aplicar técnica clásica y bandedo fluorescente.** Abreviaturas: c, valor promedio de la longitud total del par cromosómico.

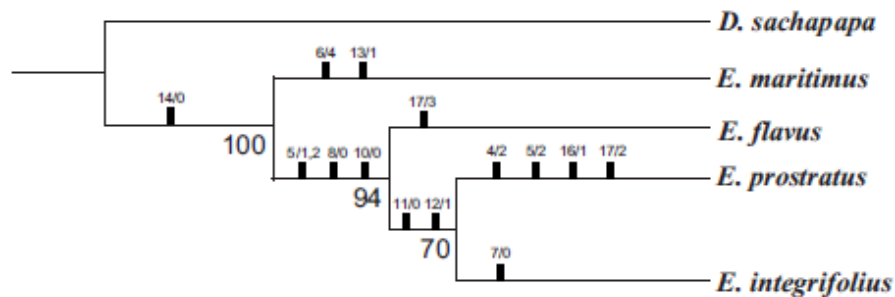
Par	c (Fluorescencia)	c (Feulgen)	Proporción Feulgen/Fluorescencia
1	2,19	1,36	0,62
2	1,99	1,28	0,64
3	1,87	1,21	0,64
4	1,82	1,17	0,64
5	1,79	1,12	0,62
6	1,58	1,08	0,68
7	2,01	1,23	0,61
8	2,03	1,31	0,64
9	1,89	1,23	0,64
10	1,76	1,23	0,69
11	1,62	1,08	0,66
12	1,54	1,02	0,66
PROMEDIO			0,65

**Análisis filogenético**

Los caracteres utilizados y su codificación se detallan en la Tabla 10.

El mapeo de 17 caracteres cromosómicos y un carácter morfológico en uno de los árboles más parsimoniosos se muestra en la Fig. 18.

**Fig. 18.** Árbol filogenético más parsimonioso basado en 17 caracteres citológicos y uno morfológico en cuatro especies de *Exodeconus* y una de *Deprea*. Los valores “jackknife” se muestran debajo de las ramas. Los caracteres que resultan diagnósticos se indican por una barra arriba de las ramas.



El árbol revela que un carácter, la longitud total del complemento menor a 20  $\mu\text{m}$ , (14/0, carácter 14 - estado 0), es sinapomórfico para *Exodeconus* con respecto a *Deprea*. Por su parte, *E. maritimus* posee dos autapomorfías ya que en el género es la especie que presenta mayor número de cromosomas sm y el cariotipo más asimétrico (6/4 y 13/1). Tres especies, *E. flavus*, *E. prostratus* y *E. integrifolius* presentan las NORs localizadas en cromosomas que no son metacéntricos (5/1, 2), ausencia de bandas heterocromáticas CMA+ intercalares (8/0) y ausencia de heterocromatina CMA+/DAPI+- (10/0). Por otro lado, *E. flavus* es el único taxón con flores amarillas (17/3). El clado formado por *E. prostratus* y *E. integrifolius* está apoyado por presentar un bajo número de bandas heterocromáticas (11/0), y porque no todos los cromosomas del complemento las portan (12/1). *Exodeconus prostratus* exhibe varias características propias, ya que es la única especie con dos pares de NORs (4/2), los cuales se ubican en dos cromosomas sm (5/2 y 16/1), y por poseer flor completamente violeta (17/2). Finalmente, *Exodeconus integrifolius* es el único taxón del género que no posee cromosomas st (7/0).

**TABLA 10. Matriz básica de datos utilizada en el análisis filogenético cromosómico de especies de *Exodeconus* y *Deprea*.** Todos los valores corresponden al complemento haploide. La codificación usada fue la siguiente: número de regiones organizadoras nucleolares activas (**n° NOR**): 1 = 1, 2 = 2; posición de NORs activas (**pos NOR**): 0 = cromosoma m, 1 = cromosoma sm, 2 = dos cromosomas sm; número de cromosomas sm y st (**n° cr sm, n° cr st**): 0 = 0, 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3, 4 = 4; presencia/ausencia de bandas heterocromáticas CMA+DAPI–/o intercalares (**bhci CMA+**): 0 = ausencia, 1 = presencia; presencia/ausencia de bandas heterocromáticas CMA+DAPI–/o pericentroméricas (**bhcp CMA+**): 0 = ausencia, 1 = presencia; presencia/ausencia de bandas heterocromáticas CMA+DAPI+ (**bhcp CMA+/DAPI+**): 0 = ausencia, 1 = presencia; máximo número de bandas heterocromáticas (**n° bhci**): 0 = 3 a 15, 1 = más de 16; máximo número de cromosomas con bandas heterocromáticas (**n° cr bhci**): 0 = 12, 1 = menos de 12; índice de asimetría de Stebbins (**AS**): 2A = 0, 2B = 1; longitud total del complemento haploide medido con Feulgen (**LCH**): 0 = menor a 20 µm, 1 = mayor a 21 µm; número de identificación del cromosoma con el primer o único sitio 45S (**45S 1°**): 1 = 6 (m), 2 = 9 (m), 3 = 10 (sm); número de identificación del cromosoma con el segundo sitio 45S (**45S 2°**): 0 = ausencia, 1 = 10 (sm); color de la flor (**flor**): 1 = blanca con garganta violeta, 2 = violeta, 3 = amarilla, 4 = verdosa; longitud cromosómica media (**c**), índice braquial medio (**r**), razón entre la longitud del cromosoma mayor y menor (**R**) y cantidad de heterocromatina total expresada como porcentaje de la longitud total del complemento (**Hc**). sac = *D. sachapapa*, mar = *E. maritimus*, int = *E. integrifolius*, pro = *E. prostratus*, fla = *E. flavus*.

Especie	c	r	R	Hc	n°	pos	n° cr	n° cr	bhci	bhcp	bhcp	n°	n°	AS	LCH	n° cr 45S		flor
					NOR	NOR	sm	st	CMA+	CMA+	CMA+/DAPI+	bhci	crom bhci			1°	2°	
N° de carácter	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
sac	2,91	1,42	1,43	14,90	1	0	3	0	1	0	1	1	0	0	1	2	0	4
mar	2,43	1,73	2,46	24,30	1	0	4	2	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
int	1,74	1,50	1,71	5,95	1	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1
pro	1,63	1,77	1,37	6,74	2	2	3	2	0	1	0	0	1	0	0	2	1	2
fla	1,58	1,71	1,89	18,25	1	1	3	2	0	1	0	1	0	0	0	3	0	3

## V. DISCUSIÓN

*Exodeconus*, ubicado dentro de la familia Solanaceae, posee  $x = 12$ , ciertamente el número básico más común de esta familia, apareciendo en más de la mitad de las especies estudiadas hasta el momento (Badr *et al.*, 1997; Hunziker, 2001; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini *et al.*, 2010). Por ende, este trabajo confirma la hipótesis previamente establecida, habiendo sido posible la delimitación de las especies mediante el análisis de sus cariotipos y la determinación del número cromosómico del género como  $2n = 24$ .

### *Consideraciones cariotípicas*

Todos los resultados obtenidos en este trabajo representan los primeros registros para el género y serán contrapuestos con resultados citológicos obtenidos en otros géneros de la familia Solanaceae.

*Exodeconus* está formado por especies que se caracterizan por poseer cariotipos con cromosomas pequeños, una o dos NORs activas por complemento haploide, gran variación en la cantidad de heterocromatina rica en GC, patrones de bandeo que van desde complejos (*E. maritimus* y *E. flavus*) a simples (*E. prostratus* y *E. integrifolius*), y una alta variabilidad interespecífica, que puede identificarse en las diferentes variables citológicas consideradas (fórmula cariotípica, asimetría, tipo, distribución y tamaño de las bandas heterocromáticas, cantidad y localización de genes ribosomales entre otros).

En Solanaceae, la mayoría de los cromosomas son m o sm, e. g. Badr *et al.*, 1997; Chiarini *et al.*, 2010 y Scaldaferrero *et al.*, 2013. El presente estudio demuestra que las especies de *Exodeconus* siguen este patrón, exhibiendo un cariotipo con predominancia de cromosomas m, siendo *E. integrifolius* la especie con mayor cantidad.

Respecto a la asimetría cariotípica, el género se caracteriza por un índice de asimetría intercromosómica ( $A_2$ ) bajo, siendo la especie más simétrica *E. integrifolius* y la menos simétrica *E. maritimus*. *Exodeconus prostratus* y *E. flavus* poseen valores intermedios. Esto es apoyado por el hecho de que la mayoría de las especies examinadas resultan en la categoría 2A de la clasificación de Stebbins, por poseer predominantemente cromosomas m de tamaño homogéneo; hace excepción, *E. maritimus*, que pertenece a la categoría 2B, ya que posee una diferencia máxima de  $1,85 \mu\text{m}$  entre el cromosoma de



mayor tamaño y el de menor tamaño. Teniendo en cuenta esto, Stebbins (1971) propuso que a mayor grado de asimetría cariotípica, mayor grado de especialización, siendo *E. maritimus* una de las especies con mayor distribución geográfica, pudiéndose encontrar tanto en regiones de playa y costeras como en regiones de moderada altitud, principalmente en el Ecuador y distribuyéndose hacia el sur de Perú (Axelius, 1994). Las otras especies suelen estar restringidas a altitudes más bajas y ambientes costeros, como ocurre con *E. prostratus*, a islas como ocurre en *E. miersii*, o a altas altitudes (1500-2500 msm) como se puede observar en *E. pusillus*, *E. integrifolius* y *E. flavus*.

Es importante enfatizar que la constancia en el número cromosómico y morfología cariotípica encontradas en *Exodeconus* también ha sido observada en otros estudios citogenéticos de otros géneros de Solanaceae, como *Capsicum* L. (Pozzobon *et al.*, 2006), *Solanum* L. (Bernardello & Anderson, 1990; Pillen *et al.*, 1996, sub nom. *Lycopesticum*) y *Cestrum* L. (Fernandes *et al.*, 2009), todos ellos con  $2n = 24$ .

Por otro lado, teniendo en cuenta el tipo de heterocromatina constitutiva, los cariotipos de todos los taxones examinados se caracterizan por poseer heterocromatina CMA+/DAPI- y heterocromatina CMA+/DAPI<sup>o</sup>. Únicamente *E. maritimus* evidencia, además, heterocromatina CMA+/DAPI+, resultando evidente que este último tipo de heterocromatina ha tenido un origen diferente al resto de la heterocromatina encontrada en el género.

En *Exodeconus*, la distribución de la heterocromatina se presenta de forma disímil entre especies, pero todas comparten la presencia de bandas terminales en menor o mayor cantidad, asociadas o no a NORs. Esto coincide con otros géneros de Solanaceae, donde se evidencia generalmente la ubicación de la heterocromatina en posición terminal (Moscone, 1993, 1996, 2007; Scaldaferrero *et al.*, 2013). Además, *E. maritimus* y *E. flavus* tienen una distribución equilocal de bandas terminales en aproximadamente la mitad de los cromosomas no homólogos del cariotipo (la banda se encuentra en igual posición tanto en el brazo corto como en el brazo largo), sugiriendo evolución paralela para la dispersión de heterocromatina en los mismos y heterocromatina formada probablemente por repeticiones similares. En relación a esta rasgo, Schweizer & Loidl (1987) expusieron un modelo, en el cual se propone que las bandas heterocromáticas se ubican en posiciones similares (equidistancia) en cromosomas no homólogos, probablemente causado por crossing-over

desigual durante la profase I meiótica o transposición en interfase mitótica lo cual se vería favorecido por la orientación de Rab1. Contrariamente, datos basados en distribución de la heterocromatina en especies con cromosomas holocéntricos sugieren que una equidistancia exacta no es esperada (Guerra, 2000). Diferentes brazos de diferentes cromosomas pueden tener distinto grado de condensación/descondensación, pudiendo entonces, ser muy diferente la distancia entre una banda y el centrómero en brazos no homólogos (Okada, 1975; Fukui & Mukai, 1988). Por lo tanto, este hecho más bien, tendría relación con similitudes estructurales o funcionales de esas regiones cromosómicas que las hace igualmente receptivas para instalar y amplificar secuencias iguales o similares de ADN (Fry & Salser, 1977; Flavell, 1982).

El tamaño de los cromosomas resulta otro factor importante a tener en cuenta en la distribución de la heterocromatina. Bandas proximales, esto es, ocupando una posición que no sea en los extremos de los brazos cromosómicos (bandas intercalares o pericentroméricas), son más comunes en cariotipos con cromosomas pequeños y decrecen en frecuencia con el aumento del tamaño de los mismos (Guerra, 2000). En *Exodeconus*, los cariotipos con cromosomas más pequeños pertenecen a *E. prostratus* y *E. flavus*, coincidiendo en que ambos poseen la mayor cantidad de bandas proximales. En este caso, también existe equilocalidad de las bandas en cromosomas no homólogos.

No se descarta la posibilidad de la existencia de heterocromatina adicional que no haya sido posible su detección por la triple tinción CDD, teniendo en cuenta también el pequeño tamaño de los cromosomas, lo que podría dificultar su visualización. Según Redi *et al.*, (2001) el número de repeticiones, más que la especificidad de secuencias, son las determinantes de las propiedades de tinción del ADN heterocromático. Consecuentemente, la ausencia de bandas no indica necesariamente falta de heterocromatina. Por lo tanto existe cierto límite, más allá del cual la heterocromatina puede ser invisible a nuestros ojos. Aún así, el patrón de bandeo observado se mantuvo constante en todos los individuos analizados y en todas las metafases dentro de cada individuo de cada especie, demostrando conservarse las características citológicas de las mismas.

El bandeo de fluorescencia permitió revelar además, que la variación entre cromosomas homólogos está prácticamente restringida al polimorfismo de la heterocromatina asociada a las NORs y estrictamente limitado a una sola especie, *E. flavus*.

Esta observación coincide con lo obtenido para otros géneros de Solanaceae (Moscone, 1989; Moscone *et al.*, 1995; Deanna *et al.*, 2014) y podría ser causado por varios factores como diferente número de repeticiones de los genes ribosomales, el nivel de transcripción, el efecto del pre-tratamiento con inhibidores del huso acromático, el nivel de condensación de la cromatina en la NOR o incluso rearrreglos estructurales que incluyen mutaciones en cromosomas somáticos (Suda, 1975; Jiménez *et al.*, 1988; Zurita *et al.*, 1999; Sato, 1981). Además es común en las Solanaceae encontrar estas regiones (NORs) ligadas a los brazos cortos de cromosomas m o sm (Menzel, 1950; Acosta *et al.*, 2005; Stiefkens & Bernardello, 2005; Bernardello *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2009; Chiarini *et al.*, 2010; Moyetta *et al.*, 2013; Scaldaferrero *et al.*, 2013), como es observado también en los taxones aquí analizados.

Se conoce que una de las aplicaciones más importantes de la hibridación *in situ* fluorescente ha sido su uso como herramienta en el mapeo físico de genes. Los números y posiciones de los loci de ADNr son caracteres útiles en la identificación de sitios cromosómicos morfológicamente similares, y operan como marcadores evolutivos entre las especies. En *Exodeconus*, se localizan siempre en posición terminal, como ocurre en otros géneros de Solanaceae, p. e. *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1995) y *Nicotiana* L. (Lim *et al.*, 2000). *Exodeconus maritimus*, presenta adicionalmente cuatro señales 45S ubicadas tanto en cromosomas metacéntricos (en posición terminal) como submetacéntricos (en posición intercalar), manteniéndose constantes entre individuos en número y posición. En la mayoría de los géneros de plantas, se ha observado que las especies diploides generalmente contienen un solo par de NORs (Raina & Khoshoo, 1971). Solo en unos pocos casos una especie diploide contiene más de dos pares de NORs. Cuando se han identificado numerosos loci ADNr, éstos se encuentran en cromosomas carentes de NORs, coincidiendo con el caso de *E. maritimus* anteriormente mencionado. Sin embargo, aquellos sitios suelen ser considerados como sitios inactivos, es decir, que no sintetizan ARN ribosómico. Incluso en aquellas especies diploides con más de dos pares NORs ha sido demostrado que solamente dos de esos sitios permanecen activos (p. e. *Arachis cardenassi* - Raina & Mukai, 1999). La aparición de estos loci 45S inactivos podría ser evidencia de evolución cromosómica, vía rearrreglos estructurales como inversiones y translocaciones y/o transposiciones. Existen evidencias que sugieren que el remodelado, tamaño y posicionamiento de sitios de ADNr podría estar relacionado con la transposición de genes o

con elementos transponibles que juegan un rol importante en la evolución genómica de las plantas (Dubcovsky & Dvorák, 1995; Raskina *et al.*, 2004; Datson & Murray, 2006).

En este estudio, la presencia de un organizador nucleolar en el par cromosómico n° 10 con morfología submetacéntrico permite detectar homeologías cromosómicas en *E. prostratus*, *E. flavus* y *E. integrifolius*.

Comparando los patrones obtenidos en FISH de los loci de la familia ribosómica 45S con los patrones de bandeo fluorescente se encontró que se asemejan en número, posición y tamaño manteniéndose constantes en todos los individuos de todas las especies analizadas. Lo distintivo a recalcar, es que la contratinción de los cromosomas con DAPI realizado durante FISH reveló un patrón de bandeo, parecido a un bandeo C, con bandas heterocromáticas que fluorescieron más intensamente en determinadas localizaciones cromosómicas. En *E. maritimus* se evidenció un patrón de bandeo DAPI+ no observado hasta el momento, apareciendo bandas pericentroméricas. Este método, al revelar la presencia de bandas no expuestas hasta el momento sugiere la existencia de otros tipos de heterocromatina. Asimismo, es posible observar un bandeo DAPI+ en otras regiones de los cromosomas, tanto en *E. maritimus* como en el resto de las especies, coincidentes con el bandeo CMA+ generado por la triple tinción. Se sabe que heterocromatina rica en pares GC puede también reaccionar con DAPI para producir bandas CMA+/DAPI<sub>0</sub> o CMA+/DAPI+ (Barros & Guerra, 2010). De la misma forma, cuando el DAPI es utilizado como fluorocromo durante FISH, las bandas CMA+ tienden a visualizarse como DAPI+, produciendo un falso DAPI+ (Hoshi *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2005), p.e. esto puede observarse con la heterocromatina asociada a las NORs la cual siendo CMA+ /DAPI- se observa DAPI<sub>0</sub> en *E. maritimus* y *E. prostratus* y DAPI+ en *E. flavus* y *E. integrifolius*. Investigaciones sugieren que los cambios ocurridos en la cromatina durante el procedimiento, afectan la especificidad de la reacción, permitiendo que un bandeo DAPI menos específico se evidencie. La desnaturalización con formamida o la exposición al calor parecen ser los responsables del patrón de bandeo disímil en la mayoría de los casos. Por ende, bandas DAPI+ no necesariamente son indicativas de heterocromatina rica en pares AT, por el contrario, la tinción con CMA siempre revela heterocromatina rica en pares GC (Barros & Guerra, 2010).

### ***Evolución del cariotipo***

El uso de datos cariotípicos en taxonomía, tradicionalmente referida como citotaxonomía o cariosistemática (Greilhuber & Ehrendorfer, 1988), contribuye a evaluar las relaciones entre especies o poblaciones y de esa forma comprender mejor las relaciones y la forma en que divergieron esos linajes (Guerra, 2008).

Los resultados presentados aquí ubican a *E. maritimus* en una posición basal, con el cariotipo más asimétrico. *Exodeconus flavus*, *E. prostratus* y *E. integrifolius* resultan asociados por compartir la mayor cantidad de caracteres citológicos y finalmente, *E. prostratus* y *E. integrifolius* se agrupan con un mismo nodo distal ya que, además, comparten un menor número de bandas heterocromáticas (Fig. 18).

La filogenia obtenida con caracteres morfológicos en Axelius (1994) mostraba coherencia con la biogeografía del género, estando representados los clados de acuerdo a su localización geográfica e indicaba a *E. maritimus* y *E. miersii* como las especies basales del género. La distribución de estas especies en las Islas Galápagos, Ecuador y norte de Perú permiten hipotetizar su centro de origen en esta zona, y su posterior diversificación hacia el sur (Navarro *et al.*, 2012). Una vez más los resultados indican que las especies de *Exodeconus* muestran una diferenciación clara entre sí. Análisis filogenéticos de secuencias de ADN en desarrollo en nuestro laboratorio confirman la monofilia del género (Carrizo García *et al.* comunicación personal), por lo que finalmente se logrará optimizar el análisis filogenético cuando se superpongan los datos cromosómicos aquí obtenidos sobre los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de ADN. El valor de los caracteres morfológicos para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y la clasificación en plantas ha sido enfatizado en diversos grupos vegetales (Scotland *et al.*, 2003; Wiens, 2004; Tate *et al.*, 2009). En *Nierembergia*, el agrupamiento de sus especies mediante datos cariológicos resultó consistente con la filogenia basada en datos de secuencias del ADN nuclear y del cloroplasto (Tate *et al.*, 2009).

La carencia de información citogenética hasta la fecha de *Exodeconus*, dificultaba el estudio comparativo de los cariotipos, limitando una discusión más profunda sobre la probable participación de cambios cromosómicos en la evolución del género, en sus procesos de especiación así como el establecimiento de algún tipo de especialización del genoma en relación con el hábitat. Esto indica la necesidad de realizar estudios

filogenéticos y citogenéticos moleculares más detallados para determinar el origen de la heterocromatina o los cambios morfológicos, que contribuyan con su tratamiento taxonómico y a evidenciar patrones evolutivos del mismo. Por ende, con el fin de aportar datos adicionales sobre el género que contribuyan a esclarecer la sistemática y evolución del mismo, se propone extender los análisis aquí realizados a las especies faltantes (*E. miersii* y *E. pusillus*) y ampliar los resultados con nuevos análisis citogenéticos y filogenéticos.

## VI. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se obtuvieron datos cromosómicos de cuatro de las seis especies del género *Exodeconus* (*E. maritimus*, *E. prostratus*, *E. flavus* y *E. integrifolius*).
2. Se determina el número cromosómico del género como  $2n = 2x = 24$ .
3. Los métodos citogenéticos empleados permitieron identificar y caracterizar a todos los taxones examinados.
4. Las técnicas de bandeo cromosómico y FISH permitieron evidenciar una variabilidad natural interespecífica en el género.
5. Se encontraron tres tipos de heterocromatina: CMA+/DAPI-, CMA+/DAPIo, siendo estas las más abundantes en el género, y CMA+/DAPI+, solo en *E. maritimus*.
6. Se propone la existencia de heterocromatina que no fue expuesta mediante triple tinción CDD, pero que pudo observarse luego de FISH.
7. Existe variabilidad de los loci 45S entre las especies estudiadas. *Exodeconus maritimus* se destaca por poseer sitios 45S inactivos.
8. La presencia de un organizador nucleolar en el par cromosómico n° 10 con morfología submetacéntrico permite detectar homeologías cromosómicas en *E. prostratus*, *E. flavus* y *E. integrifolius*.
9. La filogenia basada en caracteres citológicos es coincidente con aquella generada previamente por Axelius, 1994.
10. La filogenia obtenida corrobora a *E. maritimus* como el taxón basal del género.

## VII. AGRADECIMIENTOS

Esta tesina ha sido posible gracias a la colaboración de varias personas y/o instituciones.

Primeramente, agradezco al IMBIV (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal), especialmente al Laboratorio de Citogenética, por permitirme llevar a cabo mis tareas, a todo el personal correspondiente que me brindó su permanente asistencia y por los espacios y materiales utilizados.

Agradezco a la Dra. Marisel A. Scaldaferro por su constante guía en la elaboración del presente trabajo, por su paciencia, su colaboración y su plena atención y disposición. A la Dra. Gloria E. Barboza, quien codirigió esta tesina, por el suministro de los materiales utilizados, la identificación de los mismos y su colaboración cuando las circunstancias se dificultaron. Al Prof. Segundo Leiva González, a pesar de no haber llegado a conocerlo, por el material suministrado y compartido, los cuales fueron fundamentales para la realización de esta tesina y por las hermosas fotografías de las especies analizadas y expuestas en este trabajo.

A Alejandra Trenchi, por sus conocimientos de microscopía y el asesoramiento técnico brindado.

A los integrantes del tribunal evaluador, Dr. Gabriel Bernardello, Dr. Raúl González Ittig y Dra. Marisel A. Scaldaferro, por su disponibilidad y buena predisposición y por sus correcciones y sugerencias para hacer de este trabajo su mejor versión.

Doy gracias a mis amigos y compañeros de carrera, por estos cinco años de cursado, por su apoyo y compañerismo, sin ellos no hubiera sido lo mismo; especialmente a Nani y Eliana, que a pesar de todos los tropiezos, seguimos adelante.

Por último, agradezco enormemente a mi familia, por estar siempre a mi lado, a pesar de la distancia. A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento y en toda situación y a mi hermano por su paciencia en los últimos años de la carrera.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA M. C., BERNARDELLO G., GUERRA M., MOSCONE E. A. 2005. Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon* 54: 713-723.
- ACOSTA M. C., GUERRA M., MOSCONE E. A. 2012. Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount. *Plant Syst. Evol.* 298. 8: 1547-1556.
- ACOSTA M. C., ORDÓÑEZ A. V., COCUCCI A. A., MOSCONE E. A. 2006. Chromosome reports in South American Nicotianeae (Solanaceae), with particular reference to *Nierembergia*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 93: 634-646.
- AXELIUS B. 1994. The genus *Exodeconus* and some comments on its relation with *Nicandra* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 193: 153-172.
- BADR A., KHALIFA S. F., ABOEL-ATTA A. I., ABOU-EL-ENAIN M. M. 1997. Chromosomal criteria and taxonomic relationships in the Solanaceae. *Cytologia* 62: 103-113.
- BARROS A. E. & GUERRA M. 2010. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, Federal University of Pernambuco. 50: 670-420.
- BARBOZA G. E. 2013. *Exodeconus* & *Jaborosa*. En G. Barboza (coord.). Solanaceae, Flora Argentina 13: 291-309.
- BATTAGLIA E. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8: 179-187.
- BAYLIS G. T. S. 1963. A cytogenetical study of the *Solanum aviculare* species complex. *Aust. J. Bot.* 11: 168-177.
- BERNARDELLO G., STIEFKENS L., LAS PEÑAS M. L. 2008. Karyotype studies in *Grabowskia* and *Phrodus* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 275: 265-269.
- BERNARDELLO L. M. & ANDERSON G. J. 1990. Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 77: 420-431.
- BERNARDELLO L. M., HEISER C. B., PIAZZANO M. 1994. Karyotypic studies in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 81: 95-103.

- BOWEN C. C. 1956. Freezing by liquid carbon dioxide in making slides permanent. *Stain Tech.* 31: 87-90.
- CHIARINI F. & BERNARDELLO G. 2006. Karyotype studies in South American species of *Solanum* subgen. *Leptostemonum* (Solanaceae). *Plant Biol.* 8: 486-493.
- CHIARINI F., MORENO N. C., BARBOZA G. E., BERNARDELLO G. 2010. Karyotype characterization of Andean Solanoideae (Solanaceae). *Caryologia* 63: 278-291.
- DARLINGTON C. D. & JANAKI-AMMAL E. K. 1945. Adaptive isochromosomes in *Nicandra*. *Annals Bot.* 9: 267-281.
- DATSON P. M. & MURRAY B. G. 2006. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome* 14: 845-857.
- DEANNA R., BARBOZA G. E., SCALDAFERRO M. A. 2014. First karyological report in *Larnax* and *Deprea* (Solanaceae). *Austr. J. Bot.* 62: 251-261.
- DILLON M. 2005. The Solanaceae of the lomas formations of coastal Peru and Chile. En R. C. Keating, V. C. Hollowell & T. B. Croat (eds.), *A Festschrift for William G. D'Arcy, The legacy of a taxonomist*, *Monogr. Syst. Bot.* 104: 132-156.
- DUBCOVSKY J. & DVORAK J. 1995. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the triticeae genomes. *Genetics* 140: 1367-1377.
- ELLIS R. H., HONG T. D., ROBERTS E. H. 1985. Handbook of seed technology for Genebanks 2. Compendium of specific germination, information and test recommendations. Handbook form Genebanks 3. (International Board for Plant Genetic Resources: Rome).
- FERNANDES T., REGO L., NARDY M., YUYAMA P., VANZELA L. 2009. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.*
- FLAVELL R. 1982. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence. *Genome Evolution*. (Dover, G.A. and Flavell, R.B., eds.). Academic Press, London, pp. 301-323.

- FRY K. & SALSER W. 1977. Nucleotide sequence of HS- $\alpha$  satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodent. *Cell* 12: 1069-1084.
- FUKUI K. & MUKAI Y. 1988. Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants. *Jpn. J. Genet.* 63: 359-366.
- GERLACH W. L. & BEDBROOK J. R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids.* 7: 1869-1885.
- GOLOBOFF P., FARRIS J., NIXON K. 2003. T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology. <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/tnt>.
- GREILHUBER J. & EHRENDORFER F. 1988. Karyological approaches to plant taxonomy, in Grimwade AM (ed): *Atlas of Science: Animal and Plant Science.* vol. 1. pp 289-297
- GREILHUBER J. & SPETA F. 1976. C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia (Liliaceae)*. *Plant Syst. Evol.* 126: 149-188.
- GUERRA M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1029-1041.
- GUERRA M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, Federal University of Pernambuco. *Cytogenet Genome* 120: 339-350.
- HOSHI Y., PLADER W., MALEPZY S. 1999. Physical mapping of 45S rRNA gene loci in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) using fluorescence in situ hybridization. *Caryologia* 52: 49-57.
- HUNZIKER A. T. 2001. *Genera Solanacearum. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system.* A.R.G. Gantner Verlag K.-G., Ruggell.
- HUNZIKER A. T. & BARBOZA G. E. 1998. Estudios sobre *Solanaceae* XLV. Sobre la presencia de *Exodeconus* en Argentina y una novedad en *Capsicum baccatum*. *Kurtziana* 26: 23-31.
- JIMÉNEZ R., BURGOS M., DIAZ DE LA GUARDIA R. 1988. A study of the Agstaining significance in mitotic NORs. *Heredity* 60:125-127.
- JONG J. 1997. 'Laboratory manual of plant cytological techniques.' (Royal Botanical Garden: Edinburgh).

- KOO D., CHOI H., CHO J., HUR Y., BANG J. 2005. A high resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'Winter Long') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence in situ hybridization. *Genome* 48: 534-540.
- LEVAN A., FREDGA L., SANDBERG A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Heredity* 52: 201-220.
- LIM K. Y., MATYÁŠEK R., LICHTENSTEIN C. P., LEITCH A. R. 2000. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma* 109: 245-258.
- MENZEL M. Y. 1950. Cytotaxonomic observations in some genera of the Solanaceae: *Margaranthus*, *Saracha* and *Quincula*. *Am. J. Bot.* 37: 25-30.
- MIGUEL V., ACOSTA M. C., MOSCONE E. A. 2012. Karyotype analysis in two species of *Solanum* (Solanaceae) Sect. *Cyphomandropsis* based on chromosome banding. *New Zeal. J. Bot.* 50: 217-225.
- MOSCONE E. A. 1989. Estudios citotaxonómicos en las tribus Solaneae y Nicotianeae (Solanaceae) de América del Sur. PhD. Tesis. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- MOSCONE E. A. 1993. Estudios cromosómicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Análisis cariotípico en *C. parvifolium* y *C. annuum* var. *Annuum*. *Kurtziana* 22: 9-18
- MOSCONE E. A., LOIDL J., EHRENDORFER F., HUNZIKER A. T. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Am. J. Bot.* 82: 276-287.
- MOSCONE E. A., MATZKE M. A., MATZKE A. J. M. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105. 5: 321-326.
- MOSCONE E. A., SCALDAFERRO M. A., GRABIELE M., CECCHINI N. M., SÁNCHEZ GARCÍA Y., JARRET R., DAVIÑA J. R., DUCASSE D. A., BARBOZA G. E., EHRENDORFER F. 2007. The evolution of chilli peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. Proceedings of the PAA/Solanaceae Conference in *Acta Horticulturae* 745: 137-169 (International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium; ISSN 0567-7572).
- MOYETTA N. R., STIEFKENS L. B., BERNARDELLO G. 2013. Karyotypes of South

- American species of the Morelloid and Dulcamaroid clades (*Solanum*, Solanaceae).  
*Caryologia* 66: 333-345.
- NAVARRO E., GONZÁLES P., CANO A., MONTESINOS-TUBÉE D., ROQUE J. 2012.  
*Exodeconus integrifolius* (Phil.) Axelius (Solanaceae): un nuevo registro para la flora peruana y notas sobre la distribución del género. Abstract in scientific journal or proceedings. *Plant Ecology and Nature Conservation*.
- NAKAMURA R., KITAMURA S., INOUE M., OHMIDO N., FUKUI K. 2001. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. *Theor. Appl. Genet.* 102: 810-814.
- OKADA H. 1975. Karyomorphological studies of wood Polycarpicae. *J. Sci. Hiroshima Univ. (Ser. B, Div. 2)* 15: 115-200.
- PILLEN K., PINEDA O., LEWIS C. B., TANKSLEY S. D. 1996. Status of genome mapping tools in the taxon Solanaceae. *Genet. Mol. Biol.* 32. 2: 320-327.
- POZZOBON M. T., SCHIFINO-WITTMANN M. T., BIANCHETTI L. B. 2006. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x = 12$  and  $x = 13$  represent two evolutionary lines?. *Bot. J. Linn. Soc.* 151: 259-269.
- RAINA S. N. & KHOSHOO T. N. 1971. Cytogenetics of tropical bulbous ornamentals III: mitotic mosaicism in  $3x$  *Crinum augustum*. *Theoret. Appl. Genet.* 41: 375-378.
- RAINA S. N. & MUKAI Y. 1999. Detection of a variable number of 18S–5.8S–26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescence ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome* 4: 486-490.
- RASKINA O., BELYAYEV A., NEVO E. 2004. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome* 12: 153-161.
- REDI C. A., GARAGNA S., ZACHARIAS H., SUCCOTTI M., CAPANNA. E. 2001. The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136-147.
- REGO L. N. A. A., DA SILVA C. R. M., TOREZAN J. M. D., GAETA M. L., LAFORGA VANZELA A. L. 2009. Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 279: 93-102.

- ROMERO ZARCO C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- SATO S., MATSUMOTO E., KUROKI Y. 1981. Satellite association of the nucleolar chromosomes in a plant. *Protoplasma* 108: 139-147.
- SCALDAFERRO M. A., GRABIELE M., MOSCONE E. A. 2013. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Genet. Resour. Crop Ev.* 60: 693-709.
- SCALDAFERRO M. A., ROMERO DA CRUZ M. V., CECCHINI N. M., MOSCONE E. A. 2016. FISH and AgNor-mapping of the 45S and 5S rRNA genes in wild and cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Genome* 59: 95-113 .
- SCOTLAND R. W., OLMSTEAD R. G., BENNETT J. R. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Syst. Biol.* 52: 539-548.
- SCHWARZACHER T., AMBROS P., SCHWEIZER D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant. Syst. Evol.* 134: 293-297.
- SCHWEIZER D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 190-193.
- SCHWEIZER D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57: 1-14.
- SCHWEIZER D. & AMBROS P. F. 1994. Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. In: Gosden JR (ed.). *Methods in molecular biology* 29. Chromosome analysis protocols, pp. 97-112. Humana Press, Totowa.
- SCHWEIZER D. & LOIDL J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: Stahl A., Luciani J. M., Vagner-Capodano A. M. (eds). *Chromosomes Today* 9: 61-74.
- SHEIDAI M., MOSALLANEJAD M., KHATAMSAZ M. 1999. Karyological studies in *Hyoscyamus* species of Iran. *Nord. J. Bot.* 19: 369- 373.
- STEBBINS G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. E. Arnold Publ., London.
- STIEFKENS L. & BERNARDELLO G. 2005. Karyotype studies in *Lycium* sections *Schistocalyx* and *Sclerocarpellum* (Solanaceae). *Edinburgh Journal of Botany* 62: 53-67

- SUDA Y. 1975. Somatic chromosome number and chromosomal morphology of *Anemone hepatica* L. var. *japonica* (Nakai) Ohwi. *Cytologia* 40: 693-711.
- TATE J. A., ACOSTA M. C., McDILL J., MOSCONE E. A., SIMPSON B. B., COCUCCIA. A. 2009. Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological, and cytogenetic evidence. *Syst. Bot.* 34: 198-206.
- TIE-YAO T., HANG S. ZHI-JIAN G. JI-PEI Y. 2005. Cytological studies on the Sino-Himalayan endemic *Anisodus* and four related genera from the tribe Hyoscyameae (Solanaceae) and their systematic and evolutionary implications. *Bot. J. Linn. Soc.* 147: 457-468.
- WEISS-SCHNEEWEISS H. & SCHNEEWEISS G. M. 2013. Karyotype diversity and evolutionary trends in Angiosperms. *Plant Gen Div* 2: 209-230.
- WIENS J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Syst. Biol.* 53: 653-661.
- ZURITA F., JIMÉNEZ R., DÍAZ DE LA GUARDIA R., BURGOS M. 1999. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and in situ hybridization study. *Chromosome* 7: 563-570.

**IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

**TABLA 3. Medidas de cromosomas somáticos de cuatro especies de *Exodeconus* ( $2n = 24$ ) con tinción de Feulgen.** Entre paréntesis, luego del nombre de cada especie, se indica el número de metafases y de individuos analizados en cada uno de ellos, respectivamente. Abreviaturas: r, índice braquial; LTCH, longitud total del complemento haploide; m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subtelocéntrico; NOR, región organizadora nucleolar; X, valor promedio; de, desviación estándar.

Par	Longitud total		r (q/p)	Tipo
	Absoluta ( $\mu\text{m}$ )	Relativa (% de LTCH)		
	$\chi$	(de)	$\chi$	(de)
<i>Exodeconus maritimus</i> , SLG 5586 (8, 5)				
1	1,58 (0,32)	8,96	1,13 (0,06)	m
2	1,43 (0,18)	8,10	1,20 (0,12)	m
3	1,21 (0,27)	6,82	1,14 (0,05)	m
4	1,19 (0,29)	6,70	1,25 (0,29)	m
5	1,02 (0,19)	5,76	1,21 (0,16)	m
6	0,95 (0,08)	5,37	1,48 (0,28)	m-NOR
7	1,90 (0,34)	10,75	2,27 (0,43)	sm
8	1,87 (0,35)	10,56	2,00 (0,39)	sm
9	1,73 (0,30)	9,76	2,22 (0,33)	sm



10	1,68 (0,42)	9,52	2,01 (0,83)	sm
11	1,57 (0,32)	8,89	3,05 (0,61)	st
12	1,56 (0,25)	8,81	3,07 (0,29)	st

---

***Exodeconus prostratus*, SLG 5657 (10, 5)**

1	1,34 (0,13)	9,66	1,10 (0,06)	m
2	1,32 (0,15)	9,46	1,20 (0,10)	m
3	1,29 (0,15)	9,27	1,32 (0,25)	m
4	1,28 (0,19)	9,22	1,10 (0,08)	m
5	1,28 (0,18)	9,18	1,17 (0,09)	m
6	1,22 (0,18)	8,78	1,12 (0,07)	m
7	1,13 (0,15)	8,10	1,27 (0,16)	m
8	1,18 (0,15)	8,51	2,05 (0,27)	sm
9	1,08 (0,16)	7,74	2,20 (0,30)	sm-NOR
10	1,03 (0,17)	7,43	2,27 (0,51)	sm-NOR
11	0,94 (0,15)	6,76	3,22 (0,84)	st
12	0,82 (0,14)	5,90	3,02 (0,75)	st

---

***Exodeconus flavus* SLG s/n° (7, 4)**

1	1,24 (0,29)	9,70	1,18 (0,12)	m
2	1,16 (0,28)	9,04	1,13 (0,06)	m
3	1,14 (0,23)	8,95	1,58 (0,18)	m

---

4	1,10 (0,28)	8,61	1,45 (0,46)	m
5	1,08 (0,25)	8,45	1,15 (0,18)	m
6	1,08 (0,21)	8,43	1,19 (0,18)	m
7	0,89 (0,14)	6,96	1,08 (0,03)	m
8	1,21 (0,27)	9,47	2,12 (0,38)	sm
9	1,14 (0,17)	8,89	1,96 (0,52)	sm
10	1,09 (0,21)	8,52	2,85 (0,82)	sm-NOR
11	0,88 (0,13)	6,90	3,07 (0,53)	st
12	0,78 (0,12)	6,09	3,52 (0,89)	st

---

***Exodeconus integrifolius* GEB 3944 (4, 3)**

1	1,29 (0,14)	9,95	1,16 (0,10)	m
2	1,23 (0,13)	9,48	1,18 (0,15)	m
3	1,19 (0,12)	9,24	1,08 (0,04)	m
4	1,13 (0,08)	8,72	1,17 (0,08)	m
5	1,12 (0,11)	8,65	1,22 (0,12)	m
6	1,09 (0,15)	8,40	1,13 (0,08)	m
7	1,02 (0,09)	7,88	1,17(0,13)	m
8	0,97 (0,12)	7,53	1,09 (0,07)	m
9	0,97 (0,17)	7,48	1,14 (0,13)	m
10	1,10 (0,05)	8,51	2,44 (0,8)	sm-NOR
11	0,92 (0,23)	7,13	2,41 (0,08)	sm
12	0,91 (0,05)	7,03	2,89 (0,29)	sm

**TABLA 5. Medidas de cromosomas somáticos de cuatro especies de *Exodeconus* (2n = 24) mediante bandeo de fluorescencia.** Entre paréntesis, luego del nombre de cada especie, se indica el número de metafases y de individuos analizados en cada uno de ellos, respectivamente, Abreviaturas: r, índice braquial; q, longitud del brazo largo; p, longitud del brazo corto; bhc, banda heterocromática; LTCH, longitud total del complemento haploide; m, cromosoma metacéntrico; sm, submetacéntrico; st, subtelocéntrico; NOR, región organizadora nucleolar; X, valor promedio; de, desviación estándar, Las bandas son terminales excepto aquellas señaladas con ^: banda intercalar, \*: banda asociada a NOR y ': banda pericentromérica. Los números entre paréntesis ubicados debajo de la posición de bandas intercalares indican la distancia de éstas al centrómero (di).

Par	Longitud total		r (q/p)	Tipo	Posición de bhc	Longitud de bhc	
	Absoluta ( $\mu$ m)	Relativa (% de LTCH)				Absoluta ( $\mu$ m)	Relativa (% de LTCH)
	$\chi$ (de)					$\chi$ (de)	
<b><i>Exodeconus maritimus</i>, SLG 5586 (8, 4)</b>							
1	2,83 (0,70)	9,72	1,20 (0,18)	m-NOR	p	0,25 (0,05)	0,86
					q*	0,36 (0,10)	1,23
2	2,48 (0,38)	8,52	1,17 (0,18)	m-NOR	p	0,19 (0,04)	0,65
					q*	0,22 (0,04)	0,75
3	2,08 (0,36)	7,14	1,16 (0,11)	m	p	0,14 (0,05)	0,48
					q	0,16 (0,04)	0,55
4	1,97 (0,24)	6,77	1,16 (0,17)	m	p	0,19 (0,03)	0,65
					q	0,18 (0,03)	0,62

5	1,89 (0,31)	6,51	1,15 (0,09)	m	p	0,15 (0,03)	0,52
					q	0,15 (0,01)	0,52
6	1,26 (0,30)	4,32	1,13 (0,2)	m-NOR	p*	0,29 (0,06)	0,99
7	3,11 (0,46)	10,69	1,92 (0,26)	sm-NOR	p	0,14 (0,03)	0,48
					q*	1,07 (0,13)	3,67
8	2,95 (0,46)	10,14	1,95 (0,35)	sm	p	0,16 (0,03)	0,55
					q	1,04 (0,22)	3,6
9	2,75 (0,29)	9,44	1,98 (0,17)	sm-NOR	q* <sup>^</sup> (19,49) (43,99)	0,12 (0,03)	0,41
						0,12 (0,01)	0,41
10	2,65 (0,39)	9,09	1,80 (0,62)	sm	p	0,22 (0,01)	0,75
					q	0,89 (0,13)	3,05
11	2,63 (0,38)	9,04	3,07 (0,50)	st	q	0,50 (0,17)	1,71
12	2,51 (0,44)	8,63	3,02 (0,45)	st	q	0,52 (0,11)	1,78

***Exodeconus prostratus*, SLG 5657 (9, 7)**

1	1,85 (0,22)	9,46	1,11 (0,06)	m			
2	1,78 (0,14)	9,10	1,17 (0,08)	m	p'	0,05 (0,01)	0,25
					q'	0,05 (0,01)	0,25
3	1,76 (0,19)	9,01	1,22 (0,21)	m			
4	1,75 (0,21)	8,93	1,11 (0,06)	m	p'	0,05(0,01)	0,25
					q'	0,05(0,01)	0,25
5	1,73 (0,19)	8,82	1,14 (0,11)	m	p'	0,06(0,01)	0,30
					q'	0,06(0,01)	0,30

6	1,70 (0,17)	8,71	1,12 (0,10)	m	p'	0,06(0,02)	0,30
					q'	0,06(0,02)	0,30
7	1,66 (0,17)	8,47	1,16 (0,11)	m			
8	1,71 (0,17)	8,75	1,74 (0,17)	sm	p'	0,05(0,01)	0,25
					q'	0,05(0,01)	0,25
9	1,49 (0,26)	7,64	1,84 (0,27)	sm-NOR	p	0,17(0,05)	0,87
					p*	0,19(0,04)	0,97
10	1,40 (0,21)	7,18	1,94 (0,44)	sm-NOR	p	0,20(0,07)	1,02
					p*	0,17(0,04)	0,87
11	1,37 (0,19)	7,01	3,89 (0,65)	st			
12	1,35 (0,12)	6,91	3,83 (0,60)	st			

---

***Exodeconus flavus*, SLG s/n° (9, 5)**

1	1,89 (0,16)	9,96	1,10 (0,07)	m	p	0,12 (0,01)	0,63
					q	0,15(0,02)	0,79
2	1,71 (0,20)	9,05	1,16 (0,10)	m	p	0,12(0,01)	0,63
					p'	0,06(0,01)	0,32
					q	0,12(0,02)	0,66
					q'	0,06(0,01)	0,32
3	1,70 (0,18)	8,99	1,59 (0,22)	m	p	0,14(0,01)	0,73

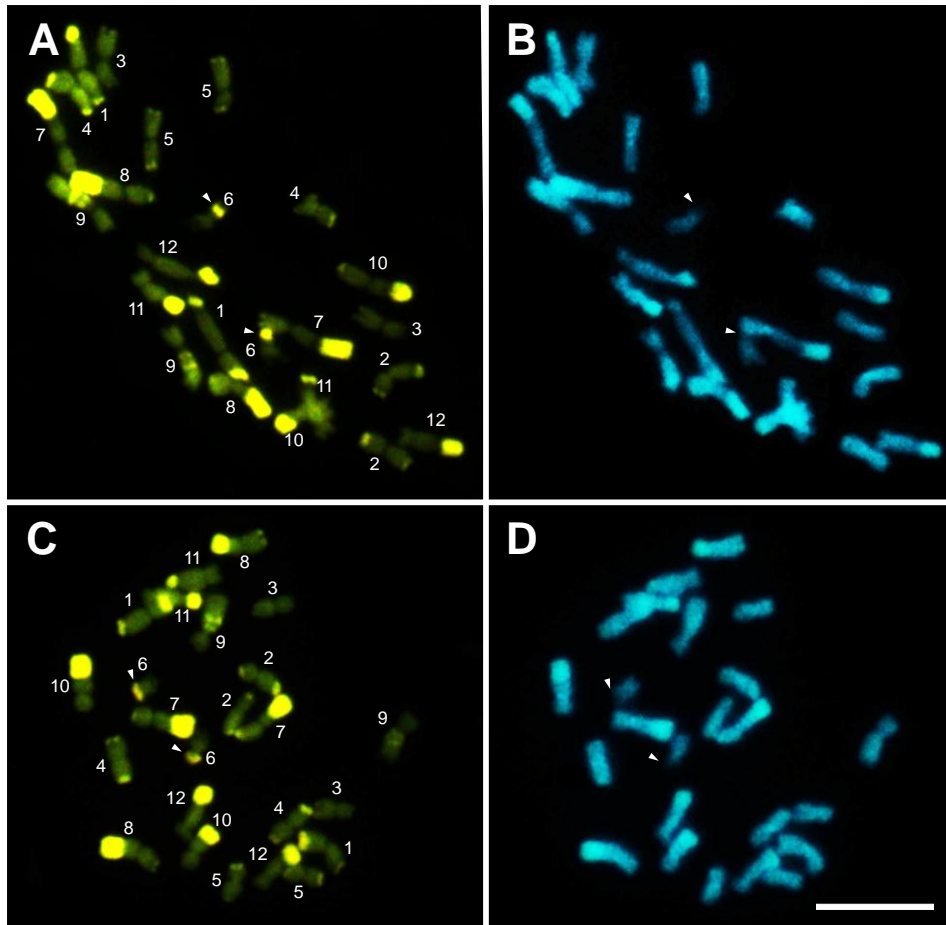
---

						q	0,17(0,03)	0,90
4	1,70 (0,21)	8,98	1,17 (0,12)	m	p	0,13(0,01)	0,68	
					q	0,11(0,03)	0,59	
5	1,66 (0,14)	8,77	1,15 (0,07)	m	p	0,14(0,01)	0,73	
					q	0,14(0,01)	0,72	
6	1,55 (0,10)	8,19	1,15 (0,15)	m	p	0,11(0,01)	0,61	
					p'	0,06(0,01)	0,32	
					q	0,12(0,03)	0,65	
					q'	0,06(0,01)	0,32	
7	1,54 (0,19)	8,13	1,17 (0,13)	sm	p	0,13(0,03)	0,69	
					q	0,13(0,02)	0,71	
8	1,76 (0,16)	9,30	1,91 (0,24)	sm	p	0,11(0,01)	0,59	
					q	0,14(0,06)	0,77	
9	1,66 (0,19)	8,77	1,79 (0,10)	sm	p	0,13(0,02)	0,71	
					q	0,14(0,02)	0,73	
10	1,55 (0,19)	8,20	1,94 (0,61)	sm-NOR	p*	0,25(0,04)	1,34	
					q	0,16(0,05)	0,85	
11	1,21 (0,16)	6,39	3,28 (0,64)	st	p	0,12(0,01)	0,61	
					q	0,16(0,03)	0,84	
12	1,00 (0,10)	5,28	3,08 (0,54)	st	q	0,14(0,01)	0,74	

***Exodeconus integrifolius*, GEB 3944 (5, 3)**

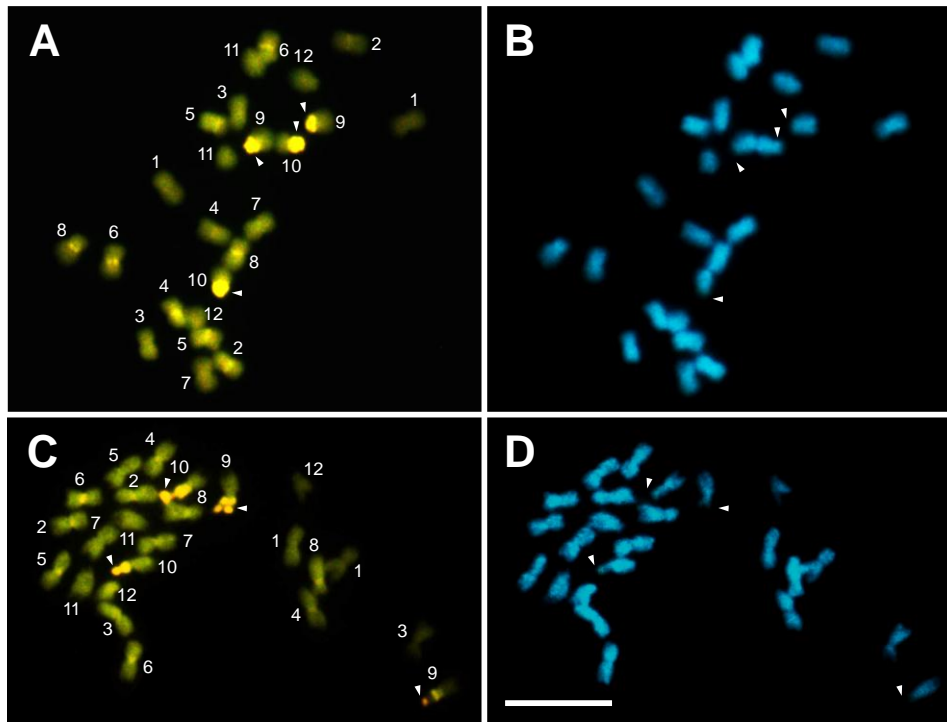
1	2,19 (0,28)	10,46	1,21 (0,10)	m			
2	1,99 (0,33)	9,53	1,21 (0,07)	m			
3	1,94 (0,28)	9,27	1,10 (0,06)	m			
4	1,90 (0,29)	9,09	1,11 (0,06)	m			
5	1,89 (0,24)	9,04	1,18 (0,11)	m			
6	1,83 (0,27)	8,75	1,21 (0,13)	m			
7	1,76 (0,28)	8,42	1,08 (0,04)	m			
8	1,70 (0,28)	8,16	1,21 (0,18)	m			
9	1,67 (0,26)	8,01	1,57 (0,09)	m	p	0,17	0,81
					q	0,18	0,86
10	1,45 (0,30)	6,93	2,48 (0,66)	sm-NOR	p*	0,26	1,24
					p	0,21	1,00
11	1,30 (0,14)	6,22	2,43 (0,20)	m	p'	0,20	0,90
					q'	0,19	0,90
12	1,28 (0,05)	6,12	2,15 (0,32)	m	p	0,21	1,00
					q	0,17	0,81

**Fig. 10.** Metafases somáticas luego del bandeo de fluorescencia en *E. maritimus* ( $2n = 24$ ). **A, C.** Bando CMA. **B, D.** Bando DAPI. Los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flechas señalan la heterocromatina CMA+/DAPI- asociada a las NORs. La escala representa 10  $\mu$ m.

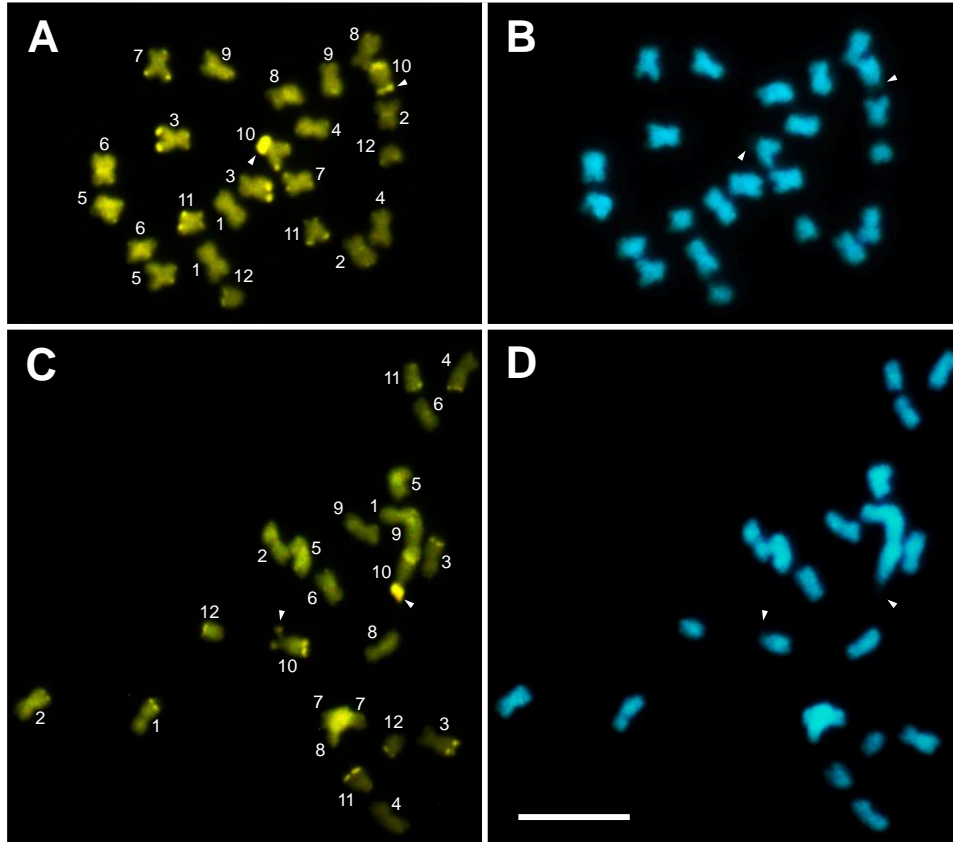




**Fig. 11.** Metafases somáticas luego del bandeo de fluorescencia en *E. prostratus* ( $2n = 24$ ). **A, C.** Bando CMA. **B, D.** Bando DAPI. Los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flechas señalan la heterocromatina CMA+/DAPI- asociada a las NORs. La escala representa 10  $\mu$ m.



**Fig. 12.** Metafasas somáticas luego del bandeo de fluorescencia en *E. flavus* ( $2n = 24$ ). **A,** **C.** Bando CMA. **B, D.** Bando DAPI. Los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flecha señalan la heterocromatina CMA+/DAPI- asociada a las NORs. La escala representa 10  $\mu$ m.



**Fig. 13.** Metafases somáticas luego del bandeo de fluorescencia en *E. integrifolius* ( $2n = 24$ ). **A, C.** Bando CMA. **B, D.** Bando DAPI. Los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. Las puntas de flechas señalan la heterocromatina CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> asociada a las NORs. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

