

MAPEO DE GENES RIBOSÓMICOS Y HETEROCROMATINA EN SEIS ESPECIES DE *LYCIUM* DE SUDAMÉRICA (SOLANACEAE)

SOLEDAD BLANCO, MARÍA LAURA LAS PEÑAS, GABRIEL BERNARDELLO y LAURA STIEFKENS¹

Summary: Mapping of ribosomal genes and heterochromatin in *Lycium* of South America (Solanaceae). The clade Lycieae (Solanaceae) embraces 92 species, currently gathered in a single genus, *Lycium*. A study was conducted in six South American species of this genus, using the FISH technique for the first time in the group, in addition to the CMA/DAPI banding technique. Root tips of the following species were employed: *L. boerhaviifolium* (previously *Grabowskia*), *L. bridgesii* (previously *Phrodus*), the tetraploid *L. chilense* and the diploids *L. cestroides*, *L. ciliatum* and *L. tenuispinosum*. The basic number $x=12$ was confirmed. The banding technique revealed CMA⁺/DAPI⁺ bands associated with NORs in the first *m* pair in the diploid species and in the first two pairs of the tetraploid. In addition, *L. tenuispinosum* showed an intercalary CMA⁺/DAPI⁺ band, while in *L. bridgesii* terminal and intercalary bands were found in all chromosomes. The FISH technique showed that the 18-5.8-26S loci were consistent with CMA⁺/DAPI⁺/NORs blocks. The diploid species had always one *m* pair carrying 5S rDNA genes, while the tetraploid presented two pairs, consistently with its ploidy level. The diversification of the studied species was not accompanied by significant structural chromosomal rearrangements, except for *L. bridgesii* which is outstanding because it has a different karyotype formula and a higher heterochromatin percentage.

Key words: CMA/DAPI banding, fluorescent *in situ* hybridization, *Lycium*.

Resumen: El clado Lycieae (Solanaceae) reúne 92 especies, actualmente agrupadas en un único género, *Lycium*. Se realizó un estudio citogenético en seis especies sudamericanas de este género, usándose por primera vez en el grupo la técnica de FISH, además de la técnica de bandeo CMA/DAPI. Se emplearon ápices radicales de las siguientes especies: *L. boerhaviifolium* (previamente *Grabowskia*), *L. bridgesii* (previamente *Phrodus*), el tetraploide *L. chilense* y los diploides *L. cestroides*, *L. ciliatum* y *L. tenuispinosum*. Se confirmó el número básico $x=12$. La técnica de bandeo reveló la presencia de una banda CMA⁺/DAPI⁺ asociada a NORs en el primer par metacéntrico en las especies diploides, y en los dos primeros pares *m* en la tetraploide. Además, *L. tenuispinosum* mostró una banda intercalar CMA⁺/DAPI⁺ en uno de sus cromosomas, en tanto que en *L. bridgesii* se encontraron bandas terminales e intercalares en todos los cromosomas. Con la técnica de FISH se observó que los loci 18-5.8-26S fueron consistentes con los bloques CMA⁺/DAPI⁺/NORs. Las especies diploides presentaron siempre un par cromosómico *m* portador de genes ADN 5S, mientras que la especie tetraploide presentó dos pares, concordando con su nivel de ploidía. En las especies estudiadas, la diversificación no fue acompañada por rearrreglos cromosómicos estructurales significativos, excepto *L. bridgesii*, que se destaca por poseer una fórmula cariotípica distinta y un mayor porcentaje de heterocromatina.

Palabras clave: Bando CMA/DAPI, hibridación *in situ* fluorescente, *Lycium*.

INTRODUCCIÓN

La familia Solanaceae está compuesta por 7 clados (Olmstead *et al.*, 2008), siendo Solanoideae

el más importante en cuanto a número de especies. Dentro de este clado se destaca Lycieae (tradicionalmente conocido como tribu *Lycieae* Hunz.), con 92 especies, anteriormente repartidas entre los géneros *Phrodus* Miers, *Grabowskia* Schltdl. y *Lycium* L., pero actualmente asignadas en su totalidad a este último género (Levin *et al.*, 2011).

Lycieae probablemente se originó en América

¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC-CONICET), C.C. 495, 5000 Córdoba. laurastiefkens@yahoo.com.ar

del Sur hace aproximadamente 5 Ma, con posterior dispersión hacia América del Norte. También hubo un único evento de dispersión de Sudamérica a África aproximadamente 3,5 Ma atrás (Levin *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2011.). Actualmente *Lycium* vive en todo el mundo y su área de distribución natural es en regiones templadas y tropicales, con centros de diversidad en el sur de América del Sur, el sur de África y el suroeste de América del Norte (Miller *et al.*, 2011).

El conocimiento de estas plantas tiene particular importancia ecológica por las adaptaciones al xerofitismo y a la halofilia que poseen sus integrantes, lo cual les permite crecer principalmente en hábitats áridos y semiáridos.

En *Lycium*, el número cromosómico básico es $x=12$, siendo la mayoría de las especies diploides con $2n=24$ (e.g., Bernardello, 1982; Chiang, 1982; Stiefkens & Bernardello, 1996, 2000, 2002, 2006; Bernardello *et al.*, 2008). A la fecha, se conocen con técnicas clásicas los números cromosómicos y los cariotipos de especies de *Lycium* de Sudamérica, Norteamérica, Sudáfrica y Asia, totalizando aproximadamente el 50% de las especies del género (Stiefkens & Bernardello, 1996, 2000, 2002, 2006; Sheidai *et al.*, 1999; Dongli *et al.*, 2000; Bernardello *et al.*, 2008; Stiefkens *et al.*, 2009, 2010).

La técnica de bandeo cromosómico CMA/DAPI pone en evidencia bloques de heterocromatina constitutiva (HC) generalmente asociadas a constricciones secundarias en Angiospermas, pero además se pueden detectar bloques heterocromáticos ricos en secuencias de pares de nucleótidos de Guanina-Citosina (GC) y bandas heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos Adenina-Timina (AT), las cuales no pueden ser detectadas con las técnicas clásicas (Guerra, 2000). Estos caracteres actúan como marcadores aplicables a la identificación de pares cromosómicos y la reorganización estructural dentro del genoma, así como para analizar la distribución de la heterocromatina dentro y entre especies, permitiendo comparar cariotipos entre taxones emparentados (Moscone *et al.*, 1996; Guerra, 2000; Souza & Benko-Iseppon, 2004; Gitai *et al.*, 2005; Las Peñas *et al.*, 2008). La técnica de bandeo cromosómico fluorescente CMA/DAPI fue ampliamente utilizada en especies de Solanaceae como *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1996; 2007b), *Cestrum* (Berg & Greilhuber, 1992, 1993a, 1993b; Fregonezi *et al.*, 2006) y *Solanum* (Srebnik *et al.*,

2002; Rego *et al.* 2009). Con esta técnica, fueron estudiadas apenas 15 especies norteamericanas y sudafricanas de *Lycium* (Stiefkens *et al.*, 2009, 2010). No obstante, no se han aplicado estas técnicas de bandeo en *Lycium* de Sudamérica.

Por su parte, el empleo de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) permite establecer nuevos tipos de marcadores cromosómicos para el análisis comparado de los cariotipos, localizar diversos genes y secuencias repetitivas a lo largo del cromosoma y construir mapas físicos para diferentes especies vegetales (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993). La hibridación *in situ* de diferentes secuencias de ADN permite marcar uno o varios genes en los cromosomas del complemento y compararlos entre especies. Esta técnica ha sido utilizada en varios géneros de Angiospermas, por ejemplo en *Brassica* (Brassicaceae, Ziolkowsky & Sadowsky, 2002), *Lilium* (Liliaceae, Lim *et al.*, 2001), *Urvillea* (Sapindaceae, Urdampilleta *et al.*, 2006) y *Cephalanthera* (Orchidaceae, Moscone *et al.*, 2007a). En Solanaceae los estudios de FISH han mostrado que las especies de la familia poseen una amplia variación tanto en la ocurrencia como en distribución de los sitios de ADN repetitivo (Kitamura *et al.*, 2001; Fregonezi *et al.*, 2006; Rego *et al.*, 2009). Hasta el momento, no se han aplicado en ningún integrante de Lyceae.

Sobre estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo es estudiar los cromosomas mitóticos de 6 especies de *Lycium* con bandeo fluorescente CMA/DAPI y FISH, atendiendo a sus características cualitativas y cuantitativas a fin de tener un panorama más completo de la evolución cromosómica en el clado y sus implicancias sistemáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Lycium boerhaviifolium L. f.: ARGENTINA. Catamarca, Dpto. La Paz. 26-V-2004, F. Chiarini 623; *L. bridgesii* (Miers) Levin, Miller & Bernardello: CHILE. Atacama. 30-VI-2004, G. Bernardello 909; *L. cestroides* Schltdl.: ARGENTINA. Córdoba, Dpto Colón, Río Ceballos, estancia Santo Domingo. 55. 10-II-2011, Las Peñas *et al.* 518; *L. chilense* var. *chilense* Miers ex Bertero: ARGENTINA. Córdoba, Dpto Colón, Río Ceballos, estancia Santo

Domingo. 55. 10-II-2011, Las Peñas *et al.* 520; *L. ciliatum* Schltdl.: ARGENTINA. Córdoba, Dpto Colón, Río Ceballos, estancia Santo Domingo. 55. 10-II-2011, Las Peñas *et al.* 519; *L. tenuispinosum* var. *tenuispinosum* Miers: ARGENTINA. Córdoba, Dpto. Tulumba, Tulumba, ruta 60 km 893. 08-I-2011, G. Bernardello 722. Todas las determinaciones fueron efectuadas por G. Bernardello.

El estudio de los cromosomas mitóticos se efectuó en células meristemáticas obtenidas por aplastamiento de ápices radicales, provenientes de la germinación de semillas. Se estudiaron 10 individuos por especie, analizando en todos los casos un mínimo de 10 metafases. Los ápices radicales se pretrataron con solución acuosa saturada de paradichlorobenceno durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la fijación en una mezcla 3:1 de alcohol etílico absoluto: ácido acético glacial (preparada en el momento de ser usada) durante 24 horas a temperatura ambiente y luego se conservaron en freezer hasta su uso.

Bandeo cromosómico fluorescente CMA/DAPI

Las preparaciones cromosómicas, se llevaron a cabo mediante digestión enzimática de las raíces con Pectinex a 37°C durante 30 minutos y luego fueron aplastadas con ácido acético 45%. Posteriormente los cubreobjetos se retiraron por congelamiento con nitrógeno líquido (N₂).

La técnica utilizada para el bandeo fue doble tinción fluorescente con Cromomicina A₃ (CMA) y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) según el protocolo descrito por Schwarzach *et al.* (1980) con pequeñas modificaciones: los preparados fueron teñidos con CMA por 90 minutos, lavados y posteriormente teñidos con DAPI por 30 minutos, lavados y finalmente montados con Buffer MacIlvaine: glicerol (1:1). Se conservaron en oscuridad durante 3 a 5 días a 4°C para luego ser observados con microscopio de fluorescencia.

Hibridación in situ fluorescente

Los preparados se llevaron a cabo de la misma manera que para el bandeo cromosómico. La técnica de FISH se realizó siguiendo el protocolo descrito por Schwarzach & Heslop-Harrison (2000), con pequeñas modificaciones. Como sondas se utilizaron regiones de ADN ribosómico 18-5,8-26S (pTa71, Gerlach & Bedbrook, 1979) y 5S obtenida por PCR a partir de ADN genómico de

Solanum stuckertii utilizando los primer 5S rDNA-3 (5'-GTG CTT GGG CGA GAG TAG TA-3') y 5SrDNA-4 (5'-GGT GCG TTA GTG CTG GTA TG-3') (Fulnecek *et al.* 1998).

Los fragmentos de ADN utilizados como sonda fueron marcados con Biotina (Bionick, Invitrogen) y Digoxigenina (DIG Nick translation mix, Roche) mediante la técnica de *nick traslation*. Las señales de hibridación fueron detectadas utilizando Avidina-FITC (Sigma) y anti-DIG-Rodamina (Roche), los cromosomas se colorearon con DAPI.

Las fotomicrografías fueron tomadas en microscopio Zeiss Axiophot y cámara digital Leica DFC300FX utilizando epifluorescencia y los filtros correspondientes para cada fluorocromo. Las bandas heterocromáticas obtenidas con bandeo de fluorescencia fueron medidas en 2-5 placas metafásicas correspondientes a 2-5 individuos de cada especie. Se calculó el porcentaje de heterocromatina asociada a regiones organizadoras nucleolares (% HC-NORs) y no asociada a NORs en relación al largo total del genoma básico, utilizando el programa *Image J* (NIH ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, desarrollado por: National Institutes of Health y disponible en el sitio <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Estos datos se adicionaron a los idiogramas construidos en base a las mediciones cromosómicas obtenidas por Stiefkens (2001) y Bernardello *et al.* (2008), donde el largo de la banda está representado como un porcentaje de la longitud del brazo cromosómico. Para la descripción de los cromosomas se empleó la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). Finalmente, las señales obtenidas mediante la técnica de FISH también fueron localizadas en estos idiogramas.

RESULTADOS

Se corroboraron los números cromosómicos para todas las especies estudiadas, siendo la mayoría diploides con 2n=24. Únicamente *L. chilense* resultó tetraploide con 2n=48 (Tabla 1, Fig. 1).

En todas las especies se detectaron bandas CMA⁺/DAPI⁺ asociadas a constricciones secundarias (NORs) (Tabla 1, Fig. 1, 3). En las especies diploides estudiadas (*L. boerhaviifolium*, *L. bridgesii*, *L. cestroides*, *L. ciliatum* y *L. tenuispinosum*), estas regiones se encontraron siempre en el primer par metacéntrico, ubicadas en la constricción

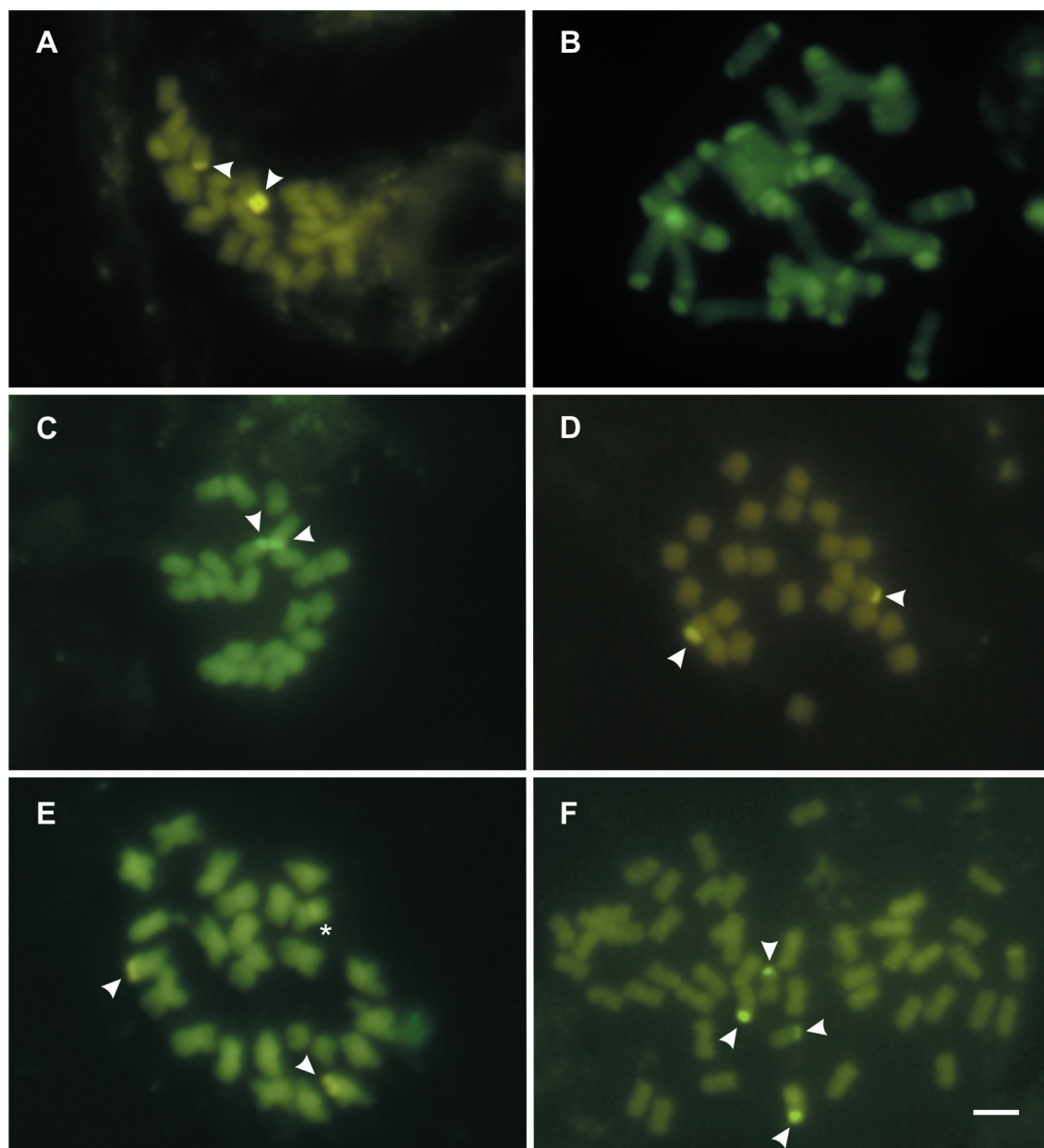


Fig. 1. Cromosomas metafásicos de *Lycium* teñidos con doble tinción fluorescente CMA/DAPI. **A:** *L. boerhaviifolium*. **B:** *L. bridgesii*. **C:** *L. cestroides*. **D:** *L. ciliatum*. **E:** *L. tenuispinosum* (asterisco señala la banda CMA⁺/DAPI⁻ en un cromosoma del par 5). **F:** *L. chilense*. Las cabezas de flechas indican las bandas CMA⁺/DAPI⁻ asociadas a NORs. Barra= 3 µm, todas las fotos a la misma escala.

secundaria. En la única especie tetraploide estudiada (*L. chilense*) se vieron estas bandas CMA⁺/DAPI⁻ ubicadas en los dos primeros pares cromosómicos, encontrándose también diferencias en sus tamaños (Fig. 1F). En *L. boerhaviifolium* estas bandas fueron

heteromórficas (Fig. 1A). En *L. tenuispinosum*, se visualizó, asimismo, la presencia de una banda CMA⁺/DAPI⁻ intercalar en un cromosoma *m* del par 5 (Fig. 1E), en tanto que en *L. bridgesii* se encontraron bandas terminales e intercalares en

Tabla 1. Datos cromosómicos de las especies de *Lycium* examinadas con las técnicas de bandeo cromosómico fluorescente CMA/DAPI y FISH. Número cromosómico (N° crom), fórmula cariotípica (FC), número de pares cromosómicos con bandas CMA⁺/DAPI⁺ asociadas a NORs (CMA-NOR), porcentaje de heterocromatina CMA⁺/DAPI⁺ asociada a NORs por genoma haploide (%HC), número de bandas CMA⁺/DAPI⁺ no asociadas a NORs (CMA), número de señales correspondientes a los loci ribosómicos 18-5,8-26S (45S) y 5S (5S), -- = no se observaron.

Especie	N° crom	FC	CMA-NOR	% HC	CMA	45S	5S
<i>L. boerhaviifolium</i>	2n=24	11m + 1sm	primer par	0,984	--	1 par	par 5
<i>L. bridgesii</i>	2n=24	8m + 3sm + 1st	primer par	0,851	todos los pares	todos los pares	par 6
<i>L. cestroides</i>	2n=24	11m + 1sm	primer par	0,715	--	1 par	par 10
<i>L. ciliatum</i>	2n=24	11m + 1sm	primer par	1,407	--	1 par	par 7
<i>L. tenuispinosum</i>	2n=24	11m + 1sm	primer par	1,678	1 crom	1 par	par 4
<i>L. chilense</i>	2n=48	22m + 2sm	dos primeros pares	0,477	--	2 pares	par 17 y 18

todos los cromosomas. (Tabla 1, Fig. 1B). La cantidad de heterocromatina CMA⁺/DAPI⁺ asociada a NORs en relación al largo total del genoma básico de las especies estudiadas varió en un rango de 0,477% en *L. chilense* (tetraploide) a 1,678% en *L. tenuispinosum* (Tabla 1). Para *L. bridgesii* se calculó el porcentaje de heterocromatina total en relación al largo del genoma básico, donde se incluyeron todas las bandas, obteniéndose un valor de 7,647% (Fig. 1B).

A través de la técnica de FISH se observó que la distribución de los genes ribosómicos fue consistente con el patrón de bandas CMA⁺/DAPI⁺ asociadas a NORs. Todas las especies diploides presentaron señales para el gen ADN_r 18-5,8-26S en el primer par *m*, mientras que *L. chilense* (tetraploide) presentó señales en dos pares (Fig. 2, 3). En *L. bridgesii*, la hibridación de la sonda 18-5,8-26S se detectó en el primer par *m* asociada a la constricción secundaria, además la sonda hibridó en varios pares en regiones terminales e intercalares (Tabla 1, Fig. 2B, 3B).

En todas las especies diploides, los loci para 5S se localizaron en un solo par cromosómico *m* y en la poliploide en dos pares, en regiones paracentroméricas del brazo corto. Cabe destacar que los genes 5S se encontraron siempre en cromosomas distintos a los que contenían los genes 18-5,8-26S (Tabla 1, Fig. 2).

DISCUSIÓN

Solanaceae exhibe una serie dispoloide con número básico que va desde $x=7$ hasta $x=13$, donde $x=12$ es la cifra más común, apareciendo en más del 50% de las especies estudiadas. Los integrantes del clado Solanoideae al que pertenece Lycieae, presentan en su gran mayoría $x=12$, a excepción de *Nicandreae* Wettst. con $x=10$, 11 (Hunziker, 1979) y una pocas especies de *Solanum* con $2n = 22$ (Chiarini & Bernardello, 2006), $2n = 46$ (Beuzenberg & Hair, 1983) o $2n = 92$ (Melo *et al.*, 2011). Además, según los datos disponibles hasta el presente, $x=12$ sería el número básico de Lycieae (Ratera, 1943; Khyos, 1971; Di Fulvio, 1977; Choudhuri, 1943; Chiang, 1982, 1983; Bernardello, 1982, 1985; Hunziker *et al.*, 1985; Chiang *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos confirman este número básico, no encontrándose diferencias entre los taxones.

La poliploidía es bien conocida en varias especies de *Lycium* en todo el mundo. Los niveles de ploidía más comunes son $4x$, $6x$ y $8x$, mientras que $3x$ y $10x$ fueron raramente observados (Fedorov, 1969; Bernardello, 1982; Chiang, 1982; Venter, 2000). Debe destacarse que es más común en especies sudafricanas, donde aproximadamente el 30% son poliploides (Spies *et al.*, 1993; Minne *et al.*, 1994; Venter, 2000, 2007; Stiefkens *et*

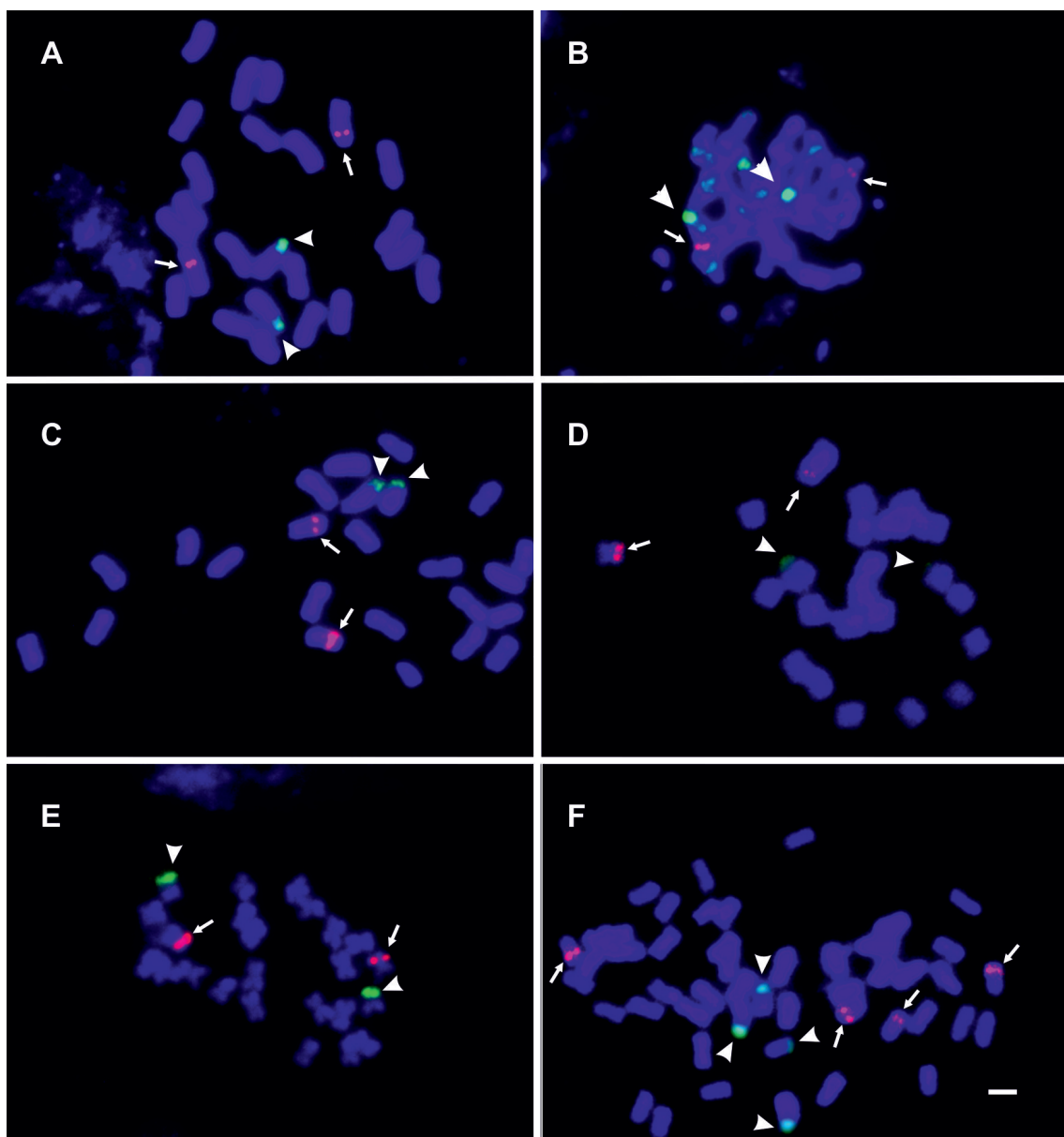


Fig. 2. Hibridación *in situ* fluorescente en cromosomas metafásicos de *Lycium* **A:** *L. boerhaviifolium*. **B:** *L. bridgesii*. **C:** *L. cestroides*. **D:** *L. ciliatum*. **E:** *L. tenuispinosum*. **F:** *L. chilense*. Las flechas indican señal de hibridación para la sonda ADNr 5S y las cabezas de flecha indican la señal de hibridación para la región ADNr 18-5,8-26S. Barra= 3 μ m, todas las fotos a la misma escala.

al., 2010). Por el contrario, es poco frecuente en especies americanas, encontrándose en alrededor del 15% (Lewis, 1961; Baquar *et al.*, 1965; Chiang, 1982; Bernardello, 1982; Stiefkens & Bernardello, 2000, 2006). En entidades sudamericanas se había observado poliploidía en *L. chilense* y *L. ciliatum*

(Bernardello, 1982; Stiefkens & Bernardello, 2000, 2006), hallándose en este trabajo una población poliploide de *L. chilense* var. *chilense*.

En estudios previos de bandeo en *Lycium*, las especies mostraron bandas terminales CMA+/- DAPI- en el primer par *m*. Estos bloques se

encontraron asociados a regiones NOR (Stiefkens *et al.*, 2009, 2010). La composición de la heterocromatina rica en GC asociada a NORs, como la encontrada en *Lycium* es constante en Angiospermas (Schweizer, 1979; Morawetz, 1986; Guerra, 2000; Urdampilleta *et al.*, 2006; Las Peñas *et al.*, 2008). Stiefkens *et al.* (2009, 2010) sugieren que estas bandas pueden estar restringidas a esa posición en especies de este género. Nuestros resultados concuerdan con los resultados previos en el género. Por otro lado, en *L. bridgesii* se encontró gran cantidad de bandas terminales e intercalares, en contraposición a lo descrito por Guerra (2000), que señala que estas bandas son poco frecuentes en Angiospermas con cromosomas pequeños. Este fenómeno también fue observado en una especie de *Lycium* poliploide de Norteamérica (*L. exsertum*, $2n=48$; Stiefkens *et al.*, 2009).

Los bloques adicionales de heterocromatina, encontrados en posición terminal en la mayoría de los cromosomas de *L. bridgesii*, comienzan en el brazo corto o largo y eventualmente se extienden a ambos. Esta tendencia es consistente con el modelo de dispersión de heterocromatina propuesto por Schweizer & Loidl (1987), quienes postulan que la transferencia de heterocromatina entre cromosomas no homólogos en posiciones equilocales y entre brazos de longitud similar se encuentra favorecido por la proximidad en la interfase nuclear durante la mitosis (Schweizer & Loidl, 1987; Moscone *et al.*, 1996). Este modelo coincide con el patrón de bandas encontrado en cromosomas no homólogos para *L. bridgesii*.

Se calculó por primera vez el porcentaje de heterocromatina asociada a NORs para *Lycium*, observándose que no presentaron grandes diferencias, tanto entre las especies diploides como en la tetraploide. Con respecto a la presencia de bandas de heterocromatina no asociadas a NORs, en Angiospermas en general se encuentran relacionadas con mayor tamaño del genoma (Greilhuber, 1984; Moscone *et al.*, 1996; Benko-Iseppon & Morawetz, 2000); esto coincide con los resultados obtenidos para *L. bridgesii*, con un genoma de mayor tamaño relacionado a la cantidad de bandas encontradas.

También se aplicó por primera vez en *Lycium* la técnica de FISH. En todas las especies diploides, se encontraron dos sitios de ADN_r 18-5,8-26S y cuatro en la especie tetraploide (*L. chilense*),

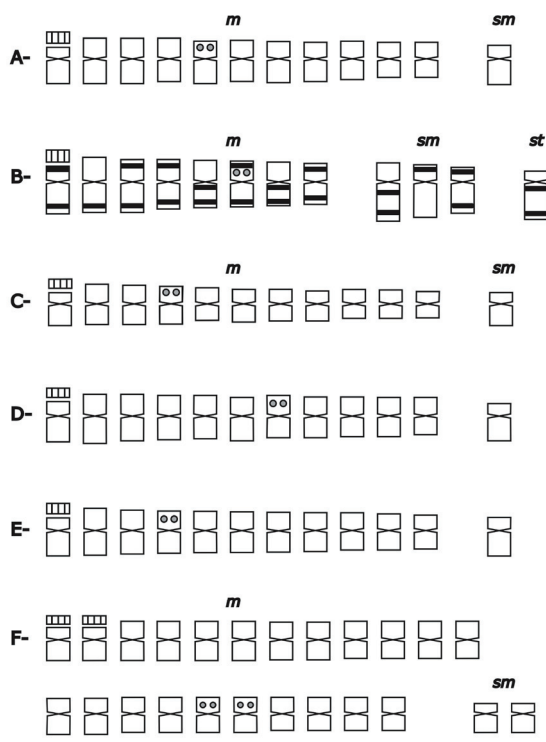


Fig. 3. Idiogramas de las especies de *Lycium* estudiadas. **A:** *L. boerhaviifolium*. **B:** *L. bridgesii*. **C:** *L. cestroides*. **D:** *L. ciliatum*. **E:** *L. tenuispinosum*. **F:** *L. chilense* (tetraploide). = regiones CMA⁺/DAPI asociadas a NORs y de ADN_r 18-5,8-26S, = regiones de ADN_r 5S, = regiones CMA⁺/DAPI. Barra= 3µm.

coincidiendo en todos los casos con las bandas CMA⁺/DAPI/NOR, ubicadas en el primer par *m*. En *L. tenuispinosum* no se encontró la banda intercalar detectada con la técnica de bandeo cromosómico CMA/DAPI, es decir que se trata de una región rica en pares de bases GC, pero que no presenta secuencia homóloga al ADN_r 18-5,8-26S. *L. bridgesii* mostró un patrón de señales de 18-5,8-26S que coinciden con los bloques CMA⁺/DAPI, encontrándose gran cantidad en los extremos del cromosoma, como así también en regiones intercalares. Esta hibridación puede deberse a que la heterocromatina GC posee secuencias homólogas al ADN_r 18-5,8-26S. Este fenómeno se observó en algunas especies de *Nicotiana* y *Solanum*, donde se identificaron regiones pericentroméricas que poseían secuencias altamente homólogas a

espaciadores intergénicos de ADNr (Stupard *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004).

La posición del ADNr 5S fue siempre intersticial, como es característico de Angiospermas (Kulak *et al.*, 2002; Shibata & Hizume, 2002; Seijo *et al.*, 2004). En Solanaceae, se han realizado numerosos estudios de FISH, encontrándose que en la mayoría de las especies diploides la sonda 5S hibrida en un solo par cromosómico (Montijn *et al.*, 1999; Youn Kyu *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2001; Fregonezi *et al.*, 2006; Rego *et al.*, 2009), como aquí fue hallado en las especies diploides.

Los poliploides presentan una tendencia a reducir los sitios duplicados debido a mecanismos de diploidización y silenciamiento génico (Leitch & Bennet, 1997). La presión de selección por reducir el número de sitios de ADNr parece ser menor en los loci 18-5,8-26S debido a la existencia de mecanismos de homogeneización inter loci más eficientes para esta secuencia que para la ADNr 5S (Cronn *et al.*, 1996). Por este motivo la probabilidad de hallar sitios 5S duplicados es mayor en neopoliploides que en paleopoliploides (Cronn *et al.*, 1996). En este estudio se encontró que la sonda 5S hibridó en dos pares cromosómicos en *L. chilense* (tetraploide), sugiriendo un origen reciente en su nivel de ploidía.

La aplicación conjunta de las técnicas de bandeo fluorescente y FISH permitió postular una homeología del primer par cromosómico entre las especies estudiadas. En todas las diploides se diferenció el primer par metacéntrico por su tamaño, morfología y presencia de un microsatélite en el brazo corto. Este par fue fácilmente distinguible por presentar una banda fluorescente CMA⁺/DAPI asociada a la NOR y por ser portador de locus 18-5,8-26S. En el caso de la especie poliploide, este patrón se observó en los dos primeros pares cromosómicos. Estos datos concuerdan con estudios previos en *Lycium* (Stiefkens & Bernardello, 1996, 2000, 2002, 2006; Bernardello *et al.*, 2008; Stiefkens *et al.*, 2009, 2010). Sin embargo, la localización de los sitios 5S no se pudo utilizar para distinguir los pares, debido a que los cromosomas metacéntricos en todas las especies son de tamaño muy similar.

En general se puede observar que la diversificación de la mayoría de las especies de *Lycium* no fue acompañada por rearrreglos cromosómicos estructurales significativos. Sin embargo, en *L. bridgesii* sí es posible que hayan ocurrido tales cambios, ya que se puede observar una fórmula

cariotípica (la más asimétrica, Bernardello *et al.*, 2008), patrones de bandeo fluorescente y señales de hibridación diferentes a lo encontrado en las demás especies. *L. bridgesii* se encuentra en la base del árbol en la filogenia de Lycieae propuesta por Levin *et al.* (2011), lo que indicaría que esta especie divergió primero y por eso es tan diferente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- BAQUAR, S. R., S. AKHTAR, & A. HUSAIN. 1965. Meiotic chromosome numbers in some vascular plants of Indus Delta. *I. Bot. Not.* 118: 289-298.
- BENKO-ISEPPON, A. M. & W. MORAWETZ. 2000. Cytological comparison of Calyceraceae and Dipsacaceae with special reference to their taxonomic relationships. *Cytologia* 65: 123-128.
- BERG, C. & J. GREILHUBER. 1992. Cold-sensitive chromosome regions and their relation with constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome* 35: 921-930.
- BERG, C. & J. GREILHUBER. 1993a. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigilatum*, *C. fasciculatum* and *C. elegans*. *Pl. Syst. Evol.* 185: 133-151.
- BERG, C. & J. GREILHUBER. 1993b. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 185: 259-273.
- BERNARDELLO, G., L. STIEFKENS & M. L. LAS PEÑAS. 2008. Karyotype studies in *Grabowskia* and *Phrodus* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 275: 265-269.
- BERNARDELLO, L. M. 1982. Estudios en *Lycium* (Solanaceae). II. Recuentos cromosómicos en entidades argentinas. *Hickenia* 1: 321-328.
- BERNARDELLO, L. M. 1985. El número cromosómico de *Phrodus microphyllus* (Solanaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24: 196-197.
- BEUZENBERG, E. J. & J. B. HAIR. 1983. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora - 25 miscellaneous species. *New Zealand J. Bot.* 21: 13-20.

- CHIANG, F. 1982. Estudios cromosómicos en *Lycium* (Solanaceae) de Norteamérica. *Bol. Soc. Bot. México* 43: 9-23.
- CHIANG, F. 1983. El número cromosómico de *Grabowskia geniculata*. *Bol. Soc. Bot. México* 45: 141-142.
- CHIANG, F., R. VIVEROS, & P. MERCADO. 1989. El número cromosómico de *Lycium leiospermum* I. M. Johnston (Solanaceae). *Bol. Soc. Bot. México* 48: 145-146.
- CHIARINI, F. & G. BERNARDELLO. 2006. Karyotypic studies in South American species of *Solanum* subgen. *Leptostemonum* (Solanaceae). *Pl. Biol. (Stuttg)* 8: 486-493.
- CHOUDHURI, H. C. 1943. Cytological and genetical studies in the genus *Solanum*: wild and native cultivated potatoes. *Trans. Roy. Soc. Edin.* 61: 113-135.
- CRONN, R. C., S. ZHAO, A. H. PATERSON & J. F. WENDWL. 1996. Polimorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *J. Molec. Evol.* 42: 685-705.
- DI FULVIO, T. E. 1977. Recuentos cromosómicos en Angiospermas argentinas III. *Kurtziana* 10: 69-72.
- DONGLI, Z., X. HONGMEI, H. ZHONG & W. LUNSHAN. 2000. Karyotype analysis of *Lycium barbarum* L. of China. *J. Lanchow Univ. Na. Sci.* 36: 97-100.
- FEDOROV, A. (ed.). 1969. Chromosome numbers of flowering plants. V. L. Komarov. *Bot. Inst. Leningrad* (Reprinted by O. Koeltz Sci. Publ., Koenigstein, 1974).
- FREGONEZI, J. N., T. FERNANDES, J. M. D. TOREZAN, A. O. S. VIEIRA & A. L. L. VANZELA. 2006. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Gen. Molec. Biol.* 29: 97-104.
- FULNECEK, J., R. MATYÁSEK, A. KOVARIK & M. BEZDEK. 1998. Mapping of 5-methylcytosine residues in *Nicotiana tabacum* 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Molec. Gen. Genet.* 259:133-141.
- GERLACH, W. L. & J. L. BEDBROOK. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7: 1869-1885.
- GITAÍ, J., R. HORRES & A. M. BENKO-ISEEPPON. 2005. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Pl. Syst. Evol.* 253: 65-80.
- GREILHUBER, J. 1984. Chromosomal evidence in taxonomy. En: *Current concepts en plant taxonomy* (Heywood, V. H. & Moore, D. M. eds), Academic Press, London.
- GUERRA, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Molec. Biol.* 23: 1029-1041.
- HUNZIKER, A. T. 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In: J. C. Hawkes, Lester, R. N. & Skelding A. D. (Eds). *The biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linnean Soc. Symp.* ser. 7: 49-85.
- HUNZIKER, A. T., C. C. XIFREDA & A. F. WULFF. 1985. Estudios cromosómicos en Angiospermas de Sudamérica. *Darwiniana* 26: 7-14.
- KHYOS, D. 1971. *Lycium*. En: I. L. Wiggins & D. M. Porter, *Flora of the Galápagos Island*. Stanford University Press, Stanford. p. 468.
- KITAMURA, S., M. INOUE, N. SHIKAZONO & A. TANAKA. 2001 Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 103: 678-686.
- KULAK, S., R. HASTEROK & J. MALUSZYNSKA. 2002. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. *Hereditas* 136: 144-150.
- LAS PEÑAS, M. L., G. BERNARDELLO & R. KIESLING. 2008. Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Pl. Syst. Evol.* 272: 211-222.
- LEITCH, I. J. & M. D. BENNET. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* 2: 470-476.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- LEVIN, R. A., J. R. SHAK, G. BERNARDELLO, A. M. VENTER & J. S. MILLER. 2007. Evolutionary relationship in the tribe *Lycieae* (Solanaceae). En D. M. Spooner, L. Bohs, J. Giovannoni, R. G. Olmstead and D. Shibata (Eds), "Solanaceae VI: Genomic Meets Biodiversity". *Int. Soc. Hort. Sci. Brugge. Acta Hort.* 745: 225-240.
- LEVIN, R. A., G. BERNARDELLO, C. WHITING & J. S. MILLER. 2011. A new generic circumscription in tribe *Lycieae* (Solanaceae). *Taxon* 60: 681-690.
- LEWIS, W. H. 1961. Chromosomes of North American *Lycium* (Solanaceae). *Texas J. Sci.* 13: 45-48.
- LIM, K., J. WENNEKES, J. H. JONG, E. JACOBSEN & J. M. TUYL. 2001. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence in situ hibridation. *Genome* 44: 911-918.
- LIM, K., K. SKALICKA, B. KOUKALOVA, R. A. VOLKOV, R. MATYASEK, V. HEMLEBEN, A. R. LEITCH & A. KOVARIK. 2004. Dynamic changes in the distribution of a satellite homologous to intergenic 26-18S rDNA spacer in the evolution of *Nicotiana*. *Genetics* 166: 1935-1946.
- MALUSZYNSKA, J & J. HESLOP-HARRISON. 1993. Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: In situ localization of rDNA sites, chromosome numbers

- and diversity in centromeric heterochromatin. *Ann. Bot.* 71: 479-484.
- MELO, C.A.F., M.I.G. MARTINS, M.B.M. OLIVEIRA, A.M. BENKO-ISEPPON & R. CARVALHO. 2011. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Pl. Syst. Evol.* 293: 227-235.
- MILLER, J. S., A. KAMATH, J. DAMASHEK & R. A. LEVIN. 2011. Out of America to Africa or Asia: Inference of dispersal histories using nuclear and plastid DNA and the S RNase self-incompatibility locus. *Molec. Biol. Evol.* 28: 793-801.
- MINNE, L., J. J. SPIES, H. J. T. VENTER & A. M. VENTER. 1994. Breeding system in some representatives of the genus *Lycium* (Solanaceae). *Bothalia* 24: 107-110.
- MONTIJN, M. B., A. B. HOUTSMULLER, R. TEN HOOPEN, J. L. OUD & N. NANNINGA. 1999. The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in *Petunia hybrida* and *Crepis capillaris*. *Chrom. Res.* 7: 387-399.
- MORAWETZ, W. 1986. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Pl. Syst. Evol.* 152: 49-100.
- MOSCONI, E. A., M. LAMBROU & F. EHRENDORFER. 1996. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 202: 37-63.
- MOSCONI, E.A., R., SAMUEL, T. SCHWARZACHER, & D. SCHWEIZER. 2007a. Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution. *Chromosome Res.* 15: 931-943.
- MOSCONI, E. A., M. A. SCALDAFERRO, M. GRABIELE, N. M. CECCHINI, Y. SÁNCHEZ GARCÍA, R. JARRET, J. R. DAVIÑA, D. A. DUCASSE, G. E. BARBOZA & F. EHRENDORFER. 2007b. The evolution of Chili Peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. En D.M. Spooner, L. Bohs, J. Giovannoni, R.G. Olmstead & D. Shibata (Eds), "Solanaceae VI: Genomic Meets Biodiversity". *Int. Soc. Hort. Sci. Brugge. Acta Hort.* 745: 137-169.
- OLMSTEAD R. G., L. BOHS, H. A. MIGID, E. SANTIAGO-VALENTIN, V. F. GARCIA & S. M. COLLIER. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57: 1159-1181.
- RATERA, E. L. 1943. Número de cromosomas de algunas Solanáceas argentinas (1). *Revista Fac. Agron. Vet.* 10: 318-325.
- REGO, L. N. A. A., C. R. M., DA SILVA, J. M. D., TOREZAN, M. L. GAETA & A. L. VANZELA. 2009. Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 279: 93-102.
- SCHWEIZER, D. 1979. Fluorescent chromosome banding in plants: application, mechanisms and implications of chromosome structure. En D. R. Davies & D. A. Hopwood (Eds.) *Proceedings of the Fourth John Innes Symposium*. Crowe, Norwich.
- SCHWEIZER, D. & J. LOIDL. 1987. A model of heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In Stahl, A., Luciani, J. M., Vagner-Capodano, A. M. (Eds): *Chrom. today* 9: 61-74.
- SCHWARZACHER, T., P. AMBROS & D. SCHWEIZER. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl. Syst. Evol.* 134: 293-297.
- SCHWARZACHER, T. & P. HESLOP-HARRISON. 2000. *Practical in situ hybridization*. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford.
- SEIJO, J. G., G. I. LAVIA, A. FERNÁNDEZ, A. KRAPOVICKAS, D. DUCASSE & E. A. MOSCONI. 2004. Physical mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by fish as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of a. hypogaea (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 91: 1294-1303.
- SHEIDAI M., Z. NARENGI & M. KHATAMSAZ. 1999. Karyotype and seed protein analyses of *Lycium* (Solanaceae) in Iran. *Edin. J. Bot.* 56: 253-264.
- SHIBATA, F. & M. HIZUME. 2002. Evolution of 5S rDNA units and their chromosomal localization in *Allium cepa* and *Allium schoenoprasum* revealed by microdissection and FISH. *Theor. Appl. Genet.* 105:167-172.
- SOUZA, M. & A. N. BENKO-ISEPPON. 2004. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 144: 181-191.
- SPIES, J. J., L. MINNE, H. J. T. VENTER & A. M. VENTER. 1993. A cytogenetic study of the functionally dioecious species in the genus *Lycium* (Solanaceae). *South Afr. J. Bot.* 59: 535-540.
- SREBNIK, M., O. RASMUSSEN & J. MALUSZYŃSKA. 2002. Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. *J. Appl. Genet.* 43: 19-31.
- STIEFKENS, L. 2001. Estudios cariotípicos y de contenido de ADN en la tribu *Lycieae* (Solanaceae). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba.
- STIEFKENS, L. & G. BERNARDELLO. 2000. Karyotypes and DNA content in diploid and polyploid *Lycium* (Solanaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35: 237-244.
- STIEFKENS, L. & G. BERNARDELLO. 2002. Karyotypic studies in *Lycium* section *Mesocope* (Solanaceae) from South America. *Caryologia* 55: 199-206.
- STIEFKENS, L. & G. BERNARDELLO. 2006. Karyotypic studies in *Lycium* sections *Schistocalyx* and *Sclerocarpellum* (Solanaceae). *Edin. J. Bot.* 62: 53-67.

- STIEFKENS, L. & L. M. BERNARDELLO. 1996. Karyotypic studies in South American *Lycium* (Solanaceae). *Cytologia* 61: 395-402.
- STIEFKENS, L., M. L. LAS PEÑAS & G. BERNARDELLO. 2009. Cariotipos y bandeo cromosómico fluorescente en seis especies norteamericanas de *Lycium* (Solanaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* (suplemento) 44: 26.
- STIEFKENS, L., M. L. LAS PEÑAS, G. BERNARDELLO, R. A. LEVIN & J. S. MILLER. 2010. Karyotypes and fluorescent chromosome banding patterns in southern African *Lycium* (Solanaceae). *Caryologia* 63: 50-61.
- STUPARD, J., J. SONG, A. L. TEK, Z. CHENG, F. DONG & J. JIANG. 2002. Highly condensed potatoe pericentromeric heterochromatin contains rDNA related tandem repeats. *Genetics* 162:1435-1444.
- URDAMPILLETA, J. D., M. S. FERRUCCI, J. M. D. TOREZAN & L. L. VANZELA. 2006. Karyotype relationships among four South American species of *Urvillea* (Sapindaceae; Paullinieae). *Pl. Syst. Evol.* 258: 85-95.
- VENTER, A. M. 2000. Taxonomy of the genus *Lycium* L. (Solanaceae) in Africa. Ph.D. thesis, University of the Orange Free State, Bloemfontein.
- VENTER, A. M. 2007. *Lycium hantamense* (Solanaceae), a new species from the Hantam–Roggeveld Centre of Plant Endemism, South Africa. *South Afr. J. Bot.* 73: 214-217.
- YOUN-KYU, P., K. BYUNG-DONG, K. BYUNG-SOO, K. C. ARMSTRONG & K. NAM SOO. 1999. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of 5S rRNA and 18S-26S rRNA genes family in five different species in *Capsicum*. *Genes Genet. Syst.* 74: 149-157.
- ZIOLKOWSKY, P. A. & J. SADOWSKY. 2002. FISH-mapping of rDNA and *Arabidopsis* BACs on pachytene complements of selected *Brassica*. *Genome* 45: 189-197.

Recibido el 7 de marzo de 2012, aceptado el 14 de mayo de 2012.

