

**ADICIONES AL CONOCIMIENTO CITOGENÉTICO DE
TITHONIA DIVERSIFOLIA (HEMSL.) A. GRAY (ASTERACEAE)****Additions to the cytogenetic knowledge of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.)
A. Gray (Asteraceae)****Nilda ALCORCÉS de GUERRA¹,
América LÁREZ R.² y Juliana MAYZ F.³**¹ Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería
Agronómica, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas,
Campus "Los Guaritos", Maturín, Monagas, Venezuela.
nildafel@cantv.net^{2,3} Postgrado en Agricultura Tropical, Universidad de Oriente,
Núcleo de Monagas, Campus "Juanico", Maturín,
Monagas, Venezuela.
americalarez@gmail.com, julianamayz@cantv.net**RESUMEN**

Con el objetivo de corroborar el número cromosómico, tamaño, tipo y viabilidad del polen y profundizar el estudio de la meiosis en *Tithonia diversifolia*, se estudiaron meristemas de raíces tratados con colchicina (0,05%) y anteras procedentes de inflorescencias jóvenes, colectadas en diferentes localidades del estado Monagas, Venezuela. Se encontró un número diploide de cromosomas ($2n = 34$) con 16 pares metacéntricos y un par submetacéntrico. Además, se observaron cromosomas rezagados en metafase I y anafase I y asincronía en metafase II, y no se visualizaron núcleos espermáticos en 65% de los granos de polen, anomalías que podrían estar asociadas a la baja fertilidad del polen (35%) detectada en esta especie. Los granos de polen son de tipo triporado y ornamentación muricada, con tamaño promedio de 26,5 μ m. La microsporogénesis resultó ser de tipo simultánea.

Palabras clave: Citogenética, Cromosomas, Meiosis, Microsporogénesis, Mitosis, *Tithonia diversifolia*

ABSTRACT

With the objective of corroborating the chromosomal number, the pollen size, type and viability, in a study of the meiosis of *Tithonia diversifolia*, meristematic root tips treated with colchicine (0,05%) and young inflorescence anthers, collected from different localities of Monagas State, Venezuela, were studied. A diploid chromosome number ($2n = 34$) was found, with 16 metacentric pairs and one submetacentric pair. Lagging chromosomes in metaphase I and anaphase I, and asynchrony in metaphase II were observed. Spermatic nuclei could not be seen in 65% of pollen grains. Abnormalities which may be associated with the low pollen fertility (35%) were detected in this species. Pollen grains were of triporate type and had muricate sculpture, with an average size of 26.5 μ m. The microsporogenesis was of the simultaneous type.

Key words: Chromosomes, Cytogenetic, Meiosis, Microsporogenesis, Mitosis, *Tithonia diversifolia*

INTRODUCCIÓN

Tithonia Desf. ex Juss. es un género americano de la familia Asteraceae, tribu Heliantheae, subtribu Helianthinae (Robinson 1981; Schilling & Panero 2002) constituido por unas 12 especies (La Duke 1982), de las cuales sólo *T. diversifolia* (Hemsl.) A.Gray y *T. rotundifolia* (Mill.) S.F.Blake han sido señaladas para Venezuela (Badillo 2001; MBG 2006). *T. diversifolia* está ampliamente distribuida en el continente americano y ha sido introducida en África y Asia (Nash 1976; Ríos 1993; MBG 2006); es una especie de importancia económica, tanto por su utilidad como abono verde, control de malezas, forraje, uso apícola y medicinal, como por el perjuicio que ocasiona como maleza difícil de erradicar (George *et al.* 2002; Kwabiah *et al.* 2003; Elufioye & Agbedahunsi 2004; Owoyele *et al.* 2004).

Alcorcés (1996) estudió algunos aspectos de la citogenética de *T. diversifolia* con la finalidad de determinar si existen relaciones con *Helianthus annuus* L., en la búsqueda de posible resistencia genética a las enfermedades que han impedido el éxito del cultivo de *H. annuus* en el estado Monagas. Observaciones de campo han evidenciado que la propagación de *T. diversifolia* ocurre principalmente por vía asexual, mientras que la reproducción sexual es escasa o casi nula, esto sugiere problemas en alguna de las fases meióticas. Al estudiar el cariotipo de esta especie se evidenciaron asimetrías intra e intercromosómicas y anomalías en la metafase II. Con estos antecedentes se realizó el presente trabajo con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre la meiosis de *T. diversifolia* y además corroborar el número cromosómico, tamaño, tipo y viabilidad del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectó material silvestre de *Tithonia diversifolia* en diferentes localidades de los municipios Acosta, Caripe, Piar y Maturín, estado Monagas, Venezuela; una parte fue procesada de acuerdo con las técnicas convencionales para estudios fitotaxonómicos y depositada como material de referencia en el herbario del Departamento de Agronomía de la Universidad de Oriente, Maturín (UOJ): Lárez 2374, 2378-2380, 2386, 2389-2392, 2451, 2704, y la otra se utilizó para estudios citogenéticos. La mitosis se observó en meristemas radicales obtenidos de la germinación de aquenios completamente desarrollados y en óptimo estado fitosanitario y la meiosis en inflorescencias en diversas fases de desarrollo.

Para realizar los recuentos cromosómicos, se estableció la hora mitótica de la especie, se colectaron de 10 a 20 ápices radiculares, se trataron con colchicina 0,05% m/v durante 2 h y luego con cloruro de sodio 0,03% m/v, durante 10 min, para incrementar la frecuencia de células metafásicas con cromosomas dispersos; luego fueron fijados en Carnoy I (3:1 etanol absoluto-ácido acético glacial). Para la preparación de las láminas, los ápices fueron colocados en HCl 18% v/v durante

10 min y luego en agua destilada por 10 min. En un portaobjetos fueron disectados, macerados y posteriormente teñidos con orceína acética 2% m/v. Se colocó el cubreobjetos, se realizó el aplastamiento del tejido por presión manual para separar las células y se procedió a detectar células metafásicas con cromosomas dispersos, claramente visibles al microscopio óptico, para analizar el cariotipo de la especie. Las imágenes cariológicas se obtuvieron con la ayuda de un microscopio Zeiss Axioplan M80, lo cual permitió seleccionar 20 células que mostraran cromosomas bien esparcidos, para proceder a medir la longitud de los brazos, determinar el índice centromérico, la relación de la longitud de los brazos y clasificarlos de acuerdo con la nomenclatura de Levan *et al.* (1964).

Para el análisis de los cromosomas meióticos se fijaron inflorescencias jóvenes en Carnoy I (3:1 etanol absoluto-ácido acético glacial) por un tiempo mínimo de 2 h hasta su procesamiento; las anteras se extrajeron con un par de agujas muy finas, bajo un microscopio estereoscópico Cambridge Instruments Z45L, y fueron colocadas en portaobjetos, donde se maceraron, para luego colorearlas con orceína acética 2% m/v; se cubrieron con el portaobjetos, ejerciendo presión sobre ellas para romper el tejido y observar las fases meióticas. Se evaluaron 150 cabezuelas procedentes de diez plantas de diferentes localidades. Para determinar el tamaño promedio y la viabilidad de los granos de polen, se analizaron 1235 y 1548 granos respectivamente. Las fotomicrografías se tomaron en un microscopio Zeiss Axioplan M80, utilizando película Kodak a color de 100 ASA.

RESULTADOS

La observación de los cromosomas somáticos mostró $2n = 34$ (Fig. 1) y los cromosomas en diacinesis $n = 17$ (Fig. 2a). El tamaño de los cromosomas oscila entre 4,56 y 8,00 μm ; el índice centromérico varía entre 32,56 y 44,44 y la relación de los brazos entre 1,25 y 2,07. De 17 pares de cromosomas, 16 son metacéntricos (m) y un par es submetacéntrico (sm), específicamente el par 14. No se observaron constricciones secundarias en ninguno de los brazos cromosómicos. Estos resultados permiten proponer la fórmula cariotípica $32\text{ m} + 2\text{ sm}$, indicando un cariograma simétrico por la predominancia de cromosomas metacéntricos (Fig. 1b), de acuerdo con lo propuesto por Stebbins (1971).

El estudio del polen permitió determinar un tipo triporado y ornamentación muricada (Fig. 2g), con tamaño promedio de 26,5 μm . Se encontró que aproximadamente 65% de los granos de polen carecían de núcleos espermiáticos, indicando una fertilidad de 35%.

Al estudiar el desarrollo de la microsporogénesis, se reconocieron anomalías cromosómicas en 32% de células en metafase I y anafase I: cromosomas rezagados (Fig. 2b, c, d), en la metafase II, 47% de las células presentaron asincronía de un juego de cromosomas y cromosomas rezagados (Fig. 2e, f).

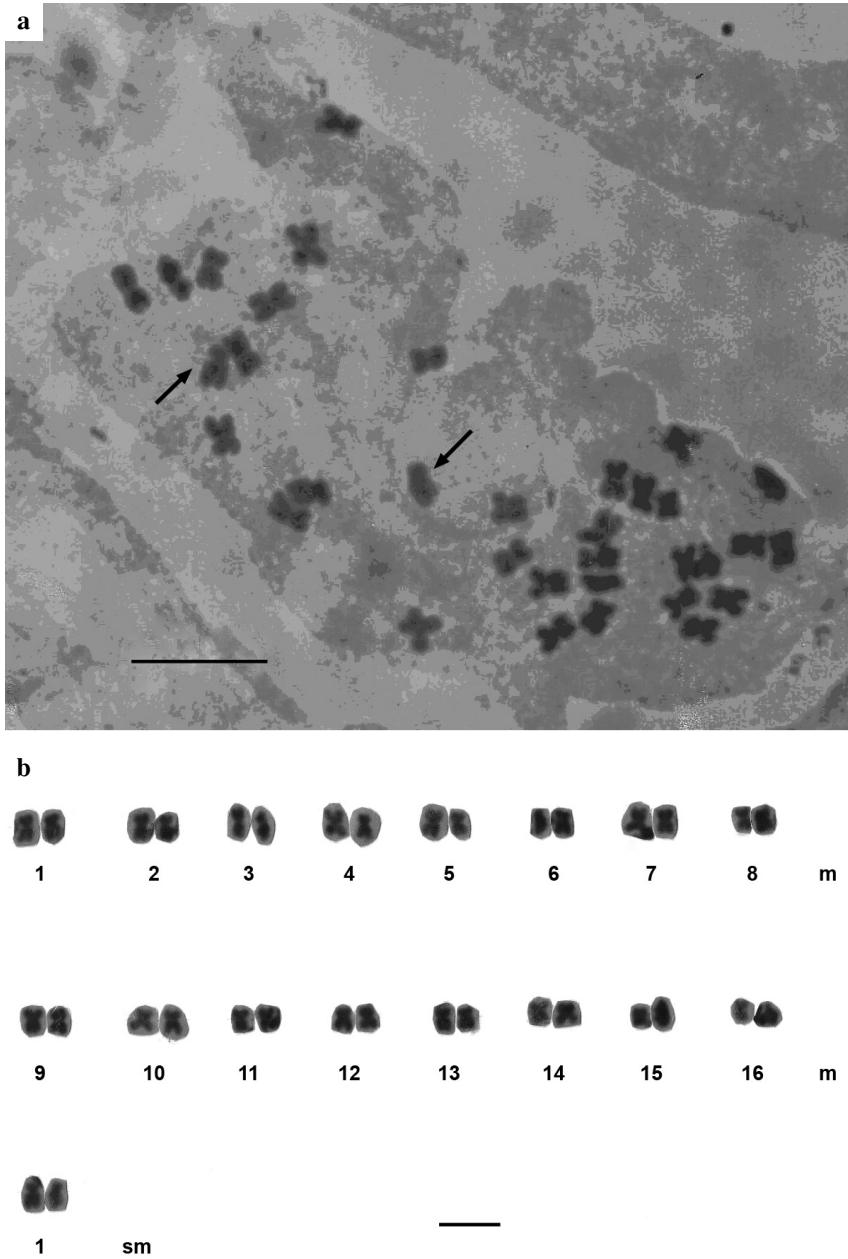


Fig. 1. *Tithonia diversifolia*. **a.** Cariotipo. Cromosomas submetacéntricos indicados con flecha. **b.** Cariograma. Cromosomas metacéntricos (m), submetacéntricos (sm). Escala = 10 μ m

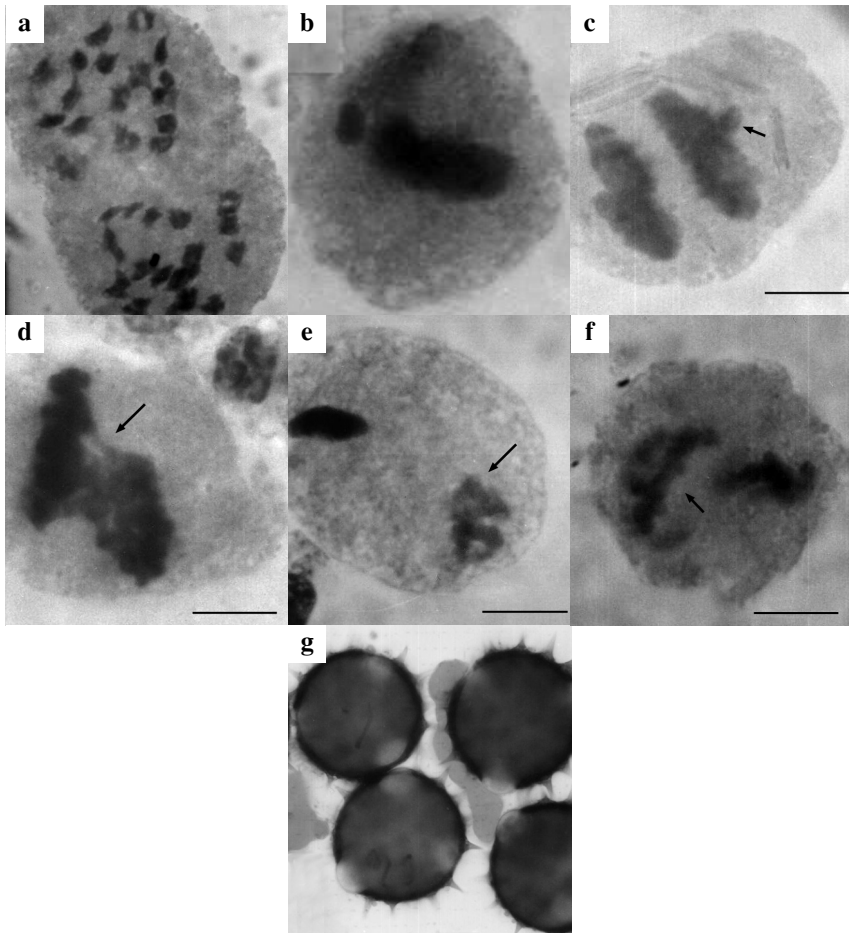


Fig. 2. División meiótica y granos de polen de *Tithonia diversifolia*. **a.** Células en diacitnisis, donde se observan 17 bivalentes. **b.** Célula en metafase I con cromosomas rezagados. **c-d.** Células en anafase I con cromosomas rezagados, no alineados y puentes anafásicos. **e-f.** Células en metafase II, mostrando asincronías cromosómicas. **g.** Polen triporado. Escala = 10 μm

DISCUSIÓN

El estudio cromosómico, mitótico y meiótico permite corroborar el número cromosómico reportado para *Tithonia diversifolia* (Goldblatt & Johnson 1991; Alcorcés 1996). El número básico de la tribu Heliantheae probablemente se corresponde con $x = 8$ ó $x = 9$ (Solbrig *et al.* 1972; Stuessy 1977). De acuerdo a esta hipótesis se podría suponer que el número base $x = 17$, encontrado en *Tithonia diversifolia*, posiblemente es el resultado de poliploidía y sucesivas reducciones

mediante aneuploidía como indicio evolutivo de la tribu (Stuessy 1977). Igualmente la alta frecuencia de cromosomas bivalentes observados en esta especie podría soportar la idea de un posible anfiploide, derivado por hibridación de dos taxones diploides, con posterior duplicación del número cromosómico, situación que también ha sido observada en algunas especies del género *Moricandia* DC. (Brassicaceae) (Valdéz-Bermejo 1970; Sobrino 1978). Smith (1975) y Robinson *et al.* (1981) sugieren que los números $x = 17-19$ son los más primitivos de la tribu y consideran derivados los números más bajos. Esta última propuesta parece más factible, si se toman en consideración otras características observadas en este estudio como son el cariotipo simétrico y el polen triporado, que según Stebbins (1971) y Furness *et al.* (2004) apuntan hacia primitivismo.

El bajo porcentaje de germinación (20%) de los aquenios colectados en las diferentes localidades, puede ser atribuido al alto porcentaje de polen estéril (65%) carente de núcleos espermáticos (Alcorcés 1996). Esto consecuentemente estaría asociado a la baja reproducción sexual que presenta *T. diversifolia*. Se ha observado que en algunas especies de dicotiledóneas los dos núcleos resultantes de la primera división meiótica entran asincrónicamente en la segunda (González *et al.* 2001), lo cual podría resultar en esterilidad masculina, anomalía que también la han relacionado con la orientación del huso, cromosomas rezagados y puentes anafásicos que afectan la conformación de las tétradas (Mendes-Bonato *et al.* 2002). Imery & Cequea (2002), estudiando la microsporogénesis de *Aloe vera*, encontraron baja viabilidad del polen ($39,3 \pm 10,54\%$), relacionándola con hallazgos tales como: quiasmas persistentes entre homólogos grandes y desplazamiento precoz de cromosomas pequeños, presencia de puentes dicéntricos solitarios o acompañados de fragmentos acéntricos en la meiosis I, así como también la presencia ocasional de puentes y fragmentos, además de microsporas adicionales, en la meiosis II; las causas de tales irregularidades las atribuyen a rupturas cromosómicas, errores entre cruzamientos e inversiones paracéntricas heterocigóticas entre homólogos de mayor tamaño. Del mismo modo, Ruvalcaba & Rodríguez (2002) determinaron alto porcentaje de polen estéril en la especie *Agave tequilana* F.A.C. Weber var. azul, como consecuencia de aberraciones cromosómicas (cromosomas rezagados y asincronía cromosómica).

Las razones de la esterilidad del polen en *Tithonia* también podrían converger en las irregularidades observadas en su división meiótica. La presencia de cromosomas rezagados en la anafase I puede deberse a la falta de tensión que las enzimas sensitivas del cinetocoro ejercen sobre las fuerzas del huso, evitando así el arrastre de los cromosomas hacia los polos, o a que al menos uno de los cromosomas esté desalineado, generando señales negativas que la célula identifica (Taylor *et al.* 2004). Estas características también han sido detectadas durante las divisiones meióticas de las especies *Boronia heterophylla* F.Muell., *Passiflora edmundoi* Sacco, *Brachiaria decumbens* Stapf y del híbrido *Rhizophora* \times *selala* Salvoza (Andrada *et al.* 1998; Mendes-Bonato *et al.* 2002; Prakash 2002; Ruvalcaba & Rodríguez 2002; De Souza *et al.* 2003; Shan *et al.* 2003).

Este estudio corrobora la necesidad de determinar el tipo de microsporogénesis en cada especie en particular, en lugar de deducirla de la configuración de las tétradas. En el sentido estricto, la microsporogénesis simultánea es aquella que ocurre cuando la meiosis II sigue inmediatamente a la meiosis I, sin la formación de una placa celular efímera, carácter que ha mostrado ser un indicador aceptable del tipo de microsporogénesis para las monocotiledóneas, pero no para las dicotiledóneas (González *et al.* 2001). Entre las monocotiledóneas predomina la citocinesis sucesiva, mientras que en las dicotiledóneas ocurren ambos tipos (Furness & Rudall 1999; González *et al.* 2001; Furness *et al.* 2002; Mendes-Bonato *et al.* 2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Alcorcés, N. 1996. Estudios citogenéticos comparativos entre *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray y *Helianthus annuus* L. (Asteraceae – Heliantheae). *Oriente Agrop.* 21: 62-79.
- Andrada, A., A. Pastoriza & V. Martínez. 1998. Citogenética en tres especies de Verbenaceae. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 15: 312-318.
- Badillo, V. 2001. Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia* 11: 147-218.
- De Souza, M.M., T.N.S. Pereira, A.P. Viana, M.G. Pereira, L.C. Bernacci, C.P. Sudré & L.C. Silva. 2003. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia* 56(2): 161-169.
- Elufioye, T.O. & J.M. Agbedahunsi. 2004. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. *J. Ethno-pharmacol.* 93(2): 167-171.
- Furness, C.A. & P.J. Rudall. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Ann. Bot.* 84: 475-499.
- Furness, C.A., P.J. Rudall & B.F. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Pl. Sci.* 163: 235-260.
- Furness, C.A., P. J. Rudall & B.F. Sampson. 2004. Pollen aperture evolution – a crucial factor for eudicot success? *Trends Plant Sci.* 9 (3): 154-158.
- George, T.S., P.J. Gregory, M. Wood, D. Read & R.J. Buresh. 2002. Phosphate activity and organic acids in the rizosphere of potential agroforestry species and maize. *Soil Biol. Biochem.* 34(10): 1487-1494.
- Goldblatt, P. & D.E. Johnson. 1991. Index pl. chromosome numbers 1988-1989. *MSB's* 40: 96-99.
- González, F., P. Rudall & C. Furness. 2001. Microsporogenesis and systematics of Aristolochiaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 137: 221-242.
- Imery, J. & H. Cequea. 2002. Anormalidades cromosómicas en la microsporogénesis de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). *Acta Bot. Venez.* 25(2): 143-152.
- Kwabiah, A.B., N.C. Stoskopf, C.A. Palm & R.P. Voroney. 2003. Soil P availabi-

- lity as affected by the chemical composition of plant materials implications for P-limiting agriculture in tropical Africa. *Agric. Eco-syst. Environm.* 100(1): 53-61.
- La Duke, J.C. 1982. Revision of *Tithonia*. *Rhodora* 84: 453-522.
- Levan, A., K. Fredga & A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 5: 201-220.
- Mendes-Bonato, A.B., R. Junqueira, M.S. Pagliarini, C.B. Valle & M.I. Oliveira. 2002. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens* abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biol. Int. Rep.* 26(7): 641-646.
- Mendes-Bonato, A.B., C. Risso-Pascoto, M.S. Pagliarini & C.B. Valle. 2003. Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *Genet. Mol. Biol.* 26(4): 517-520.
- Missouri Botanical Garden (MBG). *W3 Tropicos specimen data base 2006* [online]. [cited 12 April 2006]. Available from: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>
- Nash, D. 1976. Flora de Guatemala. *Fieldiana, Bot.* 24(12): 323-325.
- Owoyele, V., C. Wuraola, A. Soladoye & S. Olaleye. 2004. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *J. Ethno-pharmacol.* 90(2-3): 317-321.
- Prakash, A. 2002. Cytogenetics and reproductive biology of mangroves in Rhizophoraceae. *Austral. J. Bot.* 50(5): 601-605.
- Ríos, C. 1993. Efecto de la densidad de siembra y altura de corte sobre la producción de biomasa del botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray evaluada en cortes sucesivos. Investigación, validación y capacitación en sistemas agropecuarios sostenibles. Convenio CETEC – IMCA – CIPAV.
- Robinson, H. 1981. A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian Contr. Bot.* 51: i-iv, 1-102.
- Robinson, H., A.M. Powell, R.M. King & J.F. Weedon. 1981. Chromosome numbers in Compositae, XII: Heliantheae. *Smithsonian Contr. Bot.* 52: i-iv, 1-28.
- Ruvalcaba-Ruiz, D. & B. Rodríguez-Garay. 2002. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *BMC Pl. Biol.* 2:10-14.
- Schilling, E.E. & J.L. Panero. 2002. A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae): I. Basal lineages. *J. Linn. Soc., Bot.* 140: 65-76.
- Shan, F., G. Yan & A. Plummer. 2003. Meiotic chromosome behaviour and *Boronia* (Rutaceae) genome reorganisation. *Austral. J. Bot.* 51(5): 559-607.
- Smith, E.B. 1975. The chromosome number of North American *Coreopsis* with phyletic interpretations. *Bot. Gaz.* 136: 78-89.
- Sobrinho, E. 1978. Serie cromosómica euploide en el género *Moricandia* DC. (Cruciferae). *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 35: 411-416.

- Solbrig, O.T., D.W. Kyhos, M. Powell & P.H. Raven. 1972. Chromosome numbers in Compositae VII. Heliantheae. *Amer. J. Bot.* 59(8): 869-878.
- Stebbins, L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold. Londres.
- Stuessy, T.F. 1977. Heliantheae – systematic review. In: II. *The biology and chemistry of the Compositae* (Heywood, V.H., J.B. Harborne. & B.L. Turner, eds.), pp. 621-671. Academic Press, London.
- Taylor, S., M. Scott & A. Holland. 2004. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res.* 12: 599-616.
- Valdéz-Bermejo, E. 1970. Estudios cariológicos en crucíferas españolas de los géneros *Moricandia* DC., *Vella* L., *Carrichtera* Adans y *Huiera* Porta. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 27: 125-133.

