

Tesis para optar al Título de Doctora en Ciencias Biológicas

Estudios citogenéticos en especies argentinas de *Solanum*
(Solanaceae) de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*



Biól. Natalia Moyetta

Director de tesis: Dr. Gabriel Bernardello

Codirector: Dr. Juan D. Urdampilleta

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. UNC

Córdoba, Argentina. 2013

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Cristina Acosta, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

Dr. Gabriel Bernardello, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

Dra. Viviana Solís Neffa, Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración: Dra. Cristina Acosta

Firma: Aclaración: Dra. Gloria Barboza

Firma: Aclaración: Dra. Viviana Solís Neffa

*A mis padres y mi hermana por ser el pilar
fundamental en todo lo que soy.
A Leo por su incondicional apoyo
perfectamente mantenido a través del tiempo.
A mi director
quién nunca desistió al enseñarme.*



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que quiero agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos.

Sin importar en donde estén quiero darles las gracias a todos.

A Leonardo por haber estado conmigo desde el inicio de la carrera, por socorrerme en cada uno de mis pedidos de ayuda de manera incondicional y “gratuita” y, por sobre todas las cosas, por aguantar a esta persona que se ríe con la misma facilidad con la que llora. Sólo han pasado 13 años desde aquel día en el cursillo de ingreso cuando te conocí y sé que todavía nos queda mucho camino por recorrer. GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS!!!

A mis padres y mi hermana, por saber entender mis ausencias y soportar mi presencia en los momentos más difíciles. A ellos, quienes me enseñaron el mejor camino a seguir, por educarme con el ejemplo y por no haber bajado nunca los brazos para que yo tampoco los baje.

A mi Director, Dr. Gabriel Bernardello por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación y guiarme durante todo este proceso.

A mi codirector, Dr. Juan Urdampilleta por enseñarme esos detalles importantes en las técnicas empleadas en esta tesis, por la revisión del manuscrito, por sus valiosos aportes que contribuyeron a mi formación académica y por la paciencia que me ha tenido en estos últimos meses.

A la Dra. Gloria Barboza por proveerme la mayor parte del material vegetal con el que trabajé, por acordarse de mí en cada viaje de campo y sorprenderme a su regreso con una planta para que más tarde yo pudiera conocerle sus cromosomas.

A los miembros de mi comisión asesora por su seguimiento en el desarrollo de este plan de trabajo.

A los que comenzaron siendo compañeros de trabajo y terminaron como mis amigos. Les estaré eternamente agradecida por ayudarme a crear un microambiente laboral donde siempre sobró la solidaridad. Por preocuparse por mi salud y por hacerme sentir siempre acompañada. A mi querida Adriana Pérez, a la “Tía” Anita Calviño, a “Colombia” Naty Aguirre, Lore Ashworth, Ramiro Aguilar y Rita Morero.

A Franco Chiarini, una de las personas con las que más puedo decir que he hecho “ciencia” y una con las que más me he divertido durante la realización de los preparados.

Al resto del grupo de los citogenetistas con quienes compartí estos 5 años de trabajo: Laura Las Peñas, Natalia Moreno y de manera particular a un gran compañera de tareas: Laura Stiefkens.

A la querida gente del Museo Botánico por tener siempre una excelente predisposición para asistirme cada vez que los necesité: René Minhot, Esteban Marini, Ale Bringas, Jime Ponce, Pascale Hick, Silvana Montecchiesi y Laurita Ribulgo.

A mis amigos de la vida, muy especialmente a Andrés Vicintín. Por los cafecitos en el bar, por las charlas compartidas, por los mensajitos de texto, por hacerme reír aún cuando no había motivo. A Ana Cassano, mi amiga incondicional y siempre presente.

A los de Ciudad Universitaria, a quienes todavía extraño demasiado: Moni Resasco, Ale Romanutti, Bea Pombo, Gustavo Bertone y Cris Ciarlante.

A Mary, Alfredo, César y Eve (mi familia “política”). Gracias por toda la ayuda, comprensión y aceptación recibida a lo largo de estos años. Y sobre todo, por dejar en mis manos a su hijo y hermano mayor, lo cual no es poco.

Al grupo de La Carlota: Diego, Ale, David, Gaby, Juan y a los tres pininos recién llegados!

A todos los que estuvieron conmigo en estos últimos 5 años,

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

Índice General	8
Índice de tablas	11
Índice de figuras	13
Resumen	22
Abstract	24
Capítulo 1: Introducción General	26
Objetivos	35
Capítulo 2: Citogenética Clásica	36
Introducción.....	37
Materiales y Métodos.....	39
Resultados.....	45
Discusión.....	63
Conclusiones.....	68
Capítulo 3: Bando Cromosómico	70
Introducción.....	71
Materiales y Métodos.....	73
Resultados.....	75
Discusión.....	86
Conclusiones.....	89

Capítulo 4: Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente	90
Introducción.....	91
Materiales y Métodos.....	93
Resultados.....	95
Discusión.....	106
Conclusiones.....	110
Capítulo 5: Conclusiones Generales y Perspectivas	112
Capítulo 6: Referencias Bibliográficas	114
Anexo 1:	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de los taxones estudiados de <i>Solanum</i> de los clados <i>Morelloide</i> y <i>Dulcamaroide</i> , colectores, procedencia, números cromosómicos somáticos y recuentos cromosómicos previos.....	42
Tabla 2: Datos cariotípicos de los taxones de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> , sometidos a tinción clásica.....	47
Tabla 3: Datos cariotípicos de los taxones de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> , sometidos a tinción clásica.....	49
Tabla 4: Funciones discriminantes para las variables citogenéticas empleadas en el análisis estadístico.....	50
Tabla 5: Datos cromosómicos de las especies de <i>Solanum</i> estudiadas de los clados <i>Morelloide</i> y <i>Dulcamaroide</i> examinados con la técnica de FISH.....	97



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia de la familia Solanaceae.....	28
Figura 2: Esquema de las relaciones filogenéticas en <i>Solanum</i>	30
Figura 3: Fotografías de especies del clado <i>Morelloide</i>	33
Figura 4: Fotografías de especies del clado <i>Dulcamaroide</i>	34
Figura 5: Representación gráfica de los taxones luego del análisis estadístico discriminante.....	50
Figura 6: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> con 2n = 24. A: <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B: <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C: <i>S. americanum</i> , D: <i>S. chenopodioides</i> , E: <i>S. concareense</i> , F: <i>S. hastatilobum</i>	51
Figura 7: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> con 2n = 24. A: <i>S. echegarayi</i> , B: <i>S. palitans</i> , C: <i>S. pilcomayense</i> 2279, D: <i>S. pilcomayense</i> 2287, E: <i>S. reductum</i> , F: <i>S. sarrachoides</i>	52
Figura 8: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> con 2n = 24. A: <i>S. sinuatirecurvum</i> , B: <i>S. triflorum</i> , C: <i>S. tripartitum</i> , D: <i>S. zuloagae</i>	53
Figura 9: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> con 2n = 24. A: <i>S. aligerum</i> , B: <i>S. amygdalifolium</i> , C: <i>S. angustifidum</i> , D: <i>S. crispum</i> , E: <i>S. dulcamara</i>	54
Figura 10: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> con 2n = 24. A: <i>S. endoadenium</i> , B: <i>S. salicifolium</i> 3488, C: <i>S. salicifolium</i> 818, D: <i>S. salicifolium</i> 3158, E: <i>S. salicifolium</i> 794.....	55
Figura 11: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B = <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C = <i>S. americanum</i> , D = <i>S. chenopodioides</i> , E = <i>S. concareense</i> , F = <i>S. echegarayi</i>	56

Figura 12: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. hastatilobum</i> , B = <i>S. palitans</i> , C = <i>S. pilcomayense</i> 2287, D = <i>S. pilcomayense</i> 2279, E = <i>S. reductum</i> , F = <i>S. sarrachoides</i>	57
Figura 13: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. sinuatirecurvum</i> , B = <i>S. triflorum</i> , C = <i>S. tripartitum</i> , D = <i>S. zuloagae</i>	58
Figura 14: Idiogramas de especies del clado <i>Dulcamaroide</i> . A = <i>S. aligerum</i> , B = <i>S. amygdalifolium</i> , C = <i>S. angustifidum</i> , D = <i>S. crispum</i> , E = <i>S. dulcamara</i>	59
Figura 15: Idiogramas de especies del clado <i>Dulcamaroide</i> . A = <i>S. endoadenium</i> , B = <i>S. salicifolium</i> 3488, C = <i>S. salicifolium</i> 3158, D = <i>S. salicifolium</i> 818, E = <i>S. salicifolium</i> 794.....	60
Figura 16: Comparación de caracteres cariotípicos para los clados <i>Morelloide</i> y <i>Dulcamaroide</i>	61
Figura 17: Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B = <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C = <i>S. americanum</i>	77
Figura 18: Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. chenopodioides</i> , B = <i>S. hastatilobum</i> , C = <i>S. palitans</i>	78
Figura 19: Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A = <i>S. pilcomayense</i> 2287, B = <i>S. pilcomayense</i> 2279, C = <i>S. triflorum</i>	79
Figura 20: Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> . A = <i>S. angustifidum</i> , B = <i>S. crispum</i> , C = <i>S. dulcamara</i>	80
Figura 21: Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> . A = <i>S. endoadenium</i> , B = <i>S. salicifolium</i> 3158, C = <i>S. salicifolium</i> 818.....	81

Figura 22: Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> . A= <i>S. salicifolium</i> 794.....	82
Figura 23: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. A= <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B= <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C= <i>S. americanum</i> , D= <i>S. chenopodioides</i> , E= <i>S. hastatilobum</i>	83
Figura 24: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. A= <i>S. palitans</i> , B= <i>S. pilcomayense</i> 2287, C= <i>S. pilcomayense</i> 2279, D= <i>S. triflorum</i>	84
Figura 25: Idiogramas de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. A= <i>S. angustifidum</i> , B= <i>S. crispum</i> , C= <i>S. dulcamara</i> , D= <i>S. endoadenium</i> , E= <i>S. salicifolium</i> 3158, F= <i>S. salicifolium</i> 818, G= <i>S. salicifolium</i> 794.....	85
Figura 26: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A= <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B= <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C= <i>S. americanum</i> , D= <i>S. chenopodioides</i> , E= <i>S. hastatilobum</i> , F= <i>S. palitans</i>	98
Figura 27: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A= <i>S. pilcomayense</i> 2287, B= <i>S. pilcomayense</i> 2279, C= <i>S. triflorum</i>	99
Figura 28: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> . A= <i>S. amygdalifolium</i> , B= <i>S. angustifidum</i> , C= <i>S. crispum</i> , D= <i>S. dulcamara</i>	100
Figura 29: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Dulcamaroide</i> . A= <i>S. endoadenium</i> , B= <i>S. salicifolium</i> 3158, C= <i>S. salicifolium</i> 794.....	101
Figura 30: Metafasas somáticas sometidas a FISH de especies de <i>Solanum</i> del clado <i>Morelloide</i> . A= <i>S. aloysiifolium</i> 2210, B= <i>S. aloysiifolium</i> 2152, C= <i>S. americanum</i> , D= <i>S. chenopodioides</i>	102

Figura 31: Metafases somáticas sometidas a FISH de especies de *Solanum* del clado Morelloide. **A=** *S. hastatilobum*, **B=** *S. palitans*, **C=** *S. pilcomayense* 2287, **D=** *S. pilcomayense* 2279, **E=** *S. triflorum*.....103

Figura 32: Metafases somáticas sometidas a FISH de especies de *Solanum* del clado Dulcamaroide. **A=** *S. amygdalifolium*, **B=** *S. angustifidum*, **C=** *S. crispum*, **D=** *S. dulcamara*, **E=** *S. endoadenium*, **F=** *S. salicifolium* 3158, **G=** *S. salicifolium* 794.....104

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

-
- Karyotypes of South American species of the *Morelloid* and *Dulcamaroid* clades (*Solanum*, Solanaceae). NATALIA R. MOYETTA, LAURA B. STIEFKENS and GABRIEL BERNARDELLO. Aceptado para su publicación en **Caryologia**. (Production tracking number: TCAR 855389)
 - Fluorescent banding and FISH studies in South American species of the *Morelloid* and *Dulcamaroid* clades (*Solanum*, Solanaceae). NATALIA R. MOYETTA, JUAN D. URDAMPILLETA, FRANCO E. CHIARINI and GABRIEL BERNARDELLO. Manuscrito.

ABREVIATURAS

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal

ANAVA: análisis de la varianza

ARNasa: ribonucleasa

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

AT: adenina timina

BSA: albúmina sérica bovina (*bovine serum albumine*)

CMA: cromomicina A₃

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dUTP: desoxiuridina trifosfato

FISH: hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GC: guanina citosina

HC: heterocromatina constitutiva

NOR: región organizadora nucleolar

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

SDS: duodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*)

SSC: citrato sódico salino (*saline-sodium citrate*)



RESUMEN

En la presente tesis, se determinó el número cromosómico, el cariotipo, la distribución de heterocromatina constitutiva GC/AT y la posición del ADNr 18-5,8-26S y 5S en especies de *Solanum* (Solanaceae) de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*. Para ello se usó la técnica de tinción convencional HCl/Giemsa, bandeo cromosómico CMA/DAPI e hibridación *in situ* fluorescente. Se confirmó el número básico $x=12$ para el género. Los taxones analizados de ambos clados tuvieron cariotipos formados en su mayoría por cromosomas *m* y *sm*. Sólo *S. sinuatirecurvum* (*Morelloide*) presentó 4 pares de cromosomas *st*, lo que representó el primer reporte para el clado y para el género *Solanum*. Por otra parte, *S. crispum* (*Dulcamaroide*) fue la única especie que presentó la mayoría de sus cromosomas *sm*. En general, los cromosomas fueron pequeños y la ocurrencia de un par de satélites fue común en los taxones examinados. Resultaron importantes para destacar, *S. pilcomayense* 2287 (*Morelloide*) por ser la única entidad en presentar satélites en los brazos largos del par *m* 2 y *S. crispum* (*Dulcamaroide*) por poseer un par de satélites más grandes que el brazo corto del cromosoma que lo porta. Con la técnica de bandeo cromosómico CMA/DAPI se determinaron dos tipos de heterocromatina constitutiva: una CMA⁺/DAPI⁻ asociada a NOR y otra CMA⁺/DAPI⁰ que se distribuyó como bandas terminales en la gran mayoría de los cromosomas del clado *Morelloide*. En *Dulcamaroide*, las únicas especies que presentaron esta característica fueron *S. angustifidum*, *S. salicifolium* 818 y *S. salicifolium* 794. Con la técnica de FISH se demostró que en *Morelloide*, los loci de ADNr 45S tuvieron posiciones terminales y variaron entre 2 y 4 sitios según los taxones examinados. Por otra parte, también en *Morelloide*, sólo hubo 2 sitios de ADNr 5S que variaron en cuanto a su posición (terminales, intercalares y centroméricos). En *Dulcamaroide*, los loci de ADNr 45S exhibieron todas las posiciones terminales y excepto *S. salicifolium* 3158 que tiene 4 sitios, el resto de los taxones mostraron 2 sitios 45S. Los sitios de ADNr 5S variaron tanto en número como en posición para las distintas especies analizadas, siendo *S. crispum* la única entidad estudiada que presentó uno de los sitios 5S en sintenia con el 45S. Tanto el análisis cariotípico, como el patrón de bandeo cromosómico y la localización de los genes ribosómicos (ADNr 45S y 5S), permitieron el reconocimiento de las especies reflejando los procesos de diferenciación cromosómica asociados a la especiación. Todos estos resultados se convirtieron en herramientas útiles para establecer posibles homeologías cromosómicas entre las especies.



ABSTRACT

In this work, the chromosomal number, karyotype GC/AT constitutive heterochromatin distribution and the position of rDNA 18-5.8-26S and 5S were determined in species of *Solanum* (Solanaceae) of *Morelloid* and *Dulcamaroid* clades. For this purpose, we employed the classical staining technique HCl/Giemsa, CMA/DAPI chromosomal banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The basic number $x=12$ was confirmed for the *Solanum* genus. The studied taxa in both clades presented karyotypes formed mostly by *m* and *sm* chromosomes. Only *S. sinuatirecurvum* (*Morelloid*) displayed 4 *st* chromosome pairs, being this the first report for the clade and for the genus. On the other hand, *S. crispum* (*Dulcamaroid*) was the only species that exhibited mostly *sm* chromosomes. In general, the chromosomes were small and the occurrence of a satellite pair was a common finding in the examined taxa. Remarkably, *S. pilcomayense* 2287 (*Morelloid*) was the only entity presenting satellites in the long arms of *m* pair 2, whereas *S. crispum* (*Dulcamaroid*) showed a pair of satellites larger than the short arm of the bearing chromosome. Two types of constitutive heterochromatin were determined utilizing CMA/DAPI chromosome banding: CMA⁺/DAPI⁻ associated to NOR and CMA⁺/DAPI⁰ distributed as terminal bands were found in most chromosomes in the *Morelloid* clade. In *Dulcamaroid*, only *S. angustifidum*, *S. salicifolium* 818 and *S. salicifolium* 794 presented this feature. It was demonstrated using FISH that the 45S rDNA loci presented terminal positions and varied among 2 and 4 sites according to the examined taxa in *Morelloid*. Conversely, only 2 rDNA 5S sites were found with variable positions (terminal, intercalary and centromeric) in this clade. In *Dulcamaroid*, rDNA 45S loci exhibited 2 sites and terminal positions, with the exception of *S. salicifolium* 3158 that presented 4 sites. rDNA 5S varied in number and in position for the analysed species, being *S. crispum* the only entity presenting one of the 5S sites in synteny with 45S. The karyotype profile, chromosome banding pattern as well as the location of ribosomal genes (rDNA 45S and 5S) allowed the recognition of the species, thus reflecting the chromosome differentiation associated to speciation. All the findings obtained contributed to the development of tools that can be used in the establishment of chromosome homeologies among the species.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

Solanaceae Juss. es una de las familias más grandes de angiospermas con 92 géneros y ca. 3000 especies (Hunziker, 2001), con gran variación en hábito, morfología y ecología. Si bien su distribución es cosmopolita, posee como centro de origen y diversidad primaria la región central de América del Sur (Knapp, 2013). También existen otros centros de diversidad secundarios localizados en América del Norte, Europa, India, Australia, África y Madagascar (D'Arcy, 1991; Edmonds & Chweya, 1997; Hunziker, 2001; Olmstead *et al.*, 2008).

Esta familia es de reconocida importancia económica. Reúne numerosas plantas de valor alimenticio tales como la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (*S. lycopersicum* L.), la berenjena (*S. melongena* L.) y el pimiento (*Capsicum annuum* L.). Otras presentan alcaloides extraídos de hojas y raíces con fines farmacéuticos como *S. laciniatum* Ait. o sirven como materia prima en la industria del tabaco como *Nicotiana tabacum* L. Algunas son malezas de cultivos o consideradas tóxicas tanto para el hombre como para los animales, tal es el caso de la “hierba mora” (*S. nigrum* L.) y muchas son también utilizadas como ornamentales (e.g., *Petunia hybrida* Vilm.). Además, algunos de sus miembros son empleados como plantas modelo para estudios a nivel celular, molecular y genético (e.g., tomate) (Doganlar *et al.*, 2002; Andrada *et al.*, 2003; Chase *et al.*, 2003; Gebhardt *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006; Peralta *et al.*, 2008).

D'Arcy (1991) reconoció 3 subfamilias dentro de las Solanáceas: *Solanoideae* Schltld., *Nolanoideae* Kostel. y *Cestroideae* Schltld. Por su parte, Hunziker (2001), excluye a *Nolanoideae* de las Solanáceas (la incluye en su clasificación como una familia aparte como tradicionalmente se hacía) y expande el número de subfamilias a 6: *Cestroideae*, *Juanulloideae* (Hunz.) Hunz., *Solanoideae*, *Salpiglossoideae* (Benth.) Hunz., *Schizantoideae* (Miers) Hunz. y *Anthocercidoideae* (G. Don) Tétényi. En ambos esquemas, *Solanum* L. se encuentra dentro de la subfamilia *Solanoideae* y de la tribu *Solaneae*, que abarca unos 50 géneros de acuerdo al sistema propuesto por Hunziker (2001).

En las clasificaciones más recientes, datos moleculares y análisis filogenéticos han cambiado el esquema tradicional para las subfamilias de Solanáceas (e.g., Olmstead & Palmer, 1992; Olmstead & Sweere, 1994; Fay *et al.*, 1998; Olmstead *et al.*, 1999). Basados en análisis cladísticos sobre secuencias de ADN, *Solanum* puede ser dividido en 13 clados monofiléticos con la base de un número cromosómico $x = 12$ (Fig. 1) (Bohs, 2005).

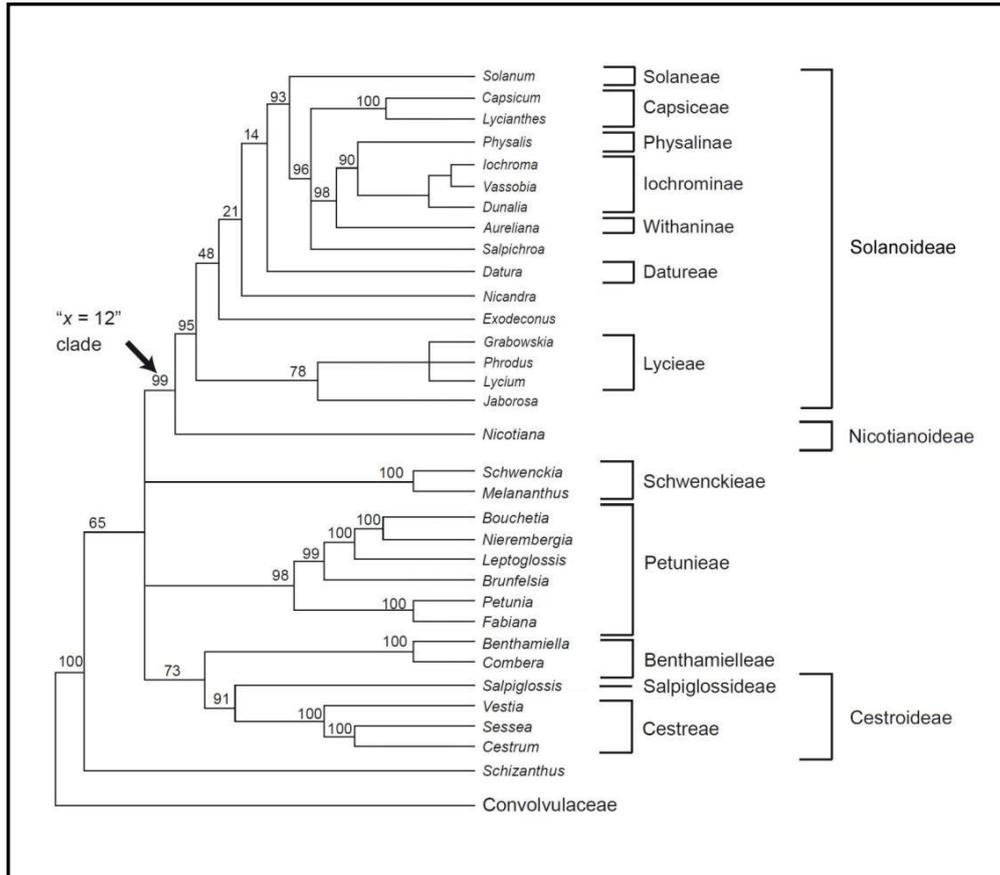


Fig. 1: Filogenia de la familia Solanaceae (modificado de Olmstead *et al.*, 2008).

El clado *Leptostemonum*, comúnmente conocido como “*Solanum* con espinas”, es el que presenta la mayor cantidad de especies (ca. 450) (Knapp, 2013) y coincide ampliamente con *Leptostemonum* de Dunal (1852). Entre los “*Solanum* sin espinas” se destacan los clados *Geminata*, *Potatoe*, *Brevantherum* y *Morelloide/Dulcamaroide*. Este último, comprende a la mayoría de las especies herbáceas previamente incluidas en la sección *Solanum* (Weese & Bohs, 2007), además de las situadas con anterioridad en las secciones *Jasminosolanum* (Bitter) Seithe, *Dulcamara* (Moench) Dumort, *Lysiphellos* (Bitter) Seithe y *Andropedas* Rusby (Bohs, 2005).

El género *Solanum* L. es uno de los más grandes y diversos de angiospermas, siendo económicamente el más importante de la familia. Se caracteriza por la presencia de anteras con dehiscencia poricida terminal, carácter compartido sólo con el género *Lycianthes* (Dunal) Hassler. Su número de especies conocidas, de distribución cosmopolita, es ca. 1500 (Knapp, 2008).

Solanum presenta problemas para los botánicos sistemáticos debido a su gran tamaño, complejidad taxonómica y reciente especiación (Bohs, 2005; Weese & Bohs,

2007). Sin embargo, representa oportunidades sin precedentes para investigar numerosas cuestiones morfológicas, biogeográficas, de desarrollo y moleculares (Weese & Bohs, 2007). En este contexto, Olmstead & Palmer (1997), Olmstead *et al.* (1999), Spooner *et al.* (2004) y Bohs (2004, 2005) propusieron diferentes hipótesis filogenéticas para establecer relaciones entre los grupos infragenéricos de *Solanum*, basados sobre todo en caracteres moleculares. Tradicionalmente, otros investigadores intentaron compartimentalizar al género de acuerdo a la presencia o ausencia de espinas (Linnaeus, 1753; Dunal, 1816), la morfología de las anteras (Dunal, 1852; Bitter, 1919) o el tipo de pelos (Seithe, 1962), pero ninguno de estos sistemas tuvo consenso generalizado. D'Arcy (1991), Nee (1999), Child & Lester (2001) y Hunziker (2001) también proveyeron esquemas infragenéricos para *Solanum*, siendo el sistema de D'Arcy (1991) el más ampliamente usado en la actualidad. Este último reconoce 7 subgéneros: *Archaeosolanum* Marzell, *Bassovia* (Aubl.) Bitter, *Leptostemonum* (Dunal) Bitter, *Lyciosolanum* Bitter, *Brevantherum* (Seithe) D'Arcy, *Potatoe* (G. Don) D'Arcy y *Solanum*. Todas estas clasificaciones están basadas en datos morfológicos, y excepto Whalen (1984), ninguno utilizó técnicas de análisis cladístico. Bohs (2005), a partir de análisis de secuencias moleculares procedentes de genes *ndhF* de cloroplastos, reconoció 13 clados principales dentro de *Solanum*: *Thelopodium*, *Regmandra*, *Archaeosolanum*, *Normania*, "African non-spiny", *Dulcamaroide*, *Morelloide*, *Wendlandii*, *Allophyllum*, *Cyphomandra*, *Geminata*, *Brevantherum* y *Leptostemonum* (Fig. 2). Si bien este nuevo esquema muestra un gran avance en las relaciones de parentesco entre los distintos taxones, quedan aún algunos clados, tales como *Morelloide* y *Dulcamaroide*, donde las relaciones filogenéticas no están totalmente resueltas dada la escasez de especies analizadas.

El clado *Morelloide* comprende ca. 75 especies distribuidas en todo el mundo, de las cuales aproximadamente 30 se encuentran en Argentina (Barboza *et al.*, 2013), desde regiones templadas a tropicales y desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 3500 metros. La mayor diversidad y concentración ocurre en los trópicos del Nuevo Mundo, particularmente en Sudamérica (Edmonds & Chweya, 1997). En gran parte, concuerda con *Solanum* sección *Solanum* (Dunal) Bitter e incluye al conocido *S. nigrum* L. Sus representantes tienen hábitos herbáceos o débilmente leñosos, con unidades simpodiales 2-3 foliadas, filamentos y estilos pubescentes en muchos taxones y los frutos presentan pequeños agregados celulares duros o esclerosomas (Fig. 3) (Barboza *et al.*, 2013).

El clado *Dulcamaroide* comprende ca. 43 especies distribuidas en Eurasia, Norteamérica y principalmente en Centro y Sudamérica, de las cuales aproximadamente 11 se encuentran en Argentina, con su centro de diversificación en los Andes y Sudeste de Brasil (Knapp, 2013). La gran mayoría de sus taxones tienen hábitos de enredadera, con unidades simpodiales plurifoliadas y los frutos carecen de los pequeños agregados celulares esclerosados (Fig. 4). Incluye a elementos de 3 subgéneros de D'Arcy (1991) y, según Bohs (2005) y Weese & Bohs (2007) es considerado el grupo hermano del clado *Morelloide*.

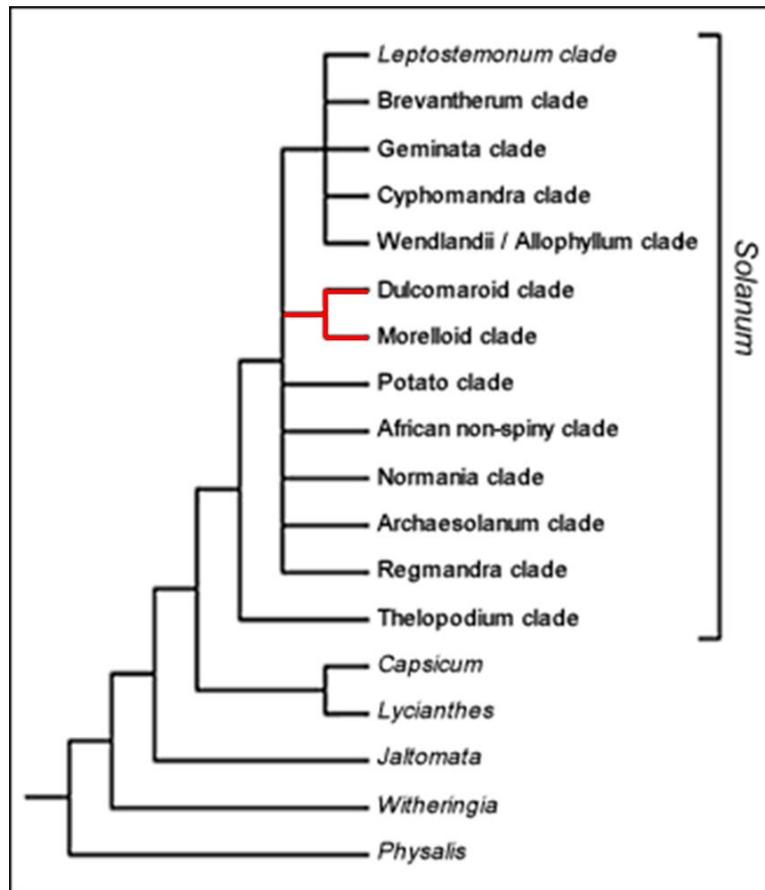


Fig. 2. Esquema de las relaciones filogenéticas en *Solanum* (según Bohs, 2005).

Si bien existen numerosos trabajos de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* que revisan su taxonomía y sistemática a partir de datos morfológicos y moleculares, los estudios a nivel citogenético, que proveen información útil en la resolución del origen y evolución de distintos taxones, son relativamente escasos (Acosta, 2006). Desde hace tiempo se sabe que el estudio de los números cromosómicos y de las características cariotípicas pueden ser muy útiles en sistemática y que variaciones en el

cariotipo pueden ocurrir sin cambios notorios en la morfología (Stebbins, 1971; Bernardello *et al.*, 1994; Poggio & Naranjo, 2004).

Muchos de los trabajos citológicos en *Solanum*, particularmente en lo que se refiere a la cariología de las especies argentinas informan el número de cromosomas y estudios sobre la meiosis y principalmente se restringen a unas pocas entidades de gran utilidad económica (Hawkes, 1999; Moscone, 1992; Obute *et al.*, 2006). Cerca del 99% de las especies presentan un número cromosómico $x=12$, el cual es considerado el número cromosómico básico (Hunziker, 2001). Este número es predominante en la subfamilia Solanoideae así como en el género *Solanum* (Olmstead *et al.*, 1999; Hunziker, 2001; Acosta *et al.*, 2005). Sólo 2 especies de la sección *Acanthophora* Dunal mostraron $2n=22$, *S. mammosum* y *S. platense* (Chiarini & Bernardello, 2006).

En los últimos años fueron aumentando los estudios comparativos de cariotipos y se realizaron varios trabajos que sentaron la base para posteriores investigaciones más profundas a nivel citogenético. Tal es el caso de los estudios realizados en la sect. *Basarthrum* (Bitter) Bitter (Bernardello & Anderson, 1990), en la sect. *Lasiocarpa* (Dunal) D'Arcy (Bernardello *et al.*, 1994), en especies sudamericanas del subgénero *Leptostemonum* (Chiarini & Bernardello, 2006; Chiarini *et al.*, 2006, 2010) y en varias especies de *Solanum* en general (Acosta *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2009).

Muchas veces, los patrones cromosómicos revelados convencionalmente resultan sólo parcialmente suficientes para un análisis detallado del cariotipo, sobre todo cuando los cromosomas son pequeños y semejantes. Por ello, las técnicas de tinción diferencial y marcado cromosómico han contribuido enormemente al estudio exhaustivo de los cariotipos (Gill & Obembe, 1991; Sumner, 2003). Entre ellas, se destacan las técnicas de bandeo e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que han demostrado ser eficaces en la detección de rearrreglos cromosómicos y bloques heterocromáticos que no son visualizados con las técnicas clásicas de tinción (Fuchs *et al.*, 1998; Melo & Guerra, 2003; Guerra, 2004). El mapeo citológico de genes ribosómicos mediante FISH permite marcar cromosomas del complemento, ayudando en la identificación de homólogos y en la comparación con otras especies. El uso combinado de varios marcadores cromosómicos aporta valiosos datos sobre la estructura cromosómica y sirve para establecer homeologías cromosómicas entre especies relacionadas (Schwarzacher & Schweizer, 1982; Moscone *et al.*, 1995, 1999; Fukui & Nakayama, 1996). No obstante, en Solanáceas, los estudios de bandeo

fluorescente y FISH se han enfocado en pocos géneros como *Cestrum* L. (Berg & Greilhuber, 1992, 1993a, 1993b; Fregonezi *et al.*, 2004), *Nicotiana* L. (Merritt, 1974; Mouras, 1982; Mouras *et al.*, 1986), *Capsicum* L. (Moscone *et al.*, 1993, 1995; Moscone, 1999), *Cyphomandra* Mart. ex Sendt. (Pringle & Murray, 1993), *Hyoscyamus* Scop. (Tyagi & Gill, 1990), *Petunia* Juss. (Smith & Oud, 1972; Wijsman *et al.*, 1983) y *Solanum* (Pijnacker & Fewerda, 1984, 1991; Moscone, 1989, Wagenvoort *et al.*, 1994; Acosta *et al.*, 2002; Miguel, 2003; Rego *et al.*, 2009). En los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*, el empleo de estas técnicas es escaso y hasta el momento se reportan los trabajos de Rego *et al.* (2009), Melo *et al.* (2011) y Acosta *et al.* (2012).

Sobre la base de la información citogenética obtenida en *Solanum*, en la presente tesis se extiende el análisis cromosómico con técnicas clásicas de tinción, de bandeo y FISH a especies nativas de los clados mencionados anteriormente. Ya que esta información cromosómica es esencial para estudiar las posibles relaciones entre las especies, se propuso obtener información original que permita esclarecer la taxonomía y la filogenia en este grupo de plantas.



Fig. 3: Fotografías de especies del clado *Morelloide*. Tomadas de *Documenta* (www.darwin.edu.ar) y/o provistas por distintos investigadores.



Fig. 4: Fotografías de especies del clado *Dulcamaroide*. Tomadas de *Documenta* (www.darwin.edu.ar) y/o provistas por distintos investigadores.

Objetivos

Objetivo general: Estudiar las relaciones filogenéticas y sistemáticas de las especies de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* en Argentina mediante técnicas citogenéticas.

Objetivos específicos:

- Determinar el número diploide de cromosomas en las especies de Argentina de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*.
- Confeccionar cariotipos de todas las especies y caracterizarlos numéricamente.
- Identificar y determinar la heterocromatina constitutiva a través del bandeo CMA/DAPI.
- Estudiar la localización de los genes ribosómicos 5S y 45S por hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Capítulo 2: CITOGENÉTICA CLÁSICA

Introducción

Los datos que aporta la citogenética clásica o convencional a partir de la utilización de colorantes acidófilos como Giemsa o Carmín acético, entre otros, son muy importantes para la sistemática vegetal (Guerra, 1986). Proveen información útil con respecto al número mínimo de grupos de ligamiento (número básico) y cuántas veces éstos se repiten, lo que permite proponer hipótesis filogenéticas en un determinado grupo de plantas (Grant, 1981; Poggio, 1996; Seijo *et al.*, 2010). Algunos taxónomos consideran al número básico como cualquier otra variante morfológica de relevancia y es utilizado en análisis fenéticos y cladísticos. El número de cromosomas y su homología, determinan en gran medida el comportamiento de apareamiento y la fertilidad y, por lo tanto, el comportamiento de reproducción y patrones de variación. Este conocimiento resulta de fundamental importancia para lograr una clasificación que refleje el proceso de evolución (Stace, 2000).

Con respecto al cariotipo, conocer sus características estructurales y cualitativas resulta importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas (Poggio, 1996; Poggio & Naranjo, 2004; Acosta *et al.*, 2005; Urdampilleta *et al.*, 2005). En análisis llevados a cabo en células mitóticas, aspectos como el número cromosómico, tipo y tamaño de los cromosomas, posición del centrómero y presencia de satélites, permiten la comparación de especies y la identificación de variaciones cromosómicas intra e interespecíficas (e.g., Yokota, 1990; Guerra *et al.*, 1997; Poggio *et al.*, 2008). Las variaciones en el cariotipo pueden ocurrir sin que se vean reflejadas en los caracteres exomorfológicos. A pesar de ello, los aportes brindados por los datos cromosómicos han demostrado ser valiosos para la resolución de problemas taxonómicos y evolutivos (Poggio & Naranjo, 2004; Poggio *et al.*, 2008). Los cariotipos, no sólo difieren entre organismos muy distintos sino también en especies que están estrechamente relacionadas y la mayoría de estas diferencias se deben a los rearrreglos estructurales que ocurren en los cromosomas. Éstos pueden incluir translocaciones e inversiones, duplicaciones y fusiones en tándem, sin que haya cambios en el número cromosómico (Sumner, 2003).

Los miembros de Solanaceae poseen un número cromosómico que varía de $x=7$ hasta $x=13$, con cariotipos simétricos y predominancia de cromosomas meta y submetacéntricos (e.g., Rego *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011; Acosta *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2012). La información citológica en *Solanum* muchas veces se restringe a los

reportes de números cromosómicos, estudios de cromosomas meióticos o composición cariotípica sin análisis de tipo cuali o cuantitativo (cf. Bernardello & Anderson, 1990). La razón más probable para esta situación es que sus cariotipos han sido considerados relativamente uniformes y simétricos (Stebbins, 1971) y que aún los cromosomas de mayor tamaño (ca. 4 μm de longitud) resultan pequeños en comparación con otros taxones (Roe, 1967; Bohs, 1989) como ocurre también en *Lycianthes* (Acosta *et al.*, 2005). También resultan simétricos y con la mayoría de sus cromosomas *m* y *sm*, los cariotipos de *Capsicum* (Moscone, 1993; Moscone *et al.*, 1993), *Jaborosa* (Chiarini & Barboza, 2008), *Dyssochroma* (Piovano, 1989; Acosta & Moscone, 2000), *Lycium* (Stiefkens & Bernardello, 1996), *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2006), *Nicotiana* (Kitamura *et al.*, 2001, Nakamura *et al.*, 2001), entre otros.

Puntualmente, en lo que respecta a la citogenética de las entidades de *Solanum* de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*, la información es escasa para las especies nativas (Moscone, 1992; Acosta *et al.*, 2005, 2012), como fue mencionado con anterioridad. Estos datos señalan entonces a estos dos grupos como interesantes para estudiar su diversidad cariotípica.

Materiales y Métodos

Los materiales estudiados en el presente trabajo con tinción clásica, su procedencia, colectores y recuentos cromosómicos previos se detallan en las Tablas 1 y 2. Los respectivos ejemplares de herbario han sido determinados en su mayoría por la Dra. Gloria Barboza y se encuentran depositados en el Museo Botánico de Córdoba (CORD). Las fotografías de las especies, correspondientes a las figuras 3 y 4, fueron tomadas de la base de datos de *Documenta* (www.darwin.edu.ar) y/o provistas por distintos investigadores.

Las observaciones de metafases mitóticas se efectuaron en células meristemáticas obtenidas por aplastamiento de ápices radicales provenientes de la germinación de semillas. Éstas se sembraron en cajas de Petri estériles con papel de filtro embebido en ácido giberélico (GA_3) 1000 ppm, regadas posteriormente con el mismo para interrumpir el reposo de las semillas (Ellis *et al.*, 1985) y conservadas en estufa a 25°C.

El tamaño adecuado de las raicillas para lograr la visualización de mayor cantidad de metafases fue en general entre 5 – 10 mm. Los ápices radicales en todos los casos fueron pretratados con 8-hidroxiquinoleína 2 mM durante 6 hs a 14°C, fijadas en alcohol etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v) (solución preparada al momento de ser usada) por al menos 24 hs y mantenidas a -20°C. La tinción convencional se realizó con la técnica de HCl/Giemsá (Guerra, 1983), con leves modificaciones. Previo lavado con agua corriente, las raicillas se colocaron en HCl 1 N durante 10 min. a 60°C y luego se aplastaron en una gota de ácido acético 45%. Los preparados se hicieron permanentes removiendo el cubreobjetos por congelamiento con nitrógeno líquido, se colorearon con Giemsa 2% y se montaron en Entellan (Merck).

Los cariogramas de cada célula (en todos los casos, no menos de 10) se realizaron a partir de fotomicrografías tomadas con un microscopio de contraste de fase Zeiss Axiophot, estas últimas se utilizaron para obtener las siguientes variables:

- El largo total C de cada par cromosómico se calculó midiendo el largo de cada miembro del par y sacando un promedio entre ellos.
- La posición del centrómero se determinó de acuerdo al índice braquial $r=l/s$ donde: l= longitud del brazo largo, s= longitud del brazo corto (Levan *et al.*, 1964), correspondiendo uno a cada par cromosómico.

- El largo total del genoma haploide se calculó sumando las medias de los largos totales de cada par cromosómico (Lt).
- El índice R promedio es la razón entre el par cromosómico mayor y el par menor del complemento, tomándose en cuenta sus respectivas longitudes promedio (Stebbins, 1971).
- La asimetría cariotípica fue cuantificada mediante los índices propuestos por Romero Zarco (1986), a saber:
 - Índice de asimetría intracromosómica o $A_1 = 1 - [(\sum b_i / B_i) / n]$ donde b_i y B_i son las medias de los brazos cortos y largos, respectivamente, correspondientes a cada par de cromosomas homólogos y n es el número de pares de cromosomas del complemento.
 - Índice de asimetría intercromosómica o $A_2 = s/x$ donde s es la desviación estándar y x es la media de las longitudes cromosómicas del complemento.

Estos índices varían de cero a uno, no tienen unidad de medida y son independientes del tamaño y del número de cromosomas.

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

Los idiogramas se construyeron organizando los cromosomas en grupos de acuerdo a su índice braquial (metacéntricos = m , submetacéntricos = sm , subtelocéntricos = st o telocéntricos = t ; según Levan *et al.*, 1964), ordenándolos luego por largo decreciente dentro de cada categoría.

Con el objeto de corroborar el agrupamiento de las especies de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* en función de sus similitudes cariotípicas se realizó un análisis discriminante lineal. Para ello se emplearon las variables Lt, C, r, A_1 y A_2 y un ANOVA de un factor para determinar si existen diferencias significativas entre los clados que resultaron del análisis discriminante, utilizando el programa INFOSTAT versión 1.1 (Grupo InfoStat, 2002). El propósito de este análisis fue predecir la pertenencia a un

grupo determinado a partir de un conjunto de predictores, en este caso, las variables mencionadas con anterioridad. A diferencia de un análisis multivariado de la varianza, en el análisis discriminante lineal, las variables citogenéticas son predictoras de la pertenencia a los grupos (clados) de las distintas especies (Tabachnick & Fidell, 1996).

Tabla 1: Lista de los taxones estudiados de *Solanum* de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroides*, colectores, procedencia, números cromosómicos somáticos (2n) y recuentos cromosómicos previos. El asterisco indica los guarismos que se informan por primera vez.

Clado *Morelloide*

Taxón y Colectores	Procedencia	2n	Referencia bibliográfica
<i>S. aloysiifolium</i> Dunal Barboza <i>et al.</i> 2210	ARGENTINA. Salta, La Caldera.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
Barboza <i>et al.</i> 2152	ARGENTINA. Tucumán, Tafí.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
<i>S. americanum</i> Mill. Barboza <i>et al.</i> 2139	ARGENTINA. Tucumán, Chicligasta.	24	n= 12 (Ganapathi & Rao, 1982)
<i>S. chenopodioides</i> Lam. Barboza <i>et al.</i> 2292	ARGENTINA. Buenos Aires, Bolívar.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
<i>S. concareense</i> Hunz. Chiarini <i>et al.</i> 821	ARGENTINA. San Luis, Chacabuco.	24*	
<i>S. echeagarayi</i> Hieron. Barboza <i>et al.</i> 3253	ARGENTINA. La Rioja, Famatina.	24*	
<i>S. hastatilobum</i> Bitter Chiapella <i>et al.</i> 2630	ARGENTINA. Catamarca, Tinogasta.	24*	
<i>S. palitans</i> C. V. Morton Barboza <i>et al.</i> 2178	ARGENTINA. Tucumán, Tafí.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
<i>S. pilcomayense</i> Morong Barboza <i>et al.</i> 2287	ARGENTINA. Entre Ríos, Uruguay.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
Barboza <i>et al.</i> 2279	ARGENTINA. Corrientes, Bella Vista.	24	n= 12 (Moscone, 1992)

<i>S. reductum</i> C. V. Morton Barboza <i>et al.</i> 3516	ARGENTINA. Salta, Rosario de la Frontera.	24*	
<i>S. sarrachoides</i> Sendtn. Chiapella <i>et al.</i> 1840	ARGENTINA. Neuquén, Ñorquin.	24	n= 12 (Ratera, 1943)
<i>S. sinuatirecurvum</i> Bitter Barboza <i>et al.</i> 3551	ARGENTINA. Jujuy, Tumbaya.	24*	
<i>S. triflorum</i> Nutt. Chiapella <i>et al.</i> 1839	ARGENTINA. Neuquén, Ñorquin.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
<i>S. tripartitum</i> Dunal Barboza <i>et al.</i> 2228	ARGENTINA. Jujuy, Tumbaya.	24	n= 12 (Acosta, 2005)
<i>S. zuloagae</i> Cabrera Barboza <i>et al.</i> 3569	ARGENTINA. Salta, La Caldera.	24*	

Clado *Dulcamaroide*

Taxón y colectores	Procedencia	2n	Referencia bibliográfica
<i>S. aligerum</i> Schldtl. Barboza <i>et al.</i> 2155	ARGENTINA. Tucumán, Tafí.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
<i>S. amygdalifolium</i> Steud. Barboza <i>et al.</i> 1566	ARGENTINA. Entre Ríos, Uruguay.	24*	
<i>S. angustifidum</i> Bitter Barboza <i>et al.</i> 3489	ARGENTINA. Catamarca, Santa María.	24 *	
<i>S. crispum</i> Ruiz & Pav. Chiapella <i>et al.</i> 1764	CHILE VIII Región del Biobio.	24*	
<i>S. dulcamara</i> L.	s/n cultivada	24	n= 12 (Bir <i>et al.</i> , 1978)
<i>S. endoadenium</i> Bitter Barboza <i>et al.</i> 3476	ARGENTINA. Catamarca, Belén.	24	n= 12 (Moscone, 1992)

<i>S. salicifolium</i> Phil. Barboza <i>et al.</i> 3488	ARGENTINA. Catamarca, Belén.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
Barboza <i>et al.</i> 3158	ARGENTINA. La Rioja, Chilecito.	24	n= 12 (Moscone, 1992)
Chiarini <i>et al.</i> 818	ARGENTINA. Córdoba, Punilla.	24*	
Chiarini <i>et al.</i> 794	ARGENTINA. Córdoba, Punilla.	24*	

Resultados

Se examinaron los cromosomas mitóticos de 26 poblaciones de 21 especies, 16 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 10 al clado *Dulcamaroide* (Fig. 6 a 10). Todas las entidades aquí estudiadas mostraron un número cromosómico de $2n=2x=24$. Son informados por primera vez los números cromosómicos de 9 taxones (señalados con un asterisco en la Tabla 1) y se confirman los guarismos de las especies restantes. Con las mediciones efectuadas a los cromosomas, se elaboraron los correspondientes idiogramas (Fig. 11, 12, 13, 14 y 15), resumiéndose en las Tablas 2 y 3 las características cariotípicas de cada taxón examinado.

En general, los cromosomas de ambos clados fueron pequeños, con longitudes medias que variaron en un rango de 0,97 (en *S. palitans*, Fig. 7 B) a 4,09 μm (en *S. crispum*, Fig. 9 D) (Tablas 2 y 3). En *Morelloide*, los cromosomas más grandes y los valores más altos para el largo total del genoma haploide (Lt) fueron observados en *S. aloysiifolium* 2210 (2,07 μm y 24,79 μm , respectivamente) (Tabla 2) (Fig. 6 A), mientras que los valores más bajos fueron obtenidos en *S. palitans* (0,97 μm y 11,68 μm , respectivamente) (Fig. 7 B, Tabla 2). *Solanum crispum* se destacó en *Dulcamaroide* por poseer los cromosomas más grandes y el mayor valor para Lt (4,09 μm y 49,15 μm , respectivamente) (Fig. 9 D). Por otra parte, *S. salicifolium* 3158 presentó los cromosomas más pequeños (1,23 μm) (Fig. 10 D), mientras que el menor valor para Lt fue para *S. aligerum* (18,53 μm) (Fig. 9 A, Tabla 3).

La presencia de satélites (señalados con asteriscos en las Tablas 2 y 3) no fue constante en las especies examinadas y varió de acuerdo a la muestra. El número de células en las cuales no pudo visualizarse fue variable y, en algunos casos, su presencia se detectó sólo en uno de los cromosomas homólogos. La ocurrencia de un par de satélites fue común en el clado *Morelloide*: 7 especies exhibieron un par de satélites en los brazos cortos, mientras que *S. pilcomayense* 2287, mostró además un par de satélites en los brazos largos del cromosoma *m* número 2 (Fig. 7 D y 12 C). Seis de las especies analizadas del clado *Dulcamaroide* exhibieron un par de satélites en los brazos cortos. *Solanum crispum* se destacó también en este caso ya que los satélites fueron más grandes que el brazo corto del cromosoma que lo porta (Fig. 9 D y 14 D).

La fórmula cariotípica más frecuente para *Morelloide* fue $10\ m + 2\ sm$ (en 7 especies, Tabla 2), seguidos por $11\ m + 1\ sm$ (en 4 especies) y $9\ m + 3\ sm$ (en 2

especies). Sólo tres especies mostraron una fórmula cariotípica con cromosomas *st*: *S. pilcomayense* 2287 ($6 m + 5 sm + 1 st$), *S. aloysiifolium* 2152 ($7 m + 4 sm + 1 st$) y *S. sinuatirecurvum* ($5 m + 3 sm + 4 st$) (Tabla 2, Fig. 11, 12 y 13). En el clado *Dulcamaroide*, la mayoría de las especies exhibieron cromosomas *m* (Tabla 3, Fig. 14 y 15), excepto *S. crispum* con la mayoría de sus cromosomas *sm* ($2 m + 9 sm + 1 st$). También mostraron cromosomas *st*: *S. amygdalifolium*, *S. salicifolium* 3488 (con $9 m + 2 sm + 1 st$), *S. endoadenium* (con $8 m + 3 sm + 1 st$) y *S. salicifolium* 3158 (con $7 m + 4 sm + 1 st$). Las especies que no presentaron cromosomas *st* fueron: *S. aligerum*, *S. salicifolium* 818, *S. salicifolium* 794 ($10 m + 2 sm$), *S. angustifidum* y *S. dulcamara* ($11 m + 1 sm$) (Tabla 3, Fig. 9 A, C, D, E y 10 C, E). En ninguno de los dos grupos se detectaron cromosomas *t*.

De acuerdo al índice de asimetría de Romero Zarco (1986), los cariotipos de los taxa estudiados fueron principalmente simétricos, siendo *S. pilcomayense* 2279 con $A_1 + A_2 = 0,35$ (*Morelloide*) y *S. amygdalifolium* con $A_1 + A_2 = 0,30$ (*Dulcamaroide*), los más simétricos. Por su parte, *S. sinuatirecurvum* con $A_1 + A_2 = 0,67$ (*Morelloide*) y *S. crispum* con $A_1 + A_2 = 0,64$ (*Dulcamaroide*), fueron los más asimétricos (Tablas 2 y 3, Fig. 16).

Según el sistema propuesto por Stebbins (1971), los taxones estudiados de ambos clados tienen cariotipos que se incluyen en las categorías A (53,8 %), B (38,5 %) y C (7,7 %). Esto coincide con los datos obtenidos a partir del índice de Romero Zarco (1986), siendo nuevamente *S. sinuatirecurvum* y *S. crispum* las especies que presentan los cariotipos más asimétricos (Tablas 2 y 3).

A partir de los resultados que surgen del análisis discriminante, y utilizando sólo las variables cariotípicas, se podría reagrupar las especies estudiadas dentro de los clados. Del total de entidades analizadas, 6 quedaron incluidas dentro de *Dulcamaroide*. Para este último, por su parte, tres especies fueron reagrupadas en *Morelloide* (Fig. 5, Tabla 4). A partir de las funciones discriminantes para cada una de las variables empleadas se observó que Lt y A_2 son las que más contribuyeron a la discriminación entre clados. En congruencia con esto, el análisis de la varianza para Lt y A_2 , arrojó diferencias significativas entre clados ($F_{[1, 26]} = 4,87$; $P = 0,037$ y $F_{[1, 26]} = 4,82$; $P = 0,038$, respectivamente), no así para las variables C , r y A_1 ($F \leq 3,35$; $P \geq 0,08$).

Tabla 2: Datos cariotípicos de los taxones de *Solanum* del clado *Morelloide*, sometidos a tinción clásica. *m* = metacéntrico; *sm* = submetacéntrico; *st* = subtelocéntrico; **FC** = Fórmula cariotípica; **Lt** = Longitud total del complemento haploide; **C** = Longitud cromosómica media; **r** = Índice braquial medio; **A₁** = Índice de asimetría intracromosómico, **A₂** = Índice de asimetría intercromosómico; **St** = Categorización según Stebbins, **de** = desviación estándar. Medidas en μm . * indica un par cromosómico con satélite en el brazo corto. ** indica un par cromosómico con satélite en el brazo largo.

Taxón	FC	Lt (de)	C (de)	r (de)	A ₁	A ₂	St
<i>S. aloysiifolium</i> Barboza <i>et al.</i> 2210	10 <i>m</i> * + 2 <i>sm</i>	24,79 (0,41)	2,07 (0,41)	2,42 (0,30)	0,33	0,20	2 B
Barboza <i>et al.</i> 2152	7 <i>m</i> * + 4 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	15,74 (0,19)	1,31 (0,20)	1,83 (0,30)	0,45	0,15	1 B
<i>S. americanum</i> Barboza <i>et al.</i> 2139	10 <i>m</i> + 2 <i>sm</i>	17,80 (0,23)	1,48 (0,22)	1,69 (0,21)	0,31	0,15	1 A
<i>S. chenopodioides</i> Barboza <i>et al.</i> 2292	10 <i>m</i> + 2 <i>sm</i>	13,55 (0,19)	1,13 (0,18)	1,85 (0,22)	0,29	0,16	1 A
<i>S. concareense</i> Chiarini <i>et al.</i> 821	11 <i>m</i> + 1 <i>sm</i>	19,22 (0,23)	1,60 (0,22)	1,74 (0,08)	0,32	0,14	1 A
<i>S. echeagarayi</i> Barboza <i>et al.</i> 3253	9 <i>m</i> * + 3 <i>sm</i>	20,94 (0,23)	1,75 (0,24)	1,94 (0,34)	0,40	0,13	1 B
<i>S. hastatilobum</i> Chiapella <i>et al.</i> 2630	9 <i>m</i> * + 3 <i>sm</i>	20,69 (0,28)	1,72 (0,27)	1,74 (0,18)	0,37	0,16	1 B
<i>S. palitans</i> Barboza <i>et al.</i> 2178	10 <i>m</i> + 2 <i>sm</i>	11,68 (0,17)	0,97 (0,16)	1,84 (0,17)	0,33	0,16	1 A
<i>S. pilcomayense</i> Barboza <i>et al.</i> 2287	6 <i>m</i> ** + 5 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	17,07 (0,26)	1,42 (1,23)	1,35 (0,57)	0,40	0,09	1 B

Barboza <i>et al.</i> 2279	11m + 1sm	16,17 (0,15)	1,35 (0,14)	1,50 (0,04)	0,25	0,10	1 A
<i>S. reductum</i> Barboza <i>et al.</i> 3516	11m* + 1sm	20,69 (0,27)	1,72 (0,25)	1,72 (0,15)	0,33	0,15	1 A
<i>S. sarrachoides</i> Chiapella <i>et al.</i> 1840	10m* + 2sm	20,72 (0,24)	1,72 (0,22)	1,61 (0,07)	0,35	0,13	1 A
<i>S. sinuatirecurvum</i> Barboza <i>et al.</i> 3551	5m* + 3sm + 4st	15,68 (0,24)	1,31 (0,31)	2,14 (0,21)	0,43	0,24	2 C
<i>S. triflorum</i> Chiapella <i>et al.</i> 1839	10m + 2sm*	21,41 (0,29)	1,78 (0,32)	2,38 (0,30)	0,37	0,18	2 B
<i>S. tripartitum</i> Barboza <i>et al.</i> 2228	10m* + 2sm	16,50 (0,13)	1,05 (0,14)	1,67 (0,14)	0,32	0,13	1 A
<i>S. zuloagae</i> Barboza <i>et al.</i> 3569	11m* + 1sm	22,24 (0,34)	1,85 (0,30)	1,90 (0,15)	0,29	0,16	1 A

Tabla 3: Datos cariotípicos de los taxones de *Solanum* del clado *Dulcamaroide* sometidos a tinción clásica. *m* = metacéntrico; *sm* = submetacéntrico; *st* = subtlocéntrico; **FC** = Fórmula cariotípica; **Lt** = Longitud total del complemento haploide; **C** = Longitud cromosómica media; **r** = Índice braquial medio; **A₁** = Índice de asimetría intracromosómico, **A₂** = Índice de asimetría intercromosómico; **St** = Categorización según Stebbins, **de** = desviación estándar. Medidas en μm . * indica un par cromosómico con satélite en el brazo corto.

Taxón	FC	Lt (de)	C (de)	r (de)	A ₁	A ₂	St
<i>S. aligerum</i> Barboza <i>et al.</i> 2155	10 <i>m</i> * + 2 <i>sm</i>	18,53 (0,21)	1,54 (0,19)	1,60 (0,14)	0,29	0,12	1 A
<i>S. amygdalifolium</i> Barboza <i>et al.</i> 1566	9 <i>m</i> + 2 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	22,06 (0,14)	1,85 (0,96)	1,28 (0,70)	0,22	0,08	2 B
<i>S. angustifidum</i> Barboza <i>et al.</i> 3489	11 <i>m</i> * + 1 <i>sm</i>	26,13 (0,46)	2,18 (0,44)	2,15 (0,08)	0,33	0,20	2 A
<i>S. crispum</i> Chiapella <i>et al.</i> 1764	2 <i>m</i> * + 9 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	49,15 (0,60)	4,09 (3,83)	1,63 (0,84)	0,50	0,14	1 C
<i>S. dulcamara</i> s/n cultivada	11 <i>m</i> * + 1 <i>sm</i>	22,13 (0,21)	1,84 (1,33)	1,54 (0,20)	0,22	0,11	1 A
<i>S. endoadenium</i> Barboza <i>et al.</i> 3476	8 <i>m</i> + 3 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	18,65 (0,14)	1,55 (0,13)	1,29 (0,54)	0,41	0,08	1 B
<i>S. salicifolium</i> Barboza <i>et al.</i> 3488	9 <i>m</i> + 2 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	19,61 (0,13)	1,63 (0,87)	1,32 (0,81)	0,25	0,08	1 B
Barboza <i>et al.</i> 3158	7 <i>m</i> * + 4 <i>sm</i> + 1 <i>st</i>	22,78 (0,16)	1,23 (1,08)	1,37 (0,70)	0,33	0,09	1 B
Chiarini <i>et al.</i> 818	10 <i>m</i> * + 2 <i>sm</i>	22,55 (0,29)	1,88 (0,28)	2,02 (0,09)	0,37	0,15	2 A
Chiarini <i>et al.</i> 794	10 <i>m</i> + 2 <i>sm</i>	17,16 (0,22)	1,43 (0,20)	1,99 (0,01)	0,37	0,14	1 A

Tabla 4: Funciones discriminantes para las variables citogenéticas empleadas en el análisis estadístico. Se muestran los datos estandarizados con las varianzas comunes. **Lt** = Longitud total del complemento haploide; **C** = Longitud cromosómica media; **r** = Índice braquial medio; **A₁** = Índice de asimetría intracromosómico, **A₂** = Índice de asimetría intercromosómico.

Variables Citogenéticas	Datos estandarizados
Lt	-1.04
C	0.16
r	-0.20
A₁	0.31
A₂	0.87

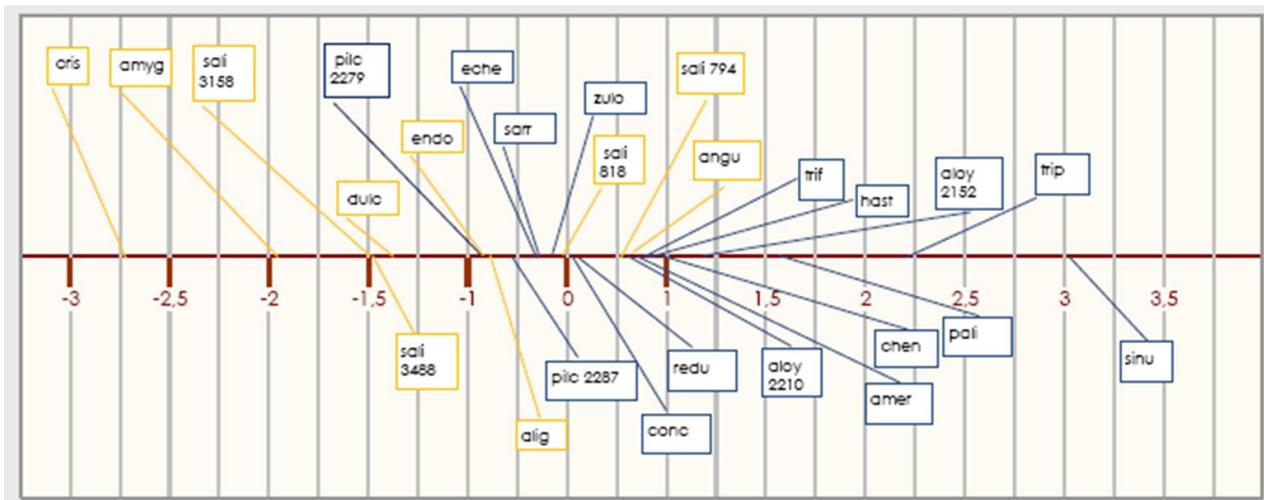


Figura 5: Representación gráfica de los taxones luego del análisis discriminante. En azul se indican las entidades incluidas en *Morelloide* (*S. aloysiifolium* 2210 = aloy 2210, *S. aloysiifolium* 2152 = aloy 2152, *S. americanum* = amer, *S. chenopodioides* = chen, *S. concarense* = conc, *S. eche garayi* = eche, *S. hastatilobum* = hast, *S. palitans* = pali, *S. pilcomayense* 2287 = pic 2287, *S. pilcomayense* 2279 = pic 2279, *S. reductum* = redu, *S. sarrachoides* = sarra, *S. sinuatirecurvum* = sinu, *S. triflorum* = trif, *S. tripartitum* = trip, *S. zuloagae* = zulo) y en amarillo se indican las entidades incluidas en *Dulcamaroide* (*S. aligerum* = aliq, *S. amygdalifolium* = amyg, *S. angustifidum* = angu, *S. crispum* = cris, *S. dulcamara* = dulc, *S. endoadenium* = endo, *S. salicifolium* 3488 = sali 3488, *S. salicifolium* 3158 = sali 3158, *S. salicifolium* 818 = sali 818, *S. salicifolium* 794 = sali 794) Todos según la clasificación taxonómica actual.

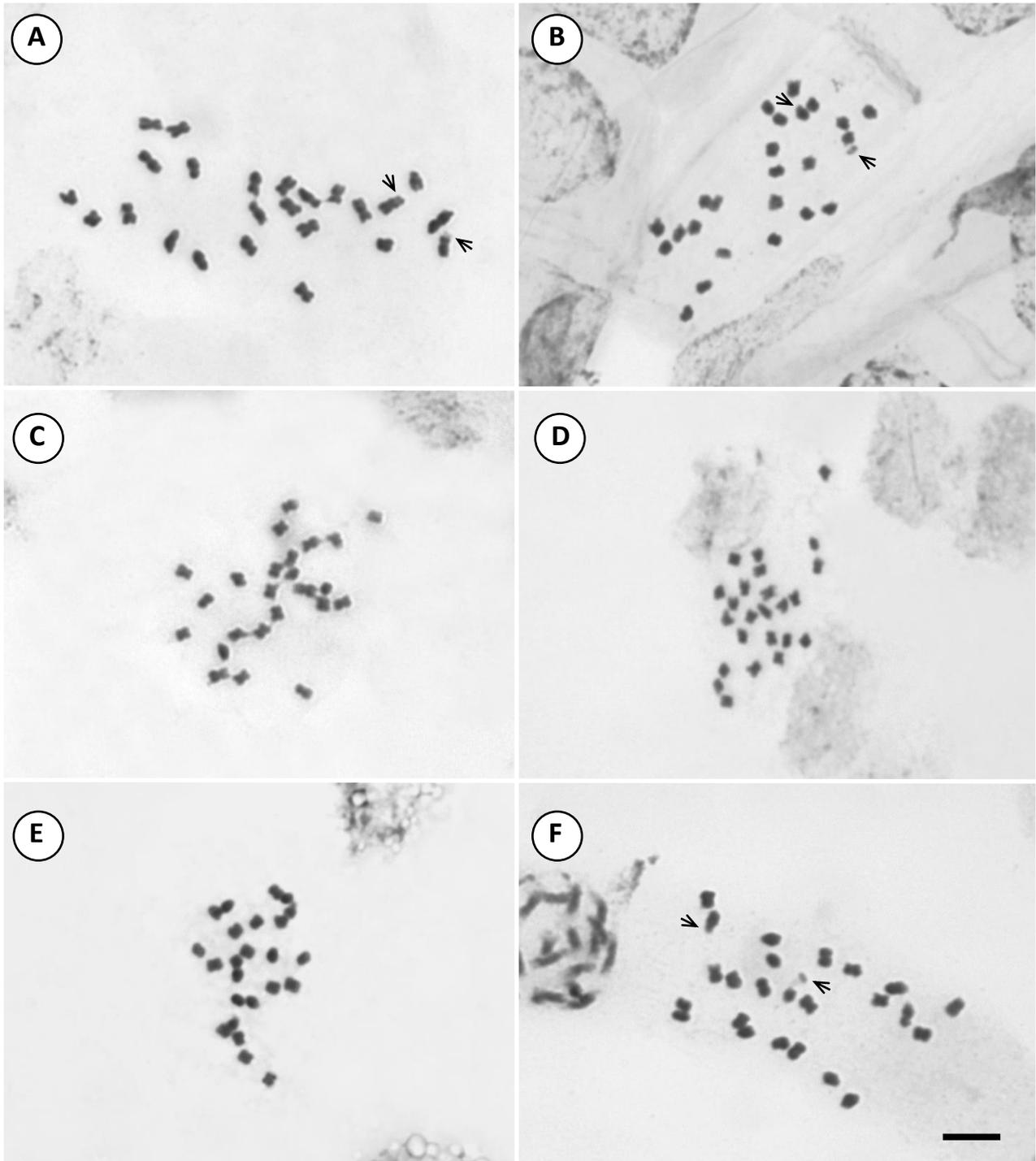


Fig. 6: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de *Solanum* del clado *Morelloide* con $2n = 24$. **A:** *S. aloysiifolium* 2210, **B:** *S. aloysiifolium* 2152, **C:** *S. americanum*, **D:** *S. chenopodioides*, **E:** *S. concarense*, **F:** *S. hastatilobum*. Barra = 6 μm . Las flechas indican satélites.

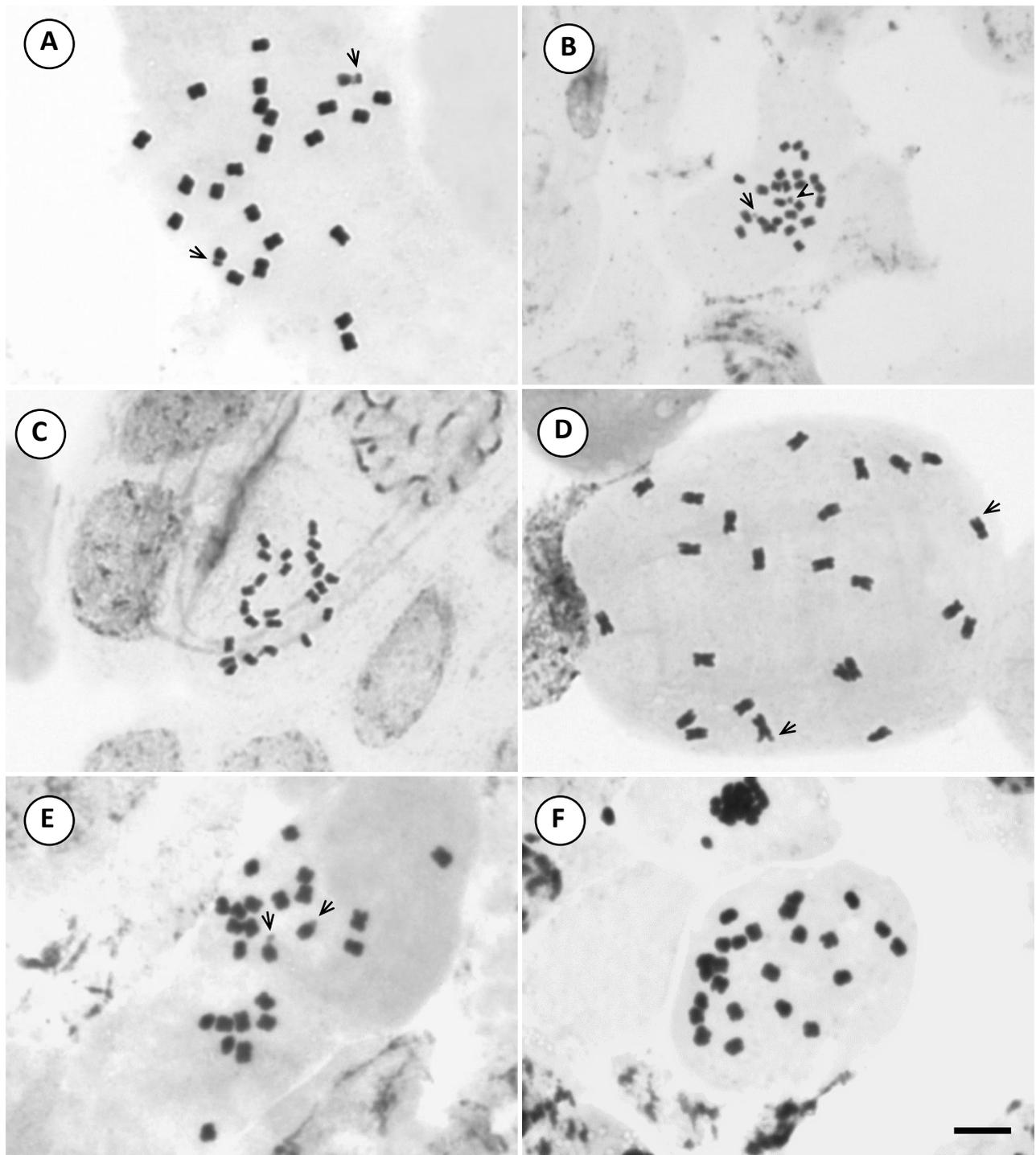


Fig. 7: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de *Solanum* del clado *Morelloide* con $2n = 24$. **A:** *S. echegarayi*, **B:** *S. palitans*, **C:** *S. pilcomayense* 2279, **D:** *S. pilcomayense* 2287, **E:** *S. reductum*, **F:** *S. sarrachoides*. Barra = 6 μm . Las flechas indican satélites.

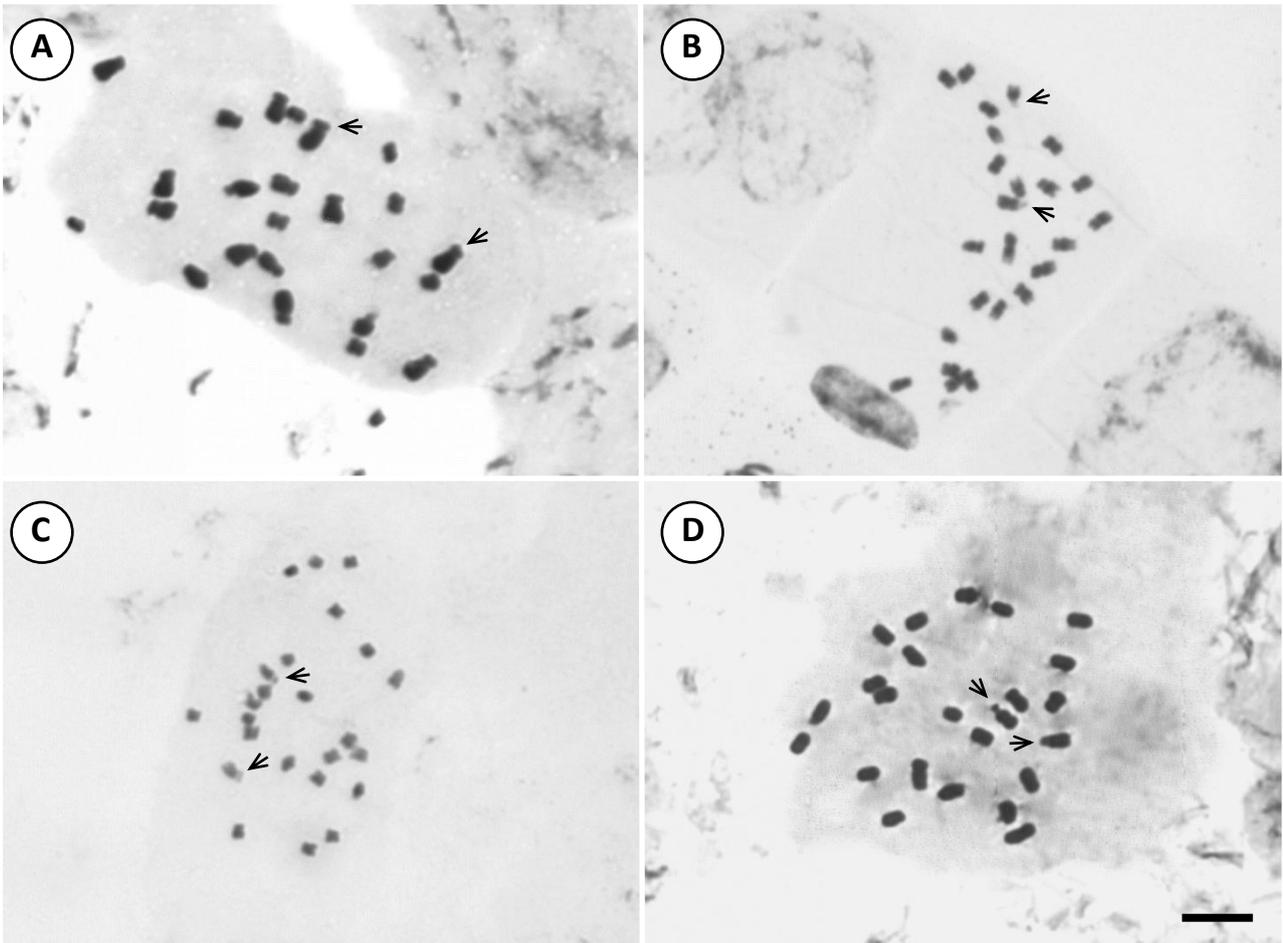


Fig. 8: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de *Solanum* del clado *Morelloide* con $2n = 24$. **A:** *S. sinuatirecurvum*, **B:** *S. triflorum*, **C:** *S. tripartitum*, **D:** *S. zuloagae*. Barra = 6 μm . Las flechas indican satélites.

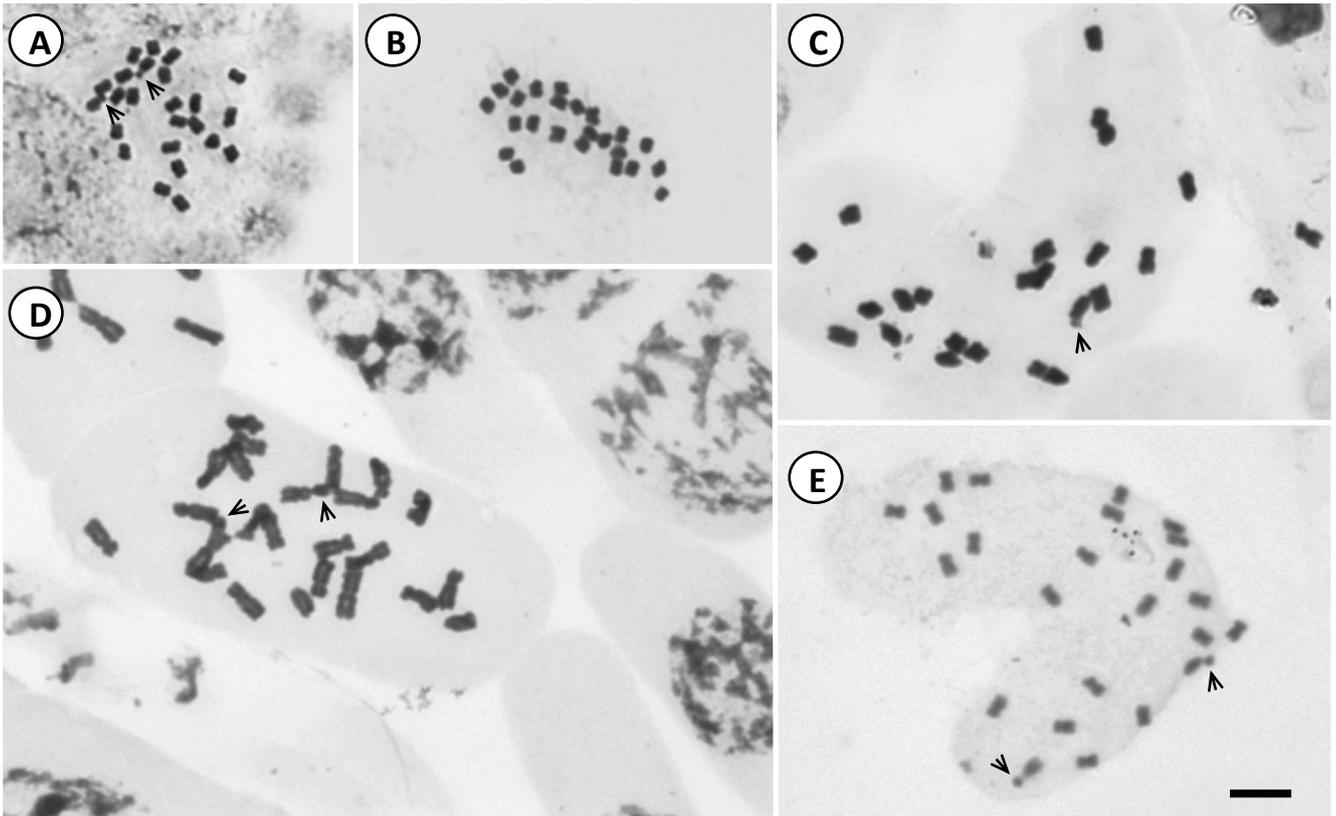


Fig. 9: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide* con $2n = 24$. **A:** *S. aligerum*, **B:** *S. amygdalifolium*, **C:** *S. angustifidum*, **D:** *S. crispum*, **E:** *S. dulcamara*. Barra = 6 μm . Las flechas indican satélites.

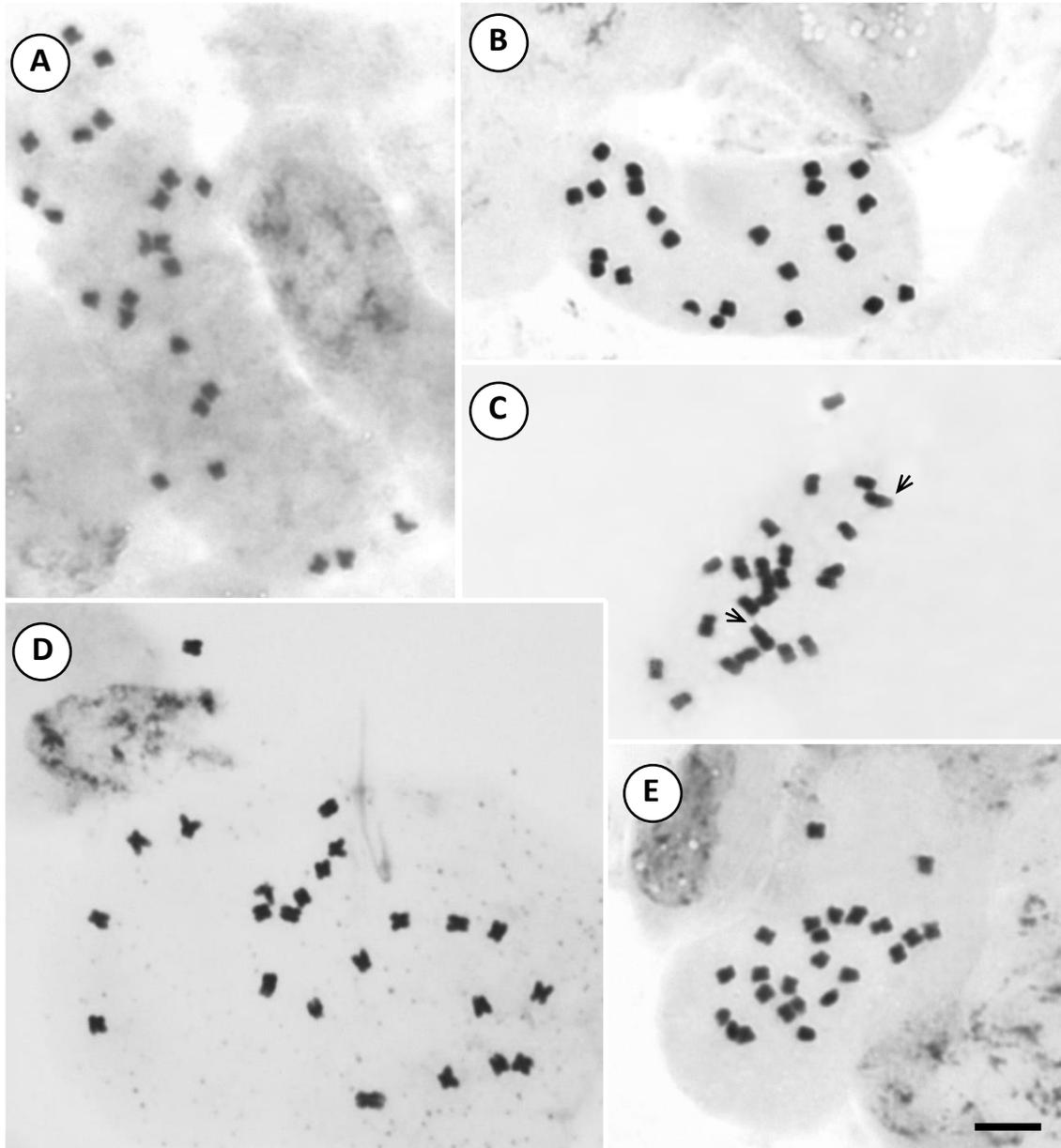


Fig. 10: Fotomicrografías de metafases mitóticas en especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide* con $2n = 24$. **A:** *S. endoadenium*, **B:** *S. salicifolium* 3488, **C:** *S. salicifolium* 818, **D:** *S. salicifolium* 3158, **E:** *S. salicifolium* 794. Barra = 6 μm . Las flechas indican satélites.

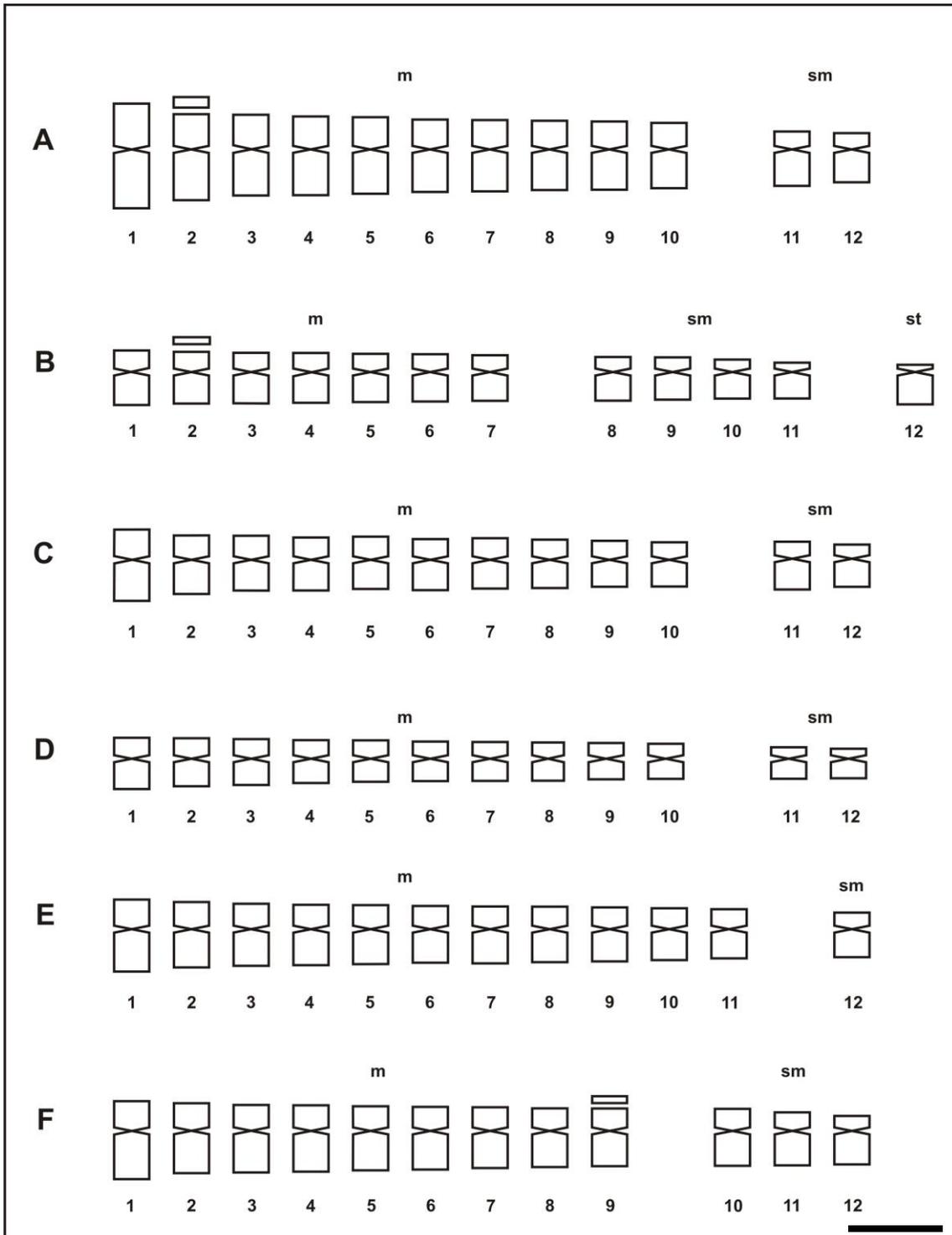


Fig. 11: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A** = *S. aloysiifolium* 2210, **B** = *S. aloysiifolium* 2152, **C** = *S. americanum*, **D** = *S. chenopodioides*, **E** = *S. concarense*, **F** = *S. echeagarayi*. Barra = 3 μ m.

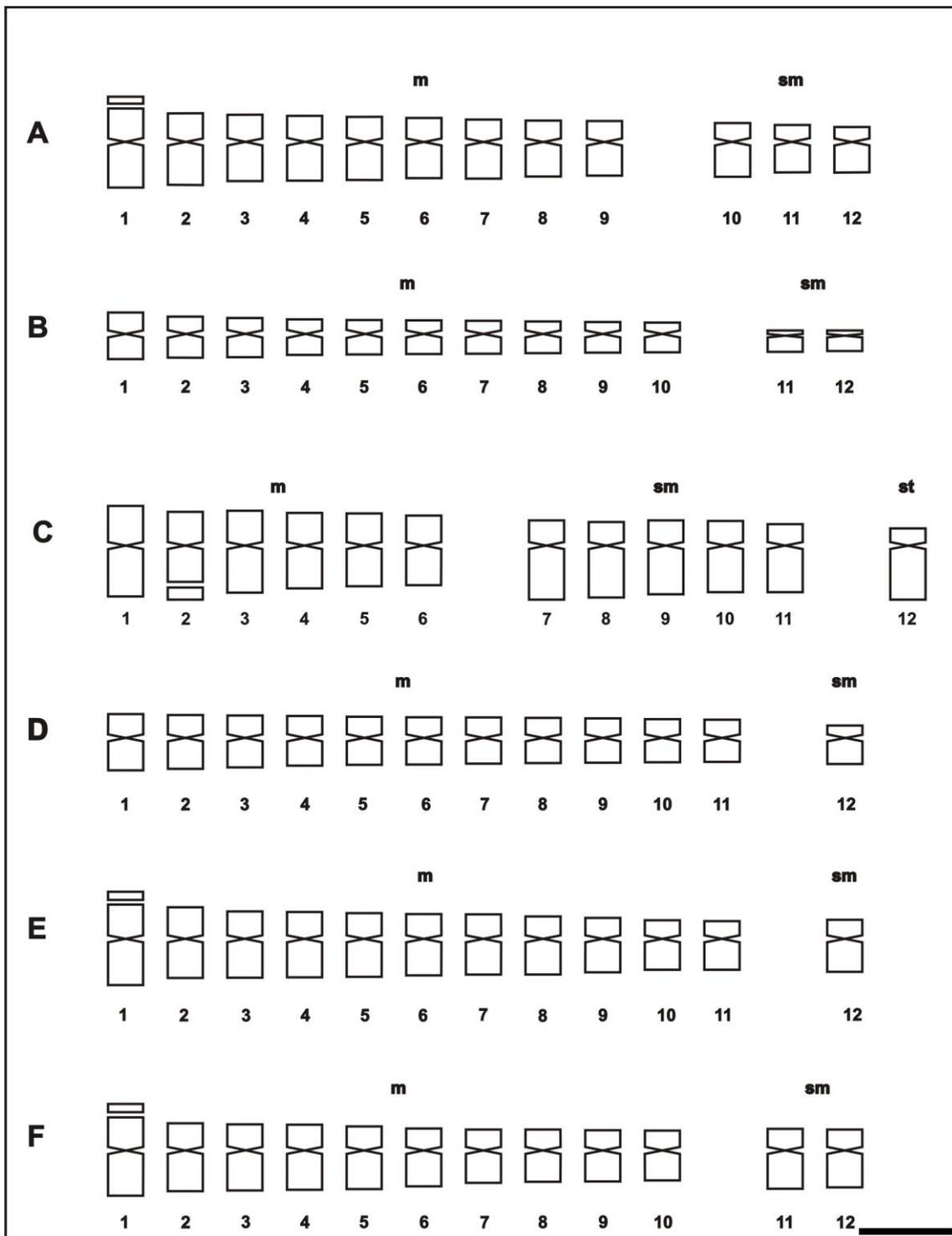


Fig. 12: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A** = *S. hastatilobum*, **B** = *S. palitans*, **C** = *S. pilcomayense* 2287, **D** = *S. pilcomayense* 2279, **E** = *S. reductum*, **F** = *S. sarrachoides*. Barra = 3 μm .

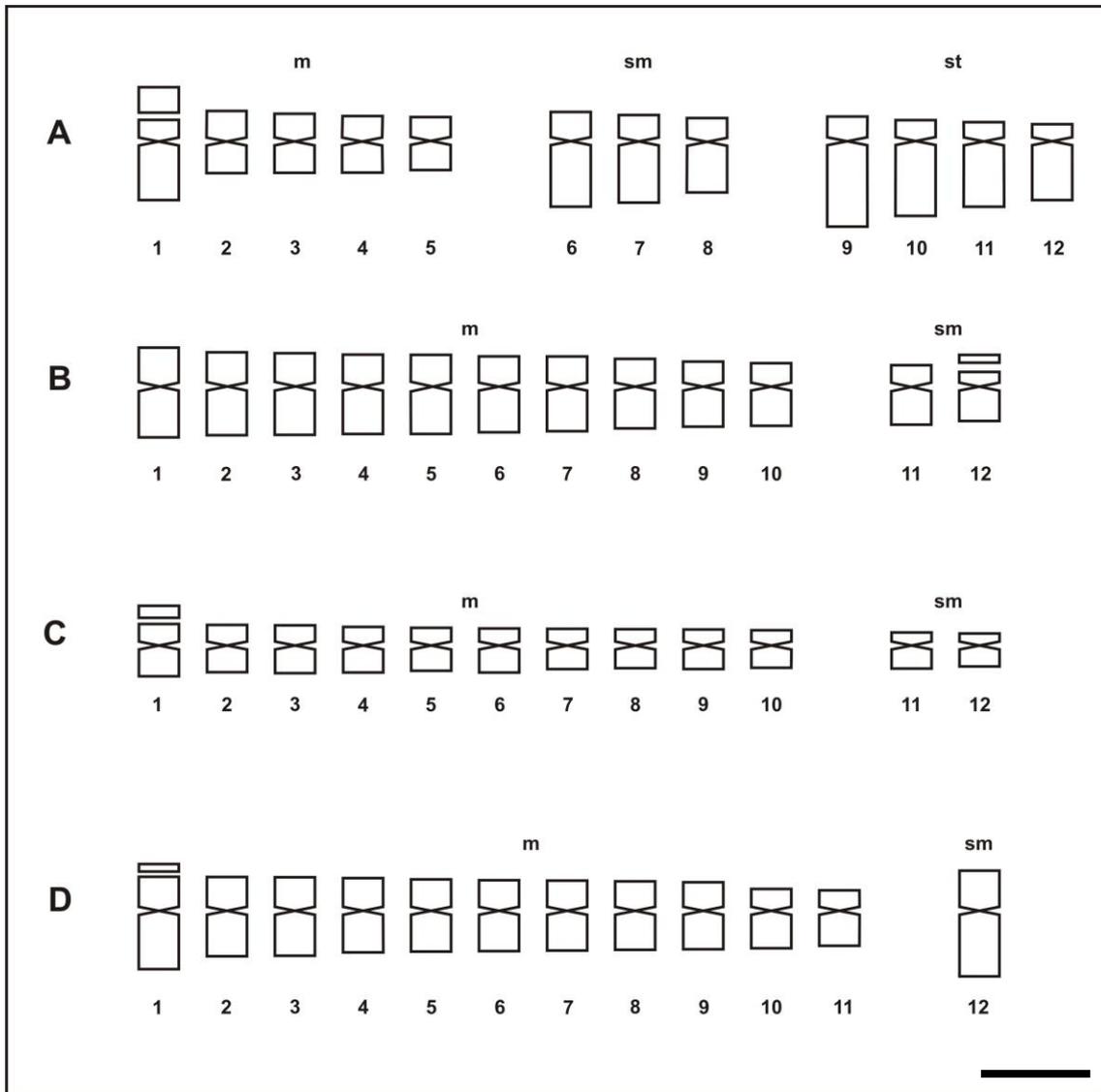


Fig. 13: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A** = *S. sinuatirecurvum*, **B** = *S. triflorum*, **C** = *S. tripartitum*, **D** = *S. zuloagae*. Barra = 3 μ m.

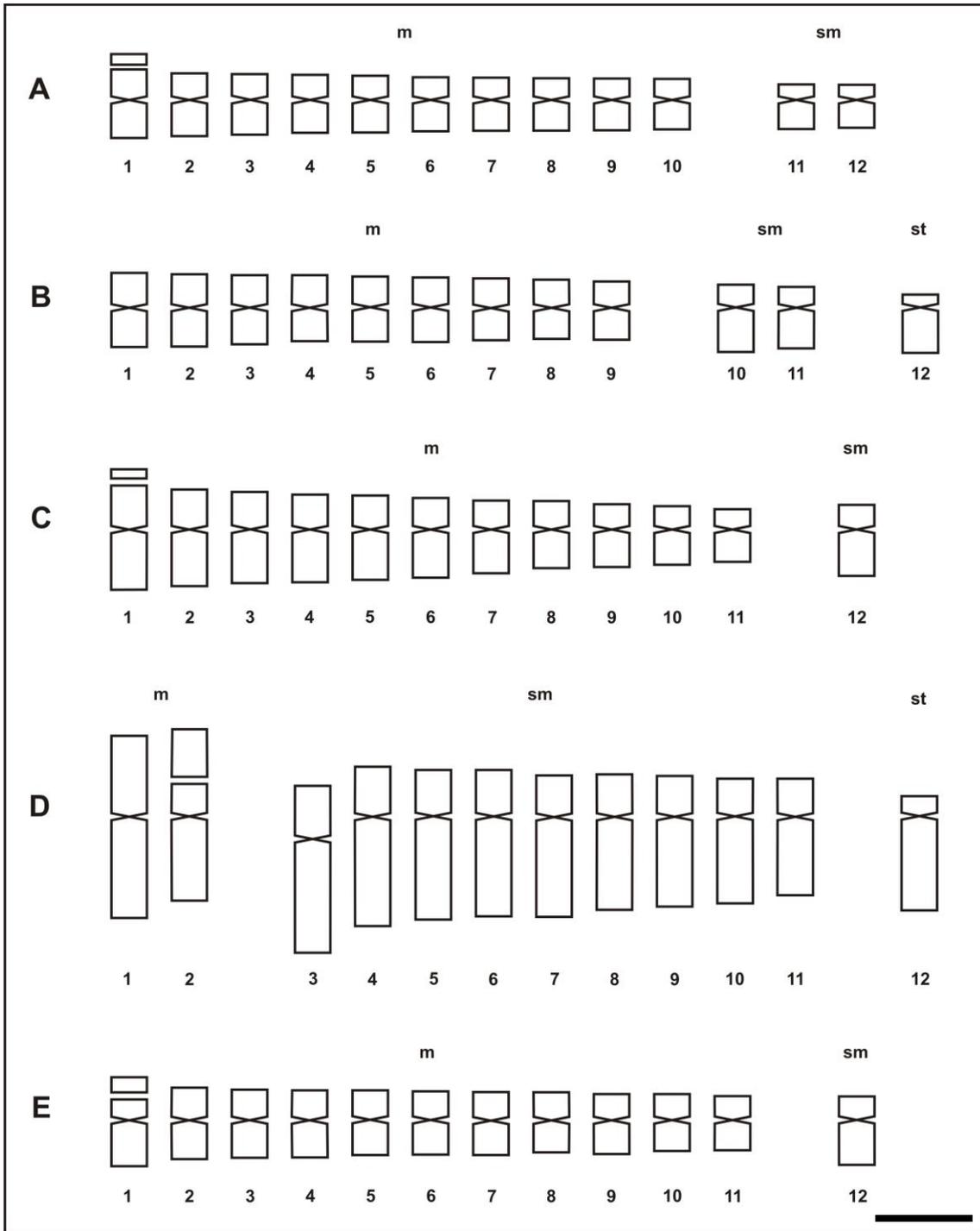


Fig. 14: Idiogramas de especies del clado *Dulcamaroide*. **A** = *S. aligerum*, **B** = *S. amygdalifolium*, **C** = *S. angustifidum*, **D** = *S. crispum*, **E** = *S. dulcamara*. Barra = 3 μ m.

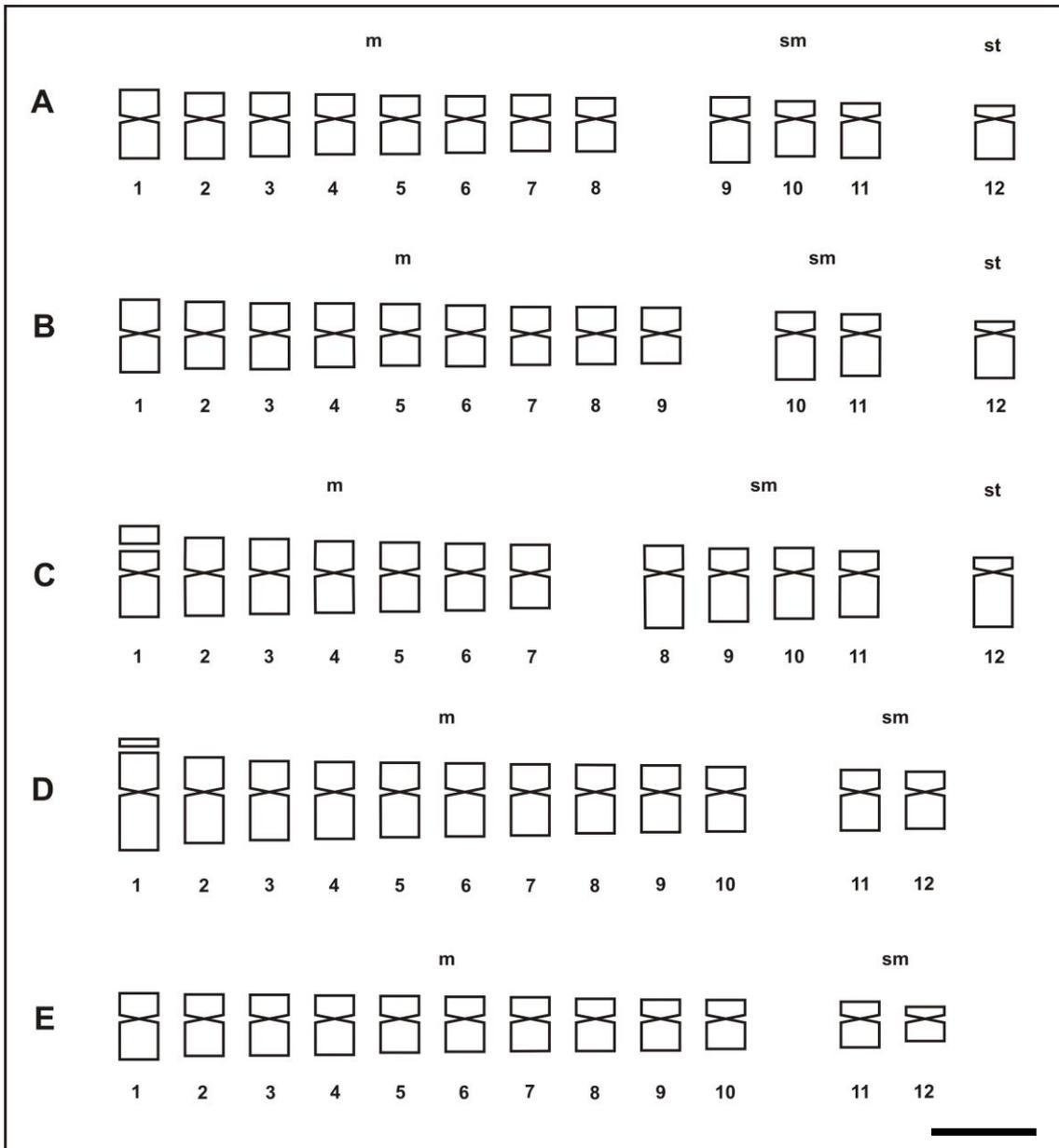
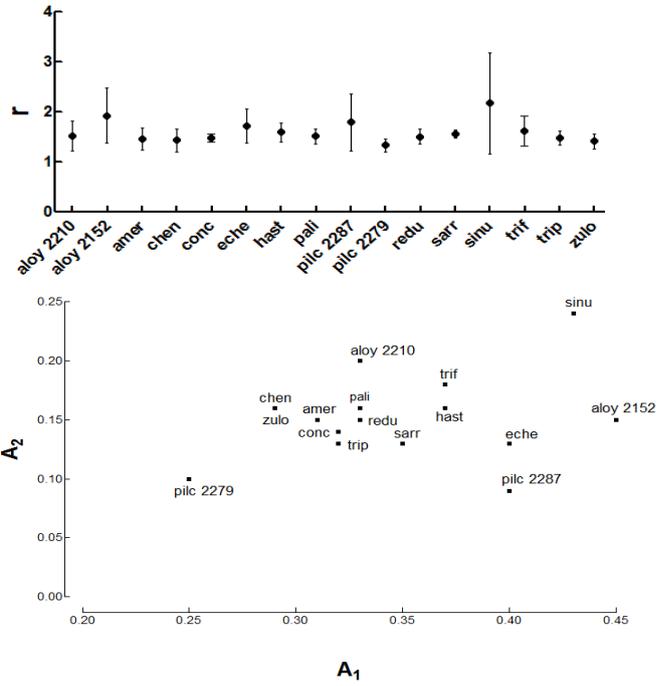
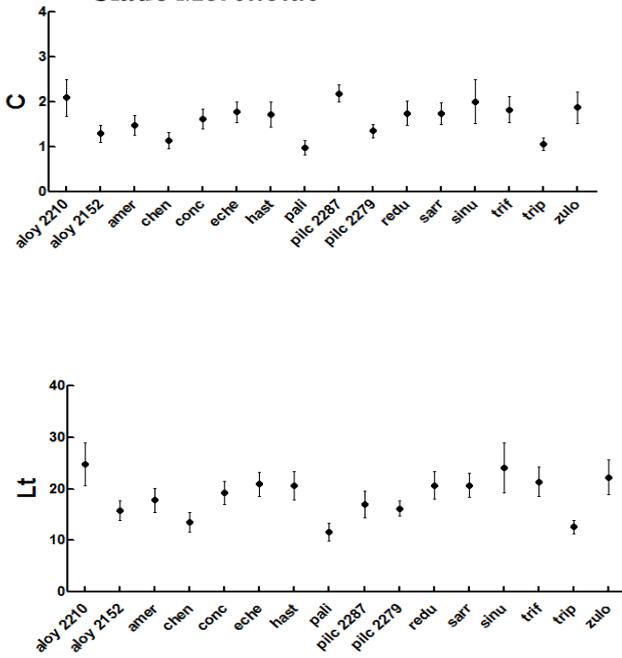


Fig. 15: Idiogramas de especies del clado *Dulcamaroide*. **A** = *S. endoadenium*, **B** = *S. salicifolium* 3488, **C** = *S. salicifolium* 3158, **D** = *S. salicifolium* 818, **E** = *S. salicifolium* 794. Barra = 3 μ m.

Clado *Morelloide*



Clado *Dulcamaroide*

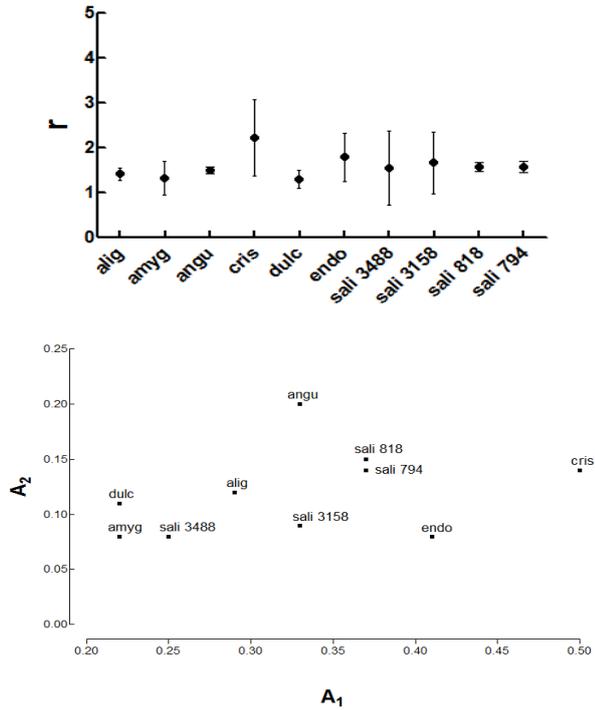
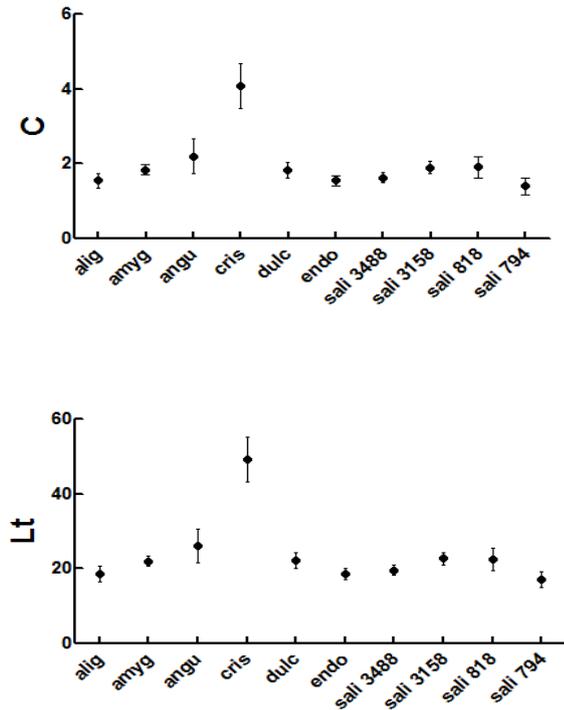


Fig. 16: Comparación de caracteres cariotípicos para los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*. **C** = Longitud cromosómica media; **r** = Índice braquial medio; **Lt** = Longitud total del complemento haploide; **A₁/ A₂** = Índices de asimetría intra e intercromosómicos. *Morelloide*: *S. aloysiifolium* 2210 = aloy 2210, *S. aloysiifolium*

2152 = aloy 2152, *S. americanum* = amer, *S. chenopodioides* = chen, *S. concareense* = conc, *S. echezarayi* = eche, *S. hastatilobum* = hast, *S. palitans* = pali, *S. pilcomayense* 2287 = pilc 2287, *S. pilcomayense* 2279 = pilc 2279, *S. reductum* = redu, *S. sarrachoides* = sarra, *S. sinuatirecurvum* = sinu, *S. triflorum* = trif, *S. tripartitum* = trip, *S. zuloagae* = zulo. *Dulcamaroides*: *S. aligerum* = alig, *S. amygdalifolium* = amyg, *S. angustifidum* = angu, *S. crispum* = cris, *S. dulcamara* = dulc, *S. endoadenium* = endo, *S. salicifolium* 3488 = sali 3488, *S. salicifolium* 3158 = sali 3158, *S. salicifolium* 818 = sali 818, *S. salicifolium* 794 = sali 794.

Discusión

Los análisis cromosómicos con tinción clásica mostraron que las especies de *Solanum* estudiadas presentaron $2n= 24$ cromosomas, en concordancia con los datos disponibles en el Index to Plant Chromosome Numbers (<http://mobot.mobot.org/W3T/search/ipcn.html>), para este género. Por otro lado, éste es el número cromosómico más frecuente para *Solanum*, estando presente en más del 90% de las especies conocidas (cf. Acosta & Moscone, 2000; Hunziker, 2001; Acosta *et al.*, 2005, 2012). También es predominante en la subfamilia Solanoideae para los géneros *Triguera*, *Lycopersicon*, *Lycianthes* y *Vassobia*, entre otros (Hunziker, 2001). Sólo 2 especies del clado *Leptostemonum* presentaron $2n= 22$: *S. mammosum* y *S. platense* (Chiarini & Bernardello, 2006). También fueron reportados números distintos de $x= 12$ en grupos como *Petunia*, con $x= 7$ (Raven, 1975) y *Fabiana*, con $x= 9$ (Hunziker, 2001) así como también en la subfamilia Cestroideae, donde predomina $x= 8$ (Olmstead *et al.*, 1999; Hunziker, 2001).

Solanum, en general, se caracteriza por poseer cromosomas pequeños (ca. 4 μm de longitud) (e.g., Bernardello & Anderson, 1990; Bernardello *et al.*, 1994; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini & Bernardello, 2006; Rego *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011), como la mayoría de los cromosomas estudiados en la presente tesis. Se encontraron excepciones en *S. corymbiflorum* donde el tamaño fue de 6,5 μm y en especies del grupo *Cyphomandra*, con cromosomas que varían de 3 a 14 μm de longitud (e.g., Pringle & Murray, 1991; Moscone, 1992; Rego *et al.*, 2009; Miguel *et al.*, 2012). En este trabajo, sólo *S. crispum* del clado *Dulcamaroide* presentó cromosomas de 4,09 μm de longitud.

Las diferencias en el tamaño cromosómico han sido utilizadas en varias oportunidades para delimitar algunos grupos de Solanáceas. Este es el caso de *Cyphomandra* que posee cromosomas muy grandes en relación al resto de las especies de *Solanum*. Estas características cariotípicas y otras de tipo morfológico, llevaron a algunos autores a considerar a tal grupo como un género independiente, *Cyphomandra* (Bohs, 1989, 1994; Child & Lester, 2001; Hunziker, 2001). No obstante, en los análisis de filogenia molecular, utilizando los genes cloroplásticos conservados *ndhF* y *rbcL*, establecieron que *Cyphomandra* se encuentra filogenéticamente dentro del género *Solanum* (Olmstead & Palmer, 1992; Bohs, 1995; Olmstead & Palmer, 1997; Bohs & Olmstead, 1999; Olmstead *et al.*, 1999; Bohs, 2005). Chiarini (2013) incluye a *S.*

reductum dentro de *Cyphomandra* porque reúne muchos de los rasgos morfológicos que caracterizan a este grupo. De acuerdo a los análisis citogenéticos realizados para esta especie en la presente tesis, se mantiene a *S. reductum* en el clado *Morelloide* hasta tanto se cuente con más evidencias que aclaren sus relaciones filogenéticas, ya que posee cromosomas pequeños a diferencia del resto de las entidades en *Cyphomandra*, que son notables dentro de *Solanum* por poseer cromosomas grandes.

En Solanáceas, y particularmente en *Solanum*, prevalecen los cromosomas *m* y *sm* (e.g., Trivedi & Sinha, 1986; Bernardello & Anderson, 1990; Bernardello *et al.*, 1994; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini & Bernardello, 2006). Por otro lado, los cromosomas *st* son raros, sólo uno o dos pares en algunas especies (e.g., Trivedi & Sinha, 1986; Bernardello & Anderson 1990; Bernardello *et al.*, 1994; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini & Bernardello, 2006). En el clado *Morelloide*, *S. sinuatirecurvum* presentó un alto número de pares de cromosomas *st* (4), siendo éste el primer reporte para el clado y para el género *Solanum*. Además, las poblaciones estudiadas de *S. aloysiifolium* (2210 y 2152) difieren ampliamente en sus fórmulas cariotípicas ($10 m + 2 sm$ y $7 m + 4 sm + 1 st$, respectivamente) al igual que las analizadas de *S. pilcomayense* (2287 y 2279; con $6 m + 5 sm + 1 st$ y $11 m + 1 sm$, respectivamente). En el análisis discriminante se observó que estas dos últimas poblaciones, junto con *S. sarrachoides* y *S. echegarayi* podrían incluirse dentro de *Dulcamaroide*. Sin embargo, no existen otras evidencias más que los caracteres cariotípicos y el análisis estadístico resultante que soporten esa inclusión. Además, desde el punto de vista morfológico esta posición no sería la más adecuada ya que se trata de especies netamente herbáceas. *Solanum ratum* C.V. Morton y *S. restrictum* C.V. Morton, fueron sinonimizados bajo el nombre de *S. salicifolium* y se incluyeron dentro de *Dulcamaroide* por el hábito leñoso y considerando las distintas formas de las hojas como un carácter altamente variable (Knapp, 2013). En cuanto a las distintas poblaciones analizadas de *S. salicifolium*, *S. salicifolium* 818 corresponde a lo que se llamó *S. ratum* y *S. salicifolium* 794 a *S. restrictum*. Ambas especies pertenecían a la sección *Solanum* (Morton, 1976) o al clado *Morelloide* (www.nhm.ac.uk/research/solanaceaesource). Estas 2 especies también presentaron fórmulas cariotípicas distintas (ambas con $10 m + 2 sm$) a *S. salicifolium sensu stricto* (*S. salicifolium* 3488) ($9 m + 2 sm + 1 st$). A partir del análisis estadístico discriminante, estas entidades quedan incluidas en grupos diferentes (Fig. 5), con lo cual este análisis estadístico no brinda soporte a tal sinonimia. Por ende, nuestro análisis cariotípico

sostiene que *S. ratum* / *S. restrictum* y *S. salicifolium* serían especies distintas. A diferencia de lo que sucedió con las otras poblaciones, esta inclusión fue justificada con las disimilitudes que también se revelaron con los análisis de bandeo cromosómico y FISH, como se verá en los próximos capítulos.

El número de pares cromosómicos con satélites es variable en Solanáceas; por ejemplo, en *Capsicum* se hallaron de 1 a 4 pares (Moscone, 1999), *Lycium* siempre mostró 1 par (e.g., Stiefkens & Bernardello, 2002; Stiefkens *et al.*, 2010) y en las especies de *Hyoscyamus* de 1 a 3 (Sheidai *et al.*, 1999). La mayoría de las especies de *Solanum* exhibieron satélites en los brazos cortos de los correspondientes cromosomas: 1 par (como los encontrados en este trabajo en ambos clados), 2 pares (en *S. pseudolulo*, Bernardello *et al.*, 1994) o 3 pares (en especies del complejo *S. indicum*, Krishnappa & Chennaveeraiah, 1975). En muy pocos trabajos se reportaron satélites en los brazos largos, tal es el caso de *Nicotiana* (Moscone, 1989), *Datura* (Palomino *et al.*, 1988; Moscone, 1989), *Cestrum* (Sharma & Sharma, 1957) y *Solanum* (Bernardello & Anderson, 1990). En el clado *Morelloide*, *S. pilcomayense sensu stricto* (*S. pilcomayense* 2287) fue la única especie estudiada con satélites en los brazos largos. Acerca del tamaño, éstos pueden variar dependiendo de la especie, siendo destacable *S. crispum* (*Dulcamaroide*) ya que presentó un par de satélites más grandes que el brazo corto del cromosoma que lo porta.

Solanum presenta inconvenientes al momento de delimitar sus taxones para definir una circunscripción infragenérica aceptable (e.g., D'Arcy, 1991; Nee, 1999; Bohs, 2005; Weese & Bohs, 2007). Nuestros análisis cariotípicos en especies de *Morelloide* y *Dulcamaroide* permitieron detectar diferencias entre los taxones examinados. Por consiguiente, la variación en los cromosomas, aunque no siempre de magnitud acompañada por la divergencia evolutiva de las especies estudiadas, es un fenómeno general observado tanto en plantas como en animales (e.g., Goodspeed, 1954; Rieseberg, 2001). De este modo, las similitudes en los cariotipos, podrían indicar relaciones entre los taxa. Nee (1999), por ejemplo, no considera a *S. triflorum*, *S. tripartitum* y *S. palitans* como especies estrechamente relacionadas, colocando a *S. triflorum* en la sección *Solanum* (*Morelloide*) y a *S. tripartitum* y *S. palitans* en la sección *Dulcamara* (*Dulcamaroide*). Por el contrario, Bohs (2005), Weese & Bohs (2007) y Knapp (2013), a través de análisis de secuencias de genes *ndhF* de cloroplastos y estudios a nivel morfológico, las incluyen en *Morelloide*. Nuestros resultados

concuerdan con este último esquema, ya que todas exhiben la misma fórmula cariotípica. Además, *S. tripartitum* y *S. palitans* se encuentran en la categoría 1 A de Stebbins (1971) y muestran valores similares de Lt y C (Tabla 2), mientras que *S. triflorum* se incluyó en la categoría 2 B y sus valores para Lt y C son mayores. Este hecho podría indicar a *S. tripartitum* y *S. palitans* como especies que están estrechamente relacionadas, en concordancia con Bohs (2005), Weese & Bohs (2007) y Sarkinen *et al.* (2013).

Stebbins (1971), consideró como primitivos a los cariotipos que presentan altos niveles de simetría pero también han sido propuestos mecanismos de ortoselección cariotípica para el mantenimiento de los complementos formados por cromosomas de aproximadamente la misma longitud y con centrómeros medios o submedios (Moscone *et al.*, 2003). Diferentes géneros de Solanáceas, tales como *Hyoscyamus*, *Lycium*, *Dyssochroma*, *Cestrum* y *Capsicum*, podrían haber experimentado este fenómeno. De hecho, el incremento en la asimetría de los cariotipos podría ser considerado como un carácter avanzado, como mencionaran Chiarini & Barboza (2008) para *Jaborosa*. *Solanum* fue incluido en la categoría 1 A por Stebbins (1971) debido a la presencia de cariotipos altamente simétricos, como fuera también reportado posteriormente por distintos autores (e.g., Bernardello & Anderson, 1990; Acosta *et al.*, 2005; Chiarini & Bernardello, 2006). Sin embargo, nuestros datos indican que *Morelloide* y *Dulcamaroide* tienen un rango de cariotipos que van desde simétricos (la mayoría de las especies aquí estudiadas) a los considerados como más asimétricos (*S. sinuatirecurvum* y *S. crispum*). Antes de la clasificación de Bohs (2005), *S. sinuatirecurvum* estaba incluido en la sección *Episarcophyllum* Bitter (*Solanum* subgénero *Solanum*).

Los datos disponibles sugieren que la gran diversificación en *Solanum* fue acompañada por arreglos estructurales poco visibles en los cromosomas (Stebbins, 1971). Es posible, además, que los cambios estructurales que no son detectados en los cariotipos tales como inversiones y translocaciones se hayan producido y que esos cambios puedan ser más frecuentes que los arreglos visibles (e.g., Stebbins, 1971; Bernardello & Anderson, 1990; Bernardello *et al.*, 1994). Este podría ser el caso de los cladogramas examinados en la presente tesis para los distintos taxones examinados.

Estos datos cariotípicos contribuyeron a una mejor comprensión de la sistemática del grupo. Sin embargo, es necesario obtener análisis cariotípicos más detallados y acompañados con estudios filogenéticos para obtener más conocimiento acerca de las

posibles tendencias carioevolutivas en *Morelloide* y *Dulcamaroide*. Como se analizará en los siguientes capítulos, técnicas como el bandeo cromosómico CMA/DAPI e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que aportan valiosos datos sobre la estructura de los cromosomas, nos permitirán determinar homeologías cromosómicas entre estos dos grupos estrechamente relacionados.

Conclusiones

- Se contaron los cromosomas mitóticos de 26 especies de *Solanum*, 16 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 10 al clado *Dulcamaroide*. Todas las entidades aquí estudiadas mostraron un número cromosómico de $2n=2x=24$.
- Son informados por primera vez los números cromosómicos de 9 taxones y se confirman los guarismos de las especies restantes.
- Los taxones analizados de *Morelloide* presentaron cariotipos constituidos en su mayoría por cromosomas *m* y *sm*. Sólo *S. aloysiifolium* 2152, *S. pilcomayense* 2287 y *S. sinuatirecurvum* presentaron cromosomas *st*. Esta última especie, con 4 pares *st*, representó el primer reporte para el clado y para el género *Solanum*.
- En el clado *Dulcamaroide*, la mayoría de las especies exhibieron cromosomas *m*, excepto *S. crispum* con la mayoría de sus cromosomas *sm*. También mostraron cromosomas *st*: *S. amygdalifolium*, *S. salicifolium* 3488, *S. endoadenium* y *S. salicifolium* 3158.
- En general, los cromosomas de ambos clados fueron pequeños, con longitudes que variaron en un rango de 0,97 μm en *S. palitans* (*Morelloide*) a 4,09 μm en *S. crispum* (*Dulcamaroide*).
- La ocurrencia de un par de satélites fue común en los taxones examinados, destacándose *S. pilcomayense* 2287 (*Morelloide*) por ser la única entidad en presentar satélites en los brazos largos del cromosoma correspondiente y *S. crispum* (*Dulcamaroide*) por poseer un par de satélites más grandes que el brazo corto del cromosoma que lo porta.
- Los cariotipos de los taxones estudiados fueron principalmente simétricos, según los índices de asimetría utilizados para el análisis. *S. sinuatirecurvum*, con $5 m + 3 sm + 4 st$ (*Morelloide*) y *S. crispum*, con $2 m + 9 sm + 1 st$ (*Dulcamaroide*) resultaron ser las especies con los cariotipos más asimétricos.

- De acuerdo a los resultados del análisis estadístico discriminante, no fue posible confirmar la sinonimia de *S. ratum*/*S. restrictum* y *S. salicifolium*, ya que estas especies quedan incluidas en grupos diferentes.

Capítulo 3: BANDEO CROMOSÓMICO

Introducción

El bandeo cromosómico CMA/DAPI fluorescente revela la heterocromatina constitutiva (HC), su composición y distribución en los cromosomas (Mizianty, 1985; Henning, 1999; Guerra, 2000). Además, la doble tinción directa sobre los cromosomas con fluorocromos base – específicos no requiere de tratamientos físicos o químicos y la mayoría de las regiones teñidas son aquellas que presentan gran afinidad por un fluorocromo en particular (Sumner, 1990). La combinación más frecuentemente usada para diferenciar bandas cromosómicas es la doble tinción con CMA₃ (cromomicina A₃) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) (Guerra, 2000). Debido a que el CMA y el DAPI se unen preferencialmente a secuencias ricas en GC y AT, respectivamente (Sumner, 1990), permiten la identificación de diferentes tipos de bandas de heterocromatina ricas en GC (CMA⁺/DAPI⁻), ricas en AT (CMA⁻/DAPI⁺) o neutrales AT/GC (CMA⁰/DAPI⁰) (Guerra, 2000).

Los bloques de heterocromatina pueden encontrarse en todas las partes que componen a los cromosomas. Sin embargo, están presentes especialmente en determinadas regiones cromosómicas, lo que sugiere entonces que la HC tiene una finalidad funcional (Sumner, 1990; Guerra, 2000). Estos bloques heterocromáticos son usualmente heteromórficos, esto es, difieren con frecuencia en tamaño entre individuos de la misma especie y entre cromosomas homólogos en el mismo individuo (Sumner, 2003). La mayoría de estos segmentos contienen elevadas concentraciones de ADN repetitivo (ADN satélite) que pueden variar en composición y tamaño sin efectos notorios en el organismo entero. De esta manera, para el análisis de patrones de bandas heterocromáticas de distintas especies, resulta importante considerar que la HC varía en calidad y en cantidad entre los taxones y que, aún en una misma especie, el polimorfismo para número y tamaño de las bandas es frecuente (Vosa, 1989; Sumner, 1990; Guerra, 2000). Todos estos aspectos resultan esenciales para la caracterización del cariotipo de una especie, ya que aún aquellas que se encuentran estrechamente relacionadas pueden diferir en cuanto a la cantidad de heterocromatina presente en sus cromosomas (Guerra, 2000).

El bandeo CMA/DAPI ha sido reconocido como un método confiable para distinguir algunos tipos de HC en plantas (Vosa, 1976; Schweizer, 1976; Schweizer & Ambros, 1994). Se ha aplicado con éxito en diferentes angiospermas para determinar la distribución de heterocromatina, por ejemplo: *Capsicum* y *Nierembergia* (Solanaceae,

Moscone *et al.*, 1996 y Acosta, 2006 respectivamente), Aurantioideae (Rutaceae, Guerra, 2000), Caesalpinoideae y Papilionoideae (Fabaceae, Souza & Benko-Iseppon, 2004), *Urvillea* (Sapindaceae, Urdampilleta *et al.*, 2006), Cactaceae (Las Peñas *et al.*, 2008), entre otras. También han sido herramientas útiles en la caracterización de genomas en grupos de especies vegetales relacionadas, como en los géneros *Arachis* (Robledo & Seijo, 2008, 2010), *Centaurea* (Font *et al.*, 2008), *Citrus* (Guerra, 1993), *Phleum* (Cai & Bulum, 1991) y *Triticum* (Friebe & Gill, 1996). Por su parte, Moscone *et al.* (1996), Fregonezi *et al.* (2006) y Stiefkens *et al.* (2010) utilizaron el bandeo cromosómico para identificar especies en *Cestrum*, *Lycium* y *Capsicum*, respectivamente.

En *Solanum*, los datos cariotípicos para los patrones de bandeo de HC, han sido obtenidos para unas 50 especies (Pijnacker & Fewerda, 1984; Pringle & Murray, 1993; Sultana & Adam, 2007; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011; Acosta *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2012).

Por lo tanto, sobre la base de los antecedentes expuestos se prevé que el análisis del patrón de bandas generado mediante el bandeo CMA/DAPI, aporten nuevos marcadores cromosómicos que contribuyan al esclarecimiento de las relaciones evolutivas y sistemáticas entre las especies de *Solanum* de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*.

Materiales y Métodos

Los taxones analizados con bandeo CMA/DAPI fueron los siguientes: *S. aloysiifolium* 2210, *S. aloysiifolium* 2152, *S. americanum*, *S. chenopodioides*, *S. hastatilobum*, *S. palitans*, *S. pilcomayense* 2287, *S. pilcomayense* 2279, *S. triflorum* (Clado *Morelloide*) y *S. angustifidum*, *S. crispum*, *S. dulcamara*, *S. endoadenium*, *S. salicifolium* 3158, *S. salicifolium* 818 y *S. salicifolium* 794 (Clado *Dulcamaroide*).

Para contribuir a la caracterización citogenética de las especies se utilizó la tinción con cromomicina A₃ y 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (CMA/DAPI), que revela simultáneamente bandas heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos GC (bandas CMA positivas y DAPI negativas) y AT (bandas CMA negativas y DAPI positivas) según Schweizer (1979) y Schweizer & Ambros (1994) con leves modificaciones.

La fluorescencia aumentada o reducida de un segmento cromosómico se indica en el texto mediante los símbolos “+” y “-” respectivamente luego del correspondiente fluorocromo.

Para la realización de esta técnica se llevaron a cabo las preparaciones de los cromosomas somáticos mediante digestión enzimática del material, que consta de los siguientes pasos:

- Lavado de los ápices radicales fijados en agua destilada por 10 min.
- Maceración en solución enzimática de celulasa 4% (w/v) y pectinasa 40% (v/v) a 37°C por 60 min.
- Lavados en agua destilada y transferencia a ácido acético 45%.
- Disección y aplastamiento en portaobjetos.
- Remoción del cubreobjetos por congelamiento con aire líquido.
- Secado al aire a temperatura ambiente por tres a cinco días hasta su utilización.

Tinción doble CMA/DAPI (según Schwarzacher *et al.*, 1980):

- Incubación de los preparados con solución CMA (0,5g/ml tampón McIlvaine) en cámara húmeda y en oscuridad a temperatura ambiente por 1,5 hs.
- Remoción del cubreobjeto y lavado con agua destilada por 5 min.

- Incubación con solución DAPI (2 µg/µl tampón McIlvaine) en cámara húmeda y en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min.
- Remoción del cubreobjeto y lavado con agua destilada durante 10 min.
- Montaje del preparado en medio 1:1 de glicerol/tampón McIlvaine (pH 7.0).
- Los preparados se dejaron en oscuridad durante 3 días para luego ser observados con microscopio de fluorescencia.

Los correspondientes idiogramas se realizaron tomando como base los realizados para los análisis de tinción convencional para las mismas especies.

Los cromosomas fueron observados y fotografiados con un microscopio óptico Zeiss Axiophot provisto de una cámara y de un analizador de imágenes.

Resultados

Se analizaron con bandeado de fluorescencia CMA/DAPI los cromosomas mitóticos de 16 especies de *Solanum*, 9 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 7 al *Dulcamaroide* (detallado en Materiales y Métodos). En los idiogramas, las bandas heterocromáticas asociadas a NORs se representaron con color diferente, mientras que las no asociadas a NORs se representaron con un círculo.

La mayoría de las especies analizadas en este trabajo presentaron heterocromatina constitutiva rica en pares de nucleótidos GC, ya que exhibieron bandas brillantes con CMA (CMA⁺) y apagadas con DAPI (DAPI⁻) (Fig. 17, 18, 19, 20, 21 y 22). El análisis del patrón de bandas permitió describir dos tipos de heterocromatina: por un lado bandas asociadas a NORs (CMA⁺/DAPI⁻) y por otro, bandas no asociadas a NORs (CMA⁺/DAPI⁰).

En las especies estudiadas del clado *Morelloide*, se encontraron bandas CMA⁺/DAPI⁻ en 1-2 pares cromosómicos generalmente *sm* y bandas CMA⁺/DAPI⁰ en las regiones terminales de la gran mayoría de sus cromosomas. Las bandas CMA⁺/DAPI⁻ se encontraron en el primer par *sm* de *S. americanum* (Fig. 17 E-F y 23 C), *S. chenopodioides* (Fig. 18 A-B y 23 D) y *S. palitans* (Fig. 18 E-F y 24 A), en el segundo par *sm* de *S. triflorum* (Fig. 19 E-F y 24 D), en el tercer par *sm* de *S. hastatilobum* (Fig. 18 C-D y 23 E) y en el cuarto par *sm* en el caso de *S. aloysiifolium* 2152 (Fig. 17 C-D y 23 B). *Solanum triflorum* mostró también bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el primer par *m* y en *S. pilcomayense* 2287 (Fig. 19 A-B y 24 B) se destacaron bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el brazo largo del segundo par cromosómico *m*. En *S. aloysiifolium* 2210 (Fig. 17 A-B y 23 A), se hallaron bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el segundo par cromosómico *m*.

En el clado *Dulcamaroide*, todas las especies presentaron un único par de cromosomas portador de bandas CMA⁺/DAPI⁻ y la mayoría en cromosomas *m*. *Solanum angustifidum* (Fig. 20 A-B y 25 A), *S. dulcamara* (Fig. 20 E-F y 25 C) y *S. salicifolium* 3158 (Fig. 21 C-D y 25 E) exhibieron bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el primer par cromosómico *m*, mientras que sólo *S. crispum* mostró bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el segundo par *m* (Fig. 20 C-D y 25 B). En *S. endoadenium* (Fig. 21 A-B y 25 D), *S. salicifolium* 818 (Fig. 21 E-F y 25 F) y *S. salicifolium* 794 (Fig. 22 A-B y 25 G) las bandas se encontraron en cromosomas *sm*. A diferencia del clado *Morelloide*, donde la mayoría de las especies exhibieron pequeños bloques de heterocromatina constitutiva no

asociados a NORs (CMA⁺/DAPI⁰), las únicas especies que presentaron esta característica en *Dulcamaroide* fueron *S. angustifidum*, *S. salicifolium* 818 (Fig. 21 E-F y 25 F) y *S. salicifolium* 794 (Fig. 22 A-B y 25 G).

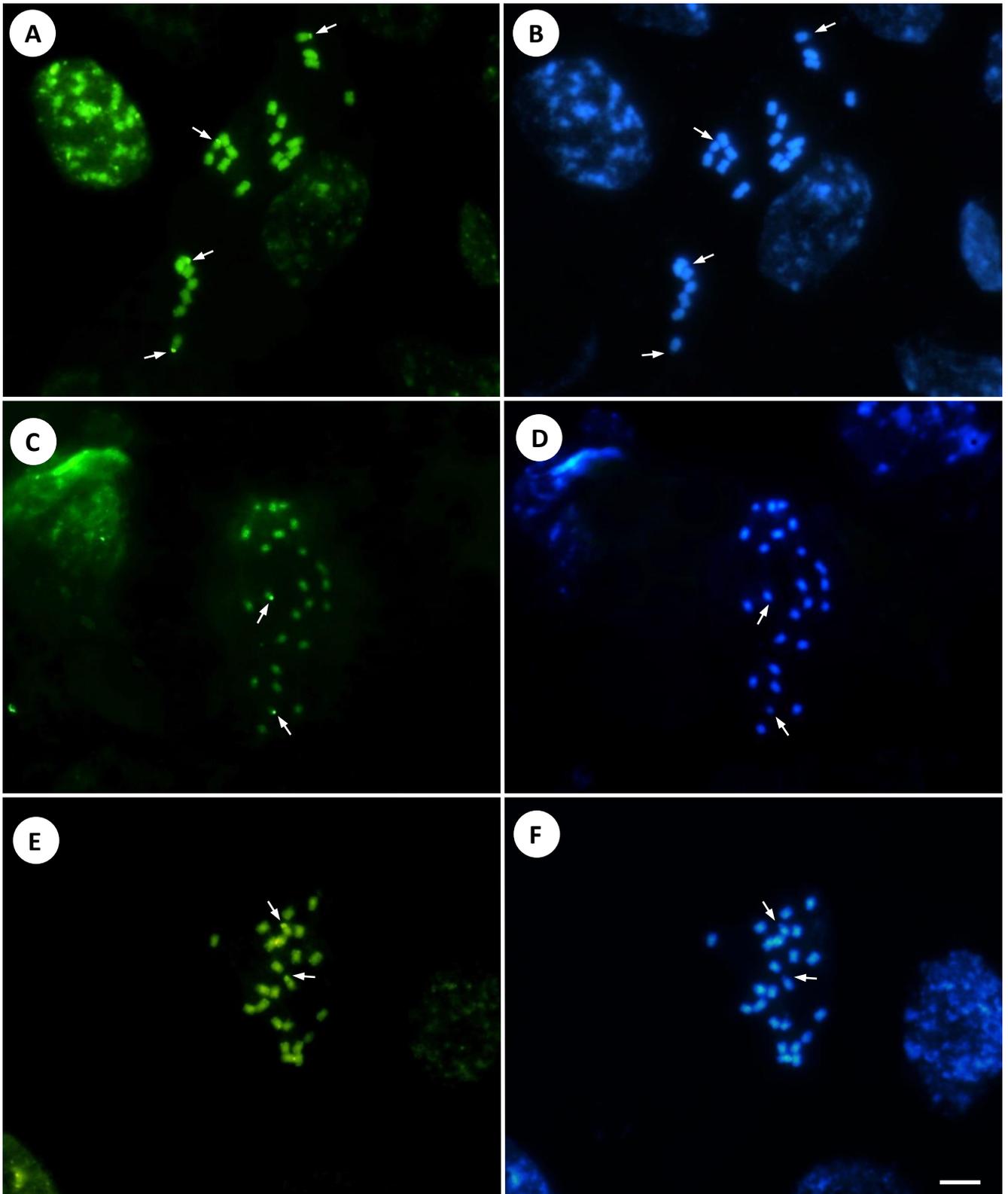


Fig. 17. Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A-B**= *S. aloysiifolium* 2210, **C-D**= *S. aloysiifolium* 2152, **E-F**= *S. americanum*. **A, C y E**: CMA; **B, D y F**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻. Barra= 6 μ m.

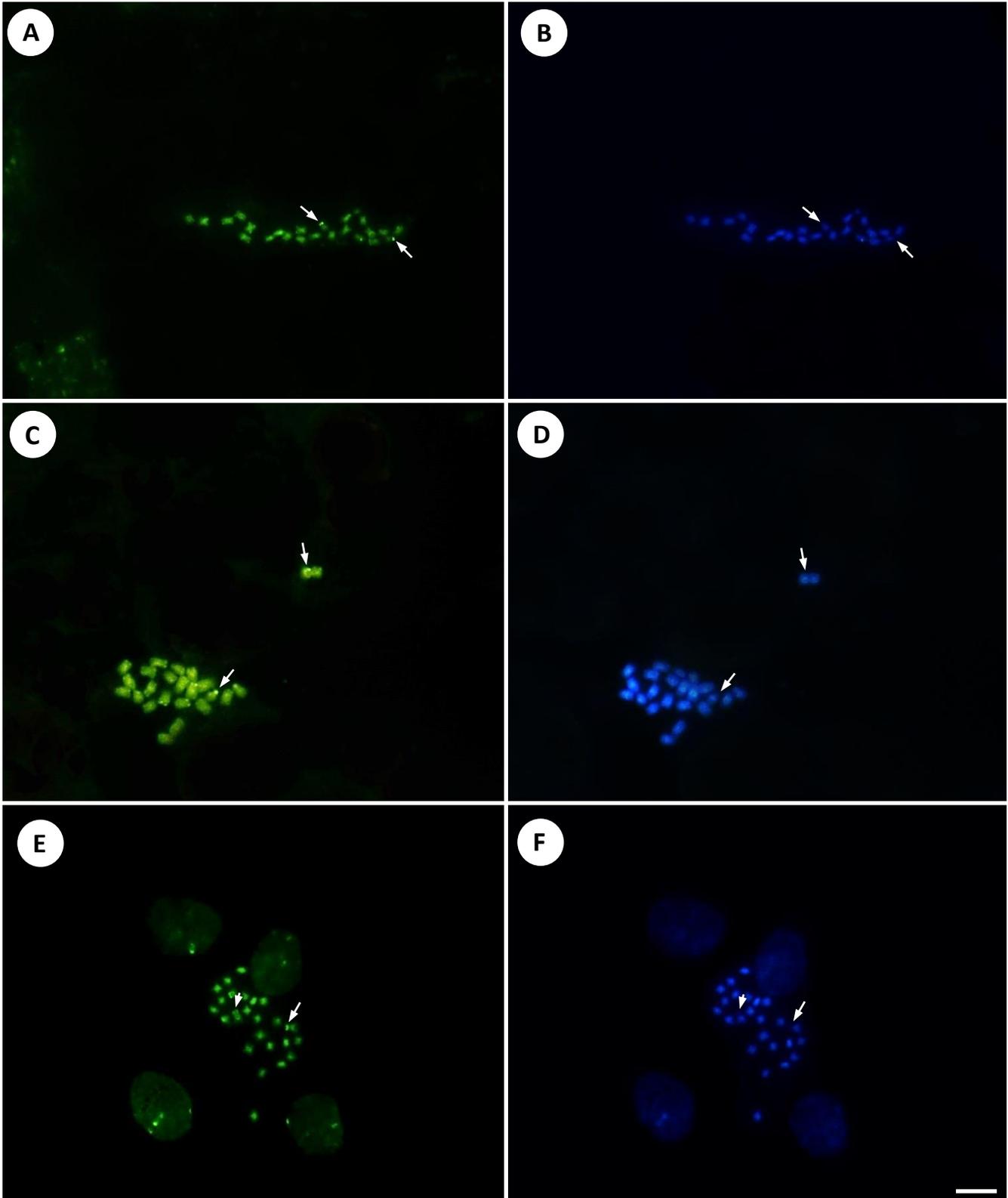


Fig. 18. Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A-B**= *S. chenopodioides*, **C-D**= *S. hastatilobum*, **E-F**= *S. palitans*. **A, C y E**: CMA; **B, D y F**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI. Barra= 6 μ m.

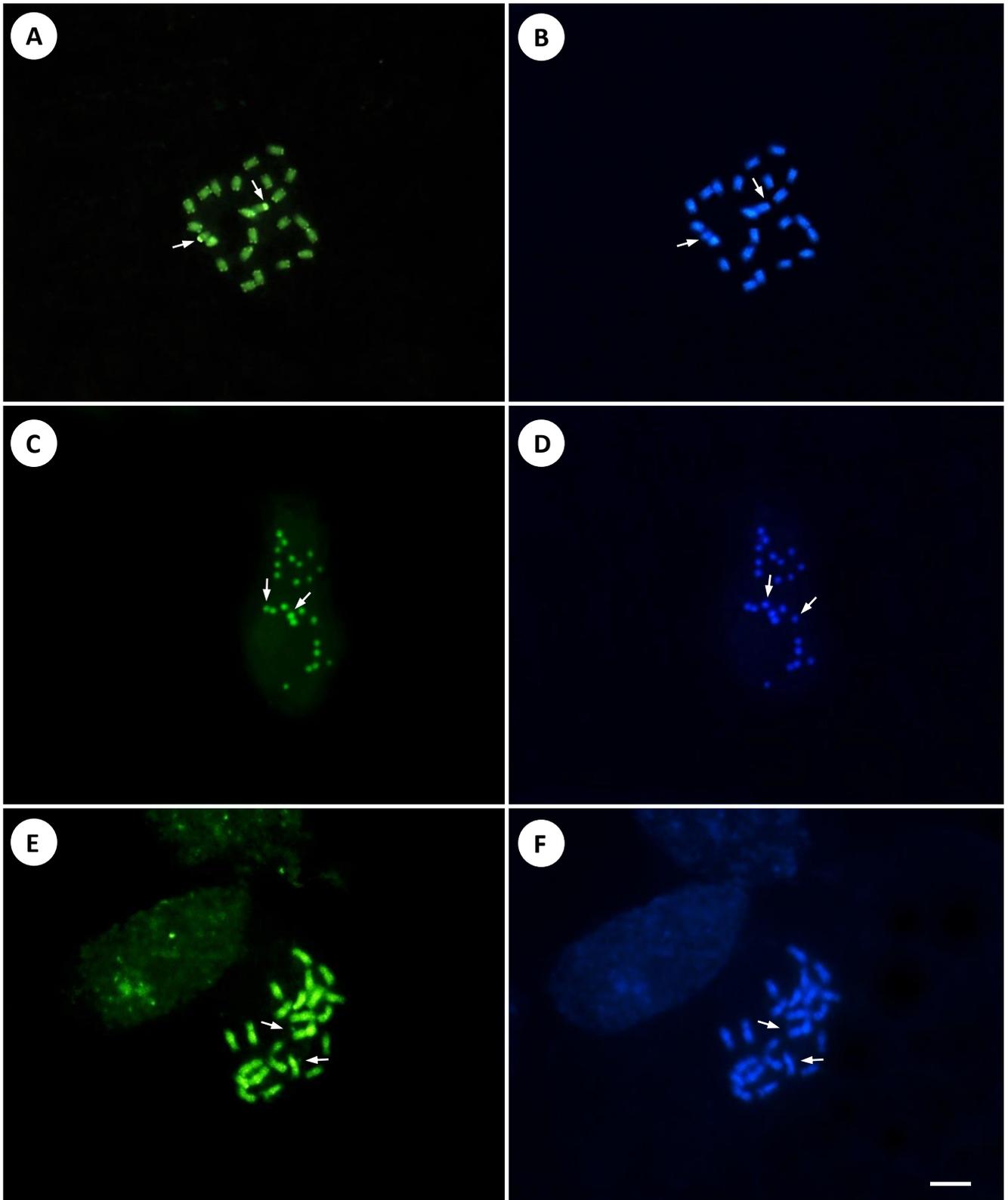


Fig. 19. Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A-B**= *S. pilcomayense* 2287, **C-D**= *S. pilcomayense* 2279, **E-F**= *S. triflorum*. **A, C y E**: CMA; **B, D y F**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI. Barra= 6 μ m.

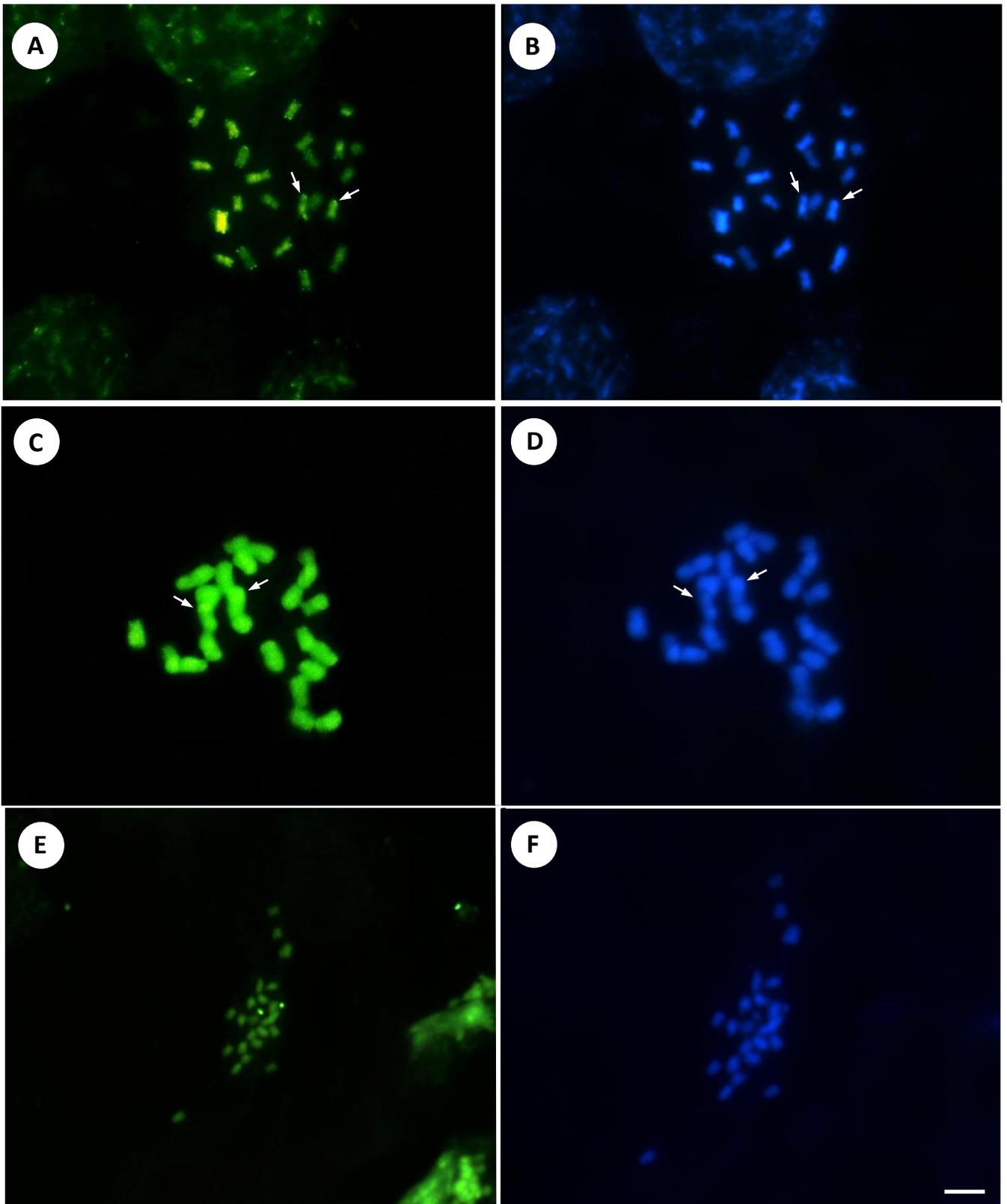


Fig. 20. Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A-B**= *S. angustifidum*, **C-D**= *S. crispum*, **E-F**= *S. dulcamara*. **A**, **C** y **E**: CMA; **B**, **D** y **F**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI. Barra= 6 μ m.

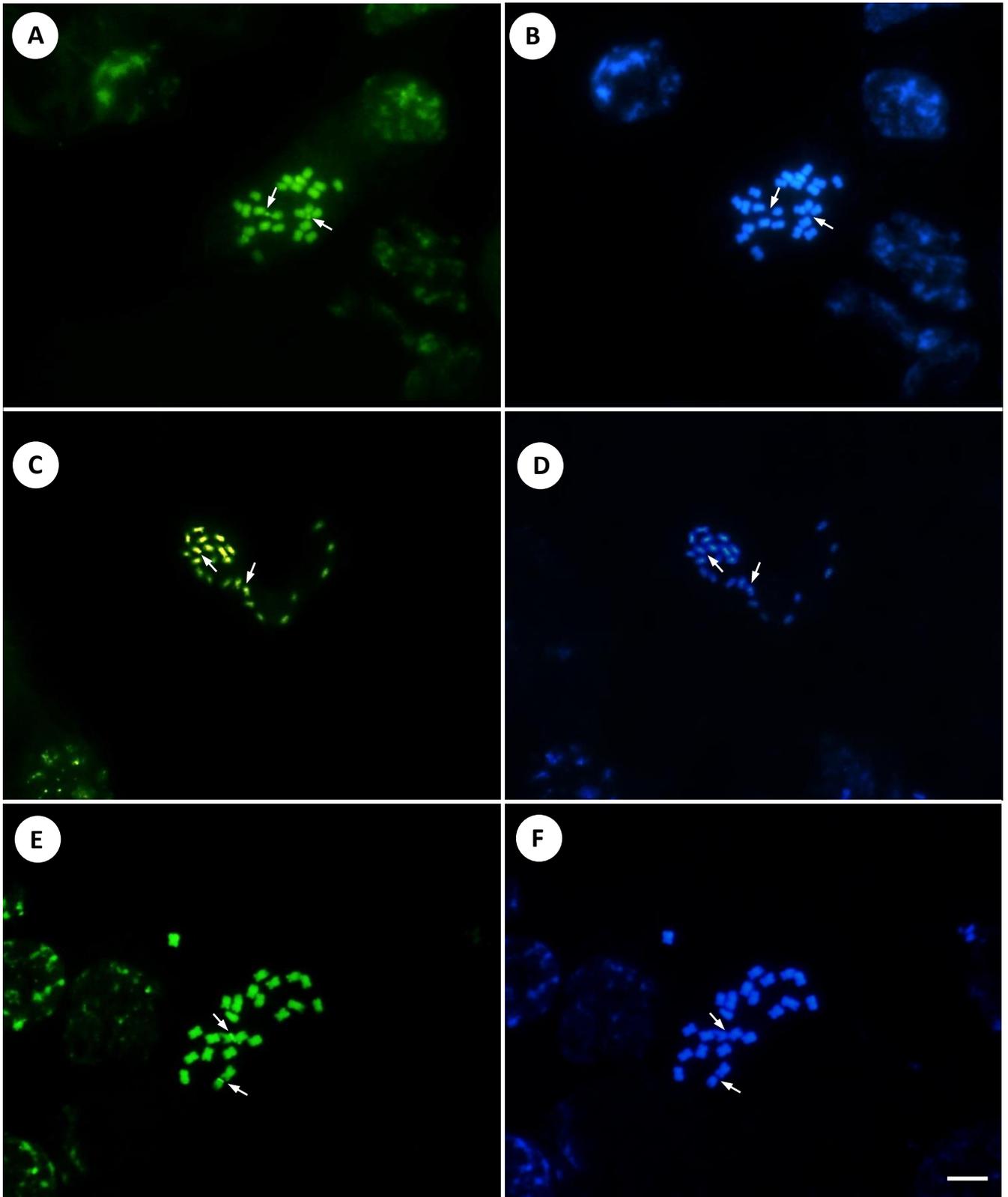


Fig. 21. Metafasas somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A-B**= *S. endoadenium*, **C-D**= *S. salicifolium* 3158, **E-F**= *S. salicifolium* 818. **A, C y E**: CMA; **B, D y F**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI. Barra= 6 μ m.

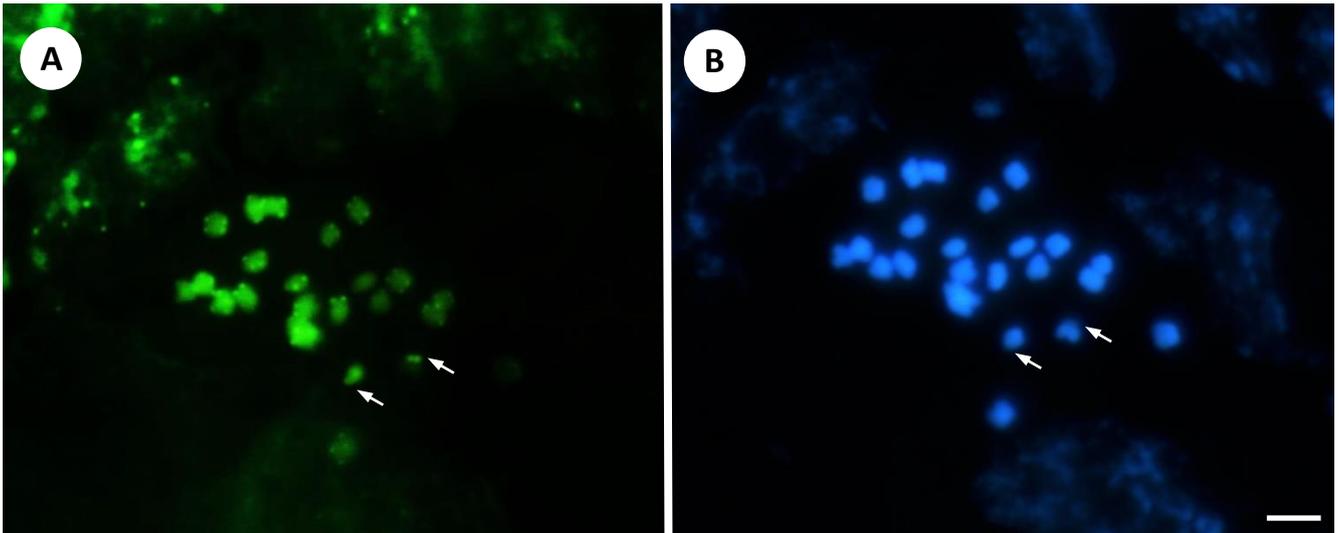


Fig. 22. Metafases somáticas sometidas a doble tinción CMA/DAPI de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A-B**= *S. salicifolium* 794. **A**: CMA; **B**: DAPI. Las flechas señalan bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻. Barra= 6 μ m.

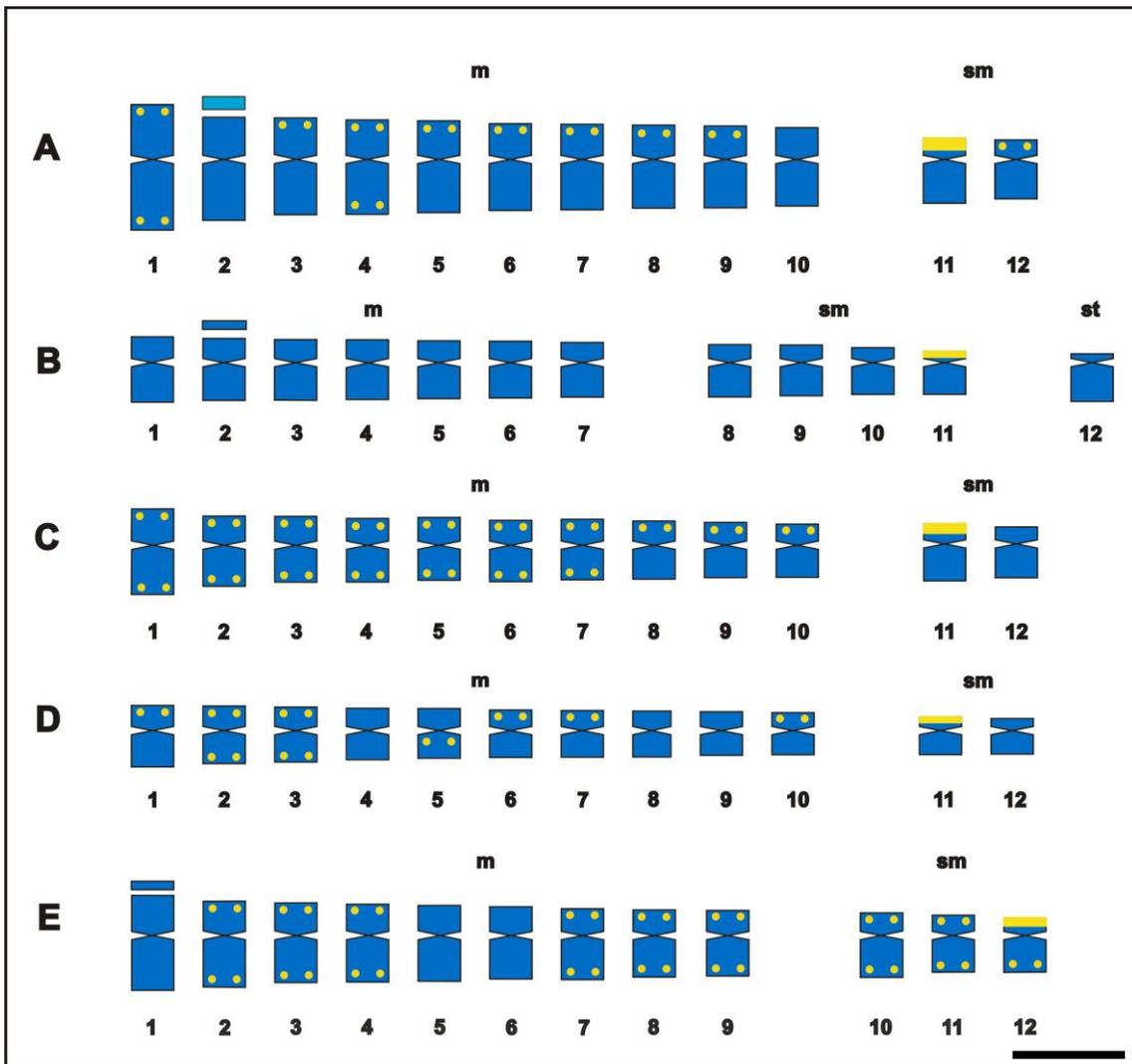


Fig. 23: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Morelloide* con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. **A=** *S. aloysiifolium* 2210, **B=** *S. aloysiifolium* 2152, **C=** *S. americanum*, **D=** *S. chenopodioides*, **E=** *S. hastatilobum*. Barra = 3 μ m.

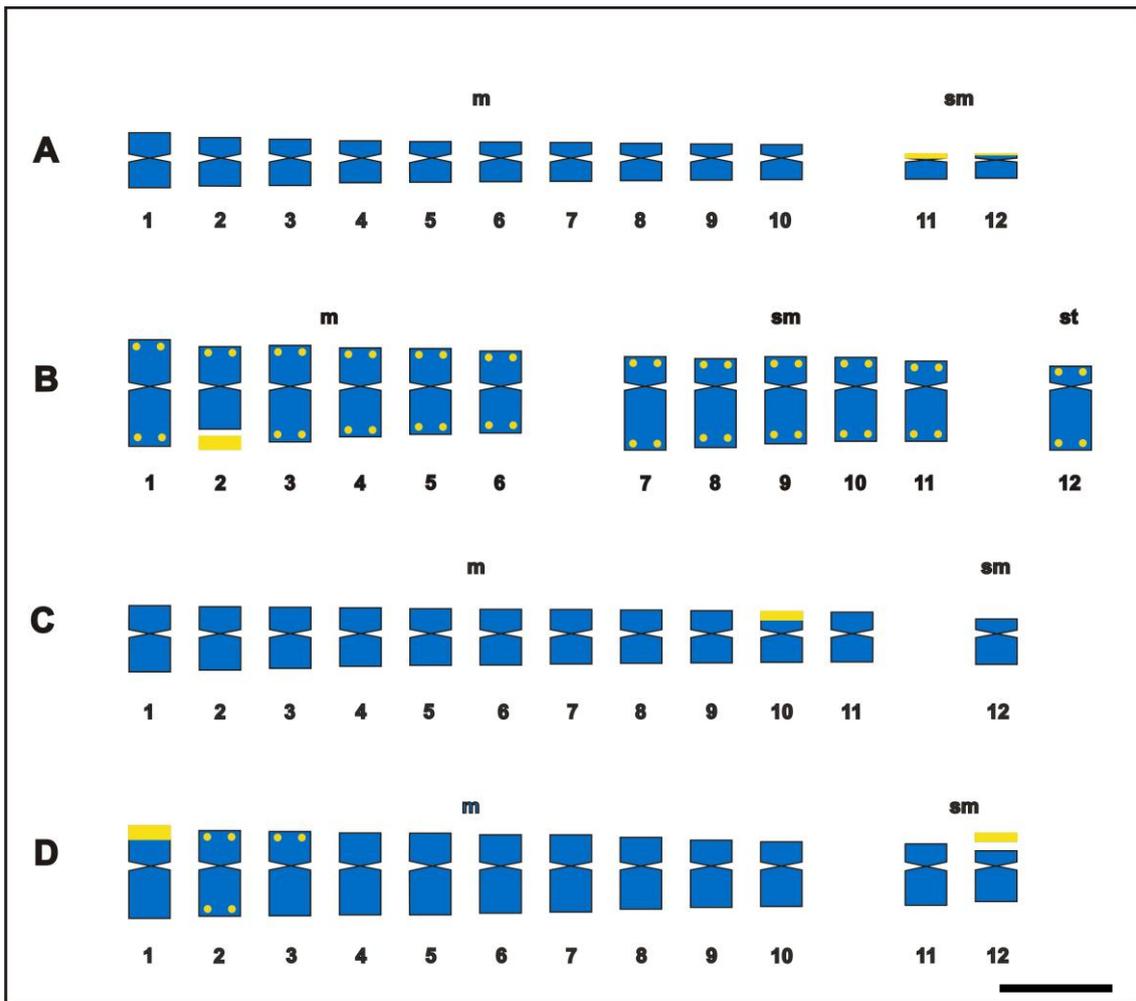


Fig. 24: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Morelloide* con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. **A**= *S. palitans*, **B**= *S. pilcomayense* 2287, **C**= *S. pilcomayense* 2279, **D**= *S. triflorum*. Barra = 3 μ m.

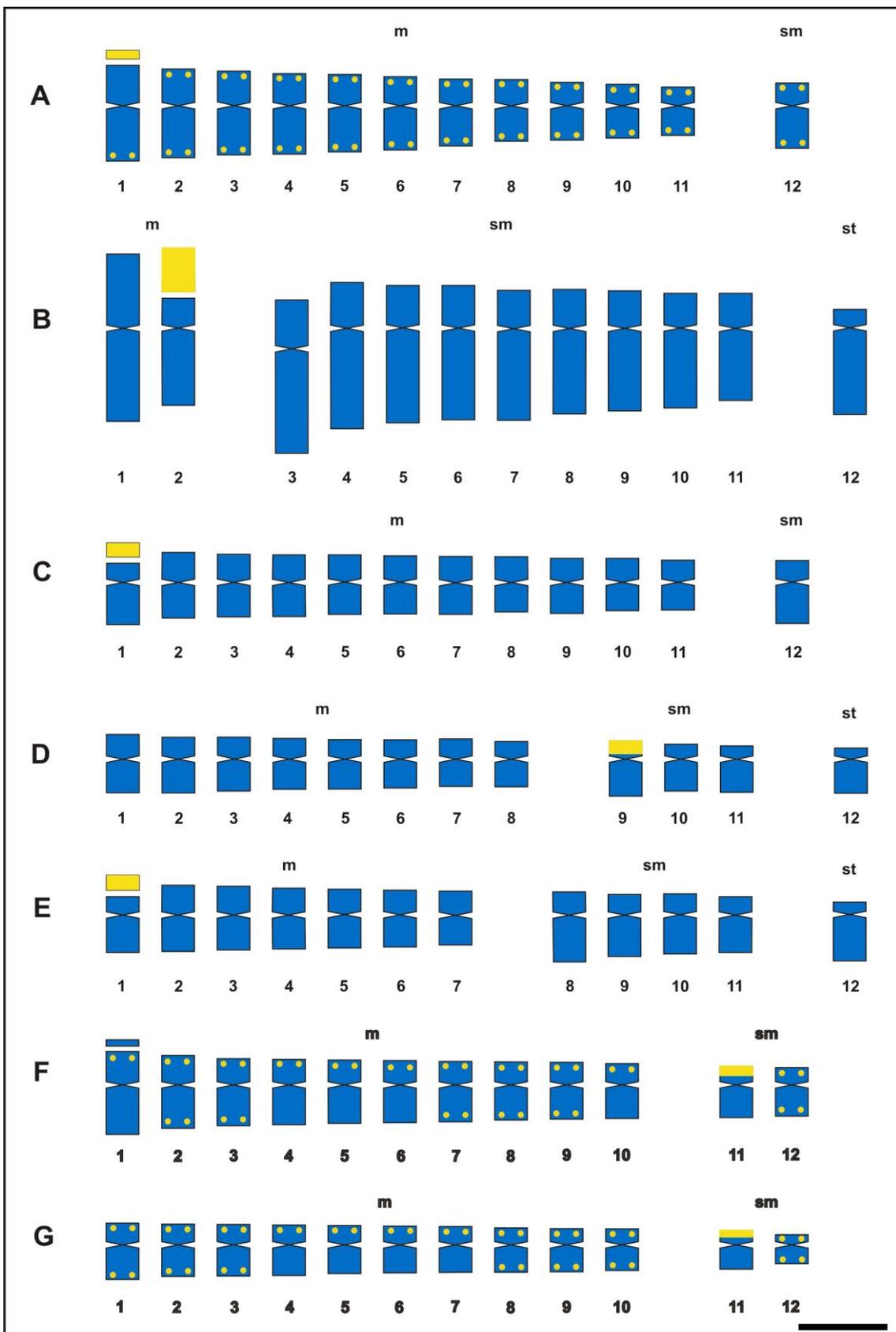


Fig. 25: Idiogramas de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide* con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI. **A=** *S. angustifidum*, **B=** *S. crispum*, **C=** *S. dulcamara*, **D=** *S. endoadenium*, **E=** *S. salicifolium* 3158, **F=** *S. salicifolium* 818, **G=** *S. salicifolium* 794. Barra = 6 μm.

Discusión

En la actualidad, las técnicas de biología molecular permiten detectar la variabilidad a nivel de ADN (Sumner, 2003). Sin embargo, la caracterización cariotípica aún sigue siendo necesaria para dilucidar el rol de los cromosomas en la herencia, la adaptación y la evolución. Efectivamente, los patrones de bandeo resultan de gran utilidad y complementan a los estudios citogenéticos para establecer situaciones de poliploidía o aneuploidía, origen de reordenamientos cromosómicos, dilucidar mecanismos evolutivos y determinar heteromorfismos (Poggio, 1996; Guerra, 2000).

El uso de fluorocromos base – específicos para la tinción de cromosomas permite caracterizar las bandas heterocromáticas de acuerdo a la composición de su ADN satélite (Schweizer, 1979). Aunque existe una gran variabilidad en los patrones de distribución de heterocromatina entre las angiospermas, no son comunes los cambios notorios dentro de un grupo de especies relacionadas (Hoshi & Kondo, 1998; Guerra, 2000). De hecho, mediante la cuantificación de las regiones heterocromáticas por los fluorocromos CMA/DAPI, se demostró la riqueza de pares de nucleótidos GC. Éste es un tipo común de HC asociada a NORs y a satélites, como es muy característico en plantas (Sinclair & Brown, 1971).

Los datos disponibles para la mayoría de familias y géneros de angiospermas para los números y disposición de bandas heterocromáticas fueron variables, pero el patrón general fue relativamente conservado (e.g., *Vigna*, Fabaceae: Galasso *et al.*, 1996; *Citrus*, Rutaceae: Miranda *et al.*, 1997, Guerra *et al.*, 2000; *Clivia*, Amaryllidaceae: Ran *et al.*, 1999). Lo mismo ocurrió en varios géneros de Solanáceas tales como: *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2006), *Lycium* (Stiefkens *et al.*, 2010) y *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1999).

En la mayoría de las especies de *Solanum* estudiadas hasta la fecha se destacan las bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ terminales (e.g., Acosta *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2003, 2012), en concordancia con los taxones aquí examinados de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*. Un ejemplo de ello es *S. chenopodioides*, también estudiada por Acosta *et al.* (2012), donde predominan este tipo de bandas. Estos autores también señalaron bandas CMA⁺/DAPI⁻ intercalares en *S. endoadenium*, lo que difiere con nuestros resultados ya que únicamente fueron observados bloques heterocromáticos en la región terminal de los cromosomas. Por su parte, Melo *et al.* (2011) visualizaron

bloques CMA⁺ asociados a satélites y varios otros bloques menores teloméricos en *S. nitidibaccatum*, lo que indicaría la existencia de dos tipos de heterocromatina rica en GC, una asociada al satélite y la otra restringida al telómero. Esto también fue posible observar en *S. aloysiifolium* 2210, *S. americanum*, *S. hastatilobum*, *S. pilcomayense* 2287, *S. crispum*, *S. angustifidum*, *S. salicifolium* 818 y *S. salicifolium* 794 en la presente tesis. Según los autores mencionados con anterioridad, esta característica podría ser utilizada entonces como un marcador especie – específico, diferenciando a *S. nitidibaccatum* de otras especies diploides que no presentan este tipo de bandas, lo que podría ser extrapolado para las especies analizadas de *Morelloide* y *Dulcamaroide* (cf. Melo *et al.*, 2011). Algunas especies de *Solanum* demuestran diferencias cariotípicas entre las poblaciones estudiadas. *Solanum aloysiifolium* 2210 (proveniente de Salta) y *S. aloysiifolium* 2152 (procedente de Tucumán) se diferencian claramente en el patrón de bandas, situación similar se presentó en las poblaciones analizadas de *S. pilcomayense* 2287 (proveniente de Entre Ríos) y *S. pilcomayense* 2279 (procedente de Corrientes). Sumado a que en ambos casos existen diferencias en cuanto a las fórmulas cariotípicas, tamaño cromosómico y presencia/ausencia de satélites (ver capítulo anterior), estas características podrían indicar la existencia de alta variación cariotípica o de especies distintas.

En el clado *Dulcamaroide*, Knapp (2013) sinonimiza (principalmente por el hábito de las plantas) bajo el nombre de *S. salicifolium* las especies *S. ratum* y *S. restrictum* (antes incluidas en *Morelloide*). *Solanum salicifolium* 818 (= *S. ratum*) y *S. salicifolium* 794 (= *S. restrictum*) exhibieron bloques de HC no asociados a NORs. Nuestro análisis confirma la sinonimia de *S. ratum* con *S. restrictum*, pero no con *S. salicifolium*. El patrón de bandas CMA⁺/DAPI⁰ relaciona a las dos primeras especies con el clado *Morelloide*.

También se observó heterocromatina en la región centromérica de los cromosomas en varios géneros de Solanáceas (e.g., *Cestrum*: Berg & Greilhuber, 1992, 1993a,b; *Hyoscyamus*: Tiagi & Gill, 1990; *Nicotiana*: Merrit, 1974; Mouras, 1982; Mouras *et al.*, 1986; *Solanum*: Pijnacker & Fewerda, 1984; Wagenvoort *et al.*, 1994), excepto en *Cyphomandra* (Pringle & Murray, 1993), *Petunia* (Wijsman *et al.*, 1983) y las especies aquí estudiadas de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*. Cabe señalar como un hecho frecuente la reacción diferencial de la heterocromatina centromérica al tratamiento con distintas técnicas de bandeado. La falta de discriminación de regiones particulares C-centroméricas fueron registradas en otras plantas (e.g., Solanaceae: *Capsicum*, Moscone

et al., 1993, 1996; *Cestrum*, Berg & Greilhuber, 1993a; Fregonezi *et al.*, 2004; Fabaceae: *Vicia*, Schweizer, 1976), hecho que podría estar relacionado con regiones compuestas de secuencias repetidas no particularmente ricas en AT o GC (Moscone *et al.*, 1996).

Las diferencias cariotípicas encontradas no otorgan soporte a la clasificación actual *Morelloide* y *Dulcamaroide*. Resulta prematuro establecer un patrón general que permita delimitar grupos de especies. Sin embargo, la variación del patrón de bandas de heterocromatina en *Solanum* resulta una herramienta importante en el reconocimiento de afinidades taxonómicas. Es por ello que se propone analizar mayor cantidad de especies y de poblaciones para las distintas especies con diferentes técnicas de bandeo cromosómico para llegar a conclusiones más certeras en cuanto a su valor en la taxonomía de estos grupos.

Conclusiones

- Se estudiaron con bandeo de fluorescencia CMA/DAPI los cromosomas mitóticos de 16 especies de *Solanum*, 9 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 7 al *Dulcamaroide*.
- El análisis del patrón de bandas permitió describir dos tipos de heterocromatina:
(1) bandas asociadas a NORs (CMA⁺/DAPI⁻)
(2) bandas no asociadas a NORs (CMA⁺/DAPI⁰)
- En el clado *Morelloide*, se encontraron bandas CMA⁺/DAPI⁻ y bandas CMA⁺/DAPI⁰ en las regiones terminales de la gran mayoría de sus cromosomas. En *S. pilcomayense* 2287 se destacaron bandas CMA⁺/DAPI⁻ en el brazo largo del segundo par cromosómico *m* que se corresponden con el organizador nucleolar.
- Se detectaron heteromorfismos en cuanto al tamaño y número de bandas entre individuos de la misma especie (*S. aloysiifolium* 2210 y *S. aloysiifolium* 2152; *S. pilcomayense* 2287 y *S. pilcomayense* 2279).
- A diferencia del clado *Morelloide*, donde la mayoría de las especies exhibieron pequeños bloques de heterocromatina constitutiva no asociados a NORs (CMA⁺/DAPI⁰), las únicas especies que presentaron esta característica en *Dulcamaroide* fueron *S. angustifidum*, *S. salicifolium* 818 y *S. salicifolium* 794.
- El patrón de bandas no apoya la sinonimia de algunas especies pero la confirma en el caso de *S. ratum* y *S. restrictum*.

Capítulo 4: HIBRIDACION *IN SITU* FLUORESCENTE

Introducción

En el estudio de los cromosomas se ha producido un notable avance durante las últimas décadas gracias a la aparición de nuevas técnicas de citogenética molecular, en particular la hibridación *in situ* (Cuadrado & Jouve, 1994). Esta tecnología fue desarrollada independientemente por dos grupos de trabajo (John *et al.*, 1969; Pardue & Gall, 1969) y marcó la transición de la época de la citogenética clásica a la época de la citogenética molecular moderna. Dicha técnica implica la localización citológica de ADN sobre los cromosomas y resulta muy útil para conocer la posición física de ADN con elevado número de copias (ADN repetitivo) (Cuadrado & Jouve, 1994). Se basa en el reconocimiento y la hibridación entre una secuencia de ADN marcada (sonda) y un segmento complementario de ADN cromosómico (secuencia blanco), lo que permite la detección de regiones específicas sobre los cromosomas (Barros e Silva & Guerra, 2010).

Las principales secuencias de ADN repetitivo utilizadas en la citogenética molecular son las que codifican los genes ribosómicos, los segmentos de telómero y microsatélites, además de algunos otros grupos de ADN satélite (Snowdon *et al.*, 2001; Sumner, 2003). Entre estas secuencias se destacan la de los genes ribosomales 18S-5,8S-26S (también llamado ADNr 45S), así como los que codifican el ARNr 5S (ADNr 5S). Ambos se presentan en repeticiones en tándem en uno o más sitios cromosómicos; sin embargo ocurren separados físicamente en los cromosomas de los eucariotas (Lapitan, 1992; Sone *et al.*, 1999). Estos genes ribosomales de ADNr 45S y 5S representan una de las secuencias empleadas con mayor frecuencia en plantas para la generación de marcadores por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Kato *et al.*, 2005; Seijo *et al.*, 2010). Esto se debe a que dichas secuencias son altamente conservadas permitiendo que sondas originalmente aisladas de diferentes especies, como por ejemplo trigo (Gerlack & Bedbrook, 1979; Gerlack & Dyer, 1980), puedan ser utilizadas en la localización de esos segmentos en distintos vegetales (Leitch & Heslop-Harrison, 1992; Adams *et al.*, 2000; Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000; Schwarzacher, 2003).

El uso de la técnica de FISH ha permitido establecer nuevos tipos de marcadores cromosómicos para el análisis comparado de los cariotipos, localizar diversas secuencias repetitivas a lo largo del cromosoma y construir mapas físicos para distintas especies de plantas (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993). Este mapeo citológico de

genes ribosómicos 45S y 5S aporta entonces valiosos datos sobre la estructura cromosómica y permite determinar homeologías entre especies relacionadas (Moscone *et al.*, 1995, 1999; Adams *et al.*, 2000; Taketa *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Hasterok *et al.*, 2006).

Los métodos de FISH han sido utilizados en varios géneros de angiospermas tales como *Brassica* (Brassicaceae, Ziolkowski & Sadowski, 2002), *Lilium* (Liliaceae, Lim, 2001), *Urvillea* (Sapindaceae, Urdampilleta *et al.*, 2006) y *Cephalanthera* (Orchidaceae, Moscone *et al.*, 2007), entre otros. En lo que respecta a las Solanáceas, también han sido localizados genes ribosómicos mediante FISH en especies de los géneros *Capsicum* (Moscone *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1999, 2000), *Nicotiana* (Kitamura *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001), *Petunia* (Entani *et al.*, 1999), *Nierembergia* (Acosta, 2006), *Lycopersicon* (en la actualidad género *Solanum*, Xiang-Hui *et al.*, 2011), *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2006) y *Solanum* (Rego *et al.*, 2009). Para los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*, en particular, sólo han sido analizadas unas pocas especies, tales como: *S. dulcamara*, *S. nitidibaccatum*, *S. amygdalifolium* y *S. americanum* (Rego *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011).

Debido a las ventajas que proporciona la técnica de FISH para analizar la distribución del conjunto de secuencias repetidas de ADN, es que se decidió encarar el presente estudio. Esta tecnología, combinada con los patrones de bandeo fluorescente CMA/DAPI y otras características observadas mediante técnicas citogenéticas clásicas, constituyeron herramientas útiles para los análisis comparativos de los cariotipos en especies relacionadas de *Solanum* de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* en esta tesis.

Materiales y Métodos

FISH para los genes de ADNr 18-5,8-26S y 5S

La localización y números de sitios de ADNr fueron determinados mediante la técnica de FISH según el protocolo de Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000), con pequeñas modificaciones. Para detectar las regiones de ADNr 18-5,8-26S fue utilizada como sonda el fragmento *pTa71* (Gerlach & Bedbrook, 1979) marcada con biotina-14-dATP (BioNick, Invitrogen). Para mapear loci de ADNr 5S fueron utilizados productos de PCR marcados con digoxigenina-11-dUTP (DIG Nick Translation, Roche, Alemania), utilizando como primer 5SrDNA-3 y 5SrDNA-4 (Kitamura *et al.*, 2001) y ADN de *S. stuckertii* como molde.

Preparación de la mezcla de hibridación

- En el momento de efectuar las hibridaciones, se preparó la mezcla de hibridación que incluyó los siguientes componentes: formamida deionizada, 50% de sulfato de dextrano, tampón 2xSSC, 0,3% de SDS y 4–6 ng/μl de sonda de ADN marcada.
- Desnaturalización a 70°C por 10 min.
- Enfriamiento en hielo hasta su uso.

Tratamiento de los preparados para la hibridación

- Incubación en 100 μg/ml ARNasa/2x SSC en cámara húmeda a 37°C por 60 min.
- Remoción del cubreobjeto y lavado con 2xSSC a temperatura ambiente (este paso se repitió 2 veces).
- Fijación en solución de paraformaldehído y lavado con 2xSSC a temperatura ambiente.
- Deshidratación alcohólica de etanol 70% y 100% por 5 minutos y secado al aire.

Hibridación *in situ*

- Agregado de la mezcla de hibridación a cada preparado a los que se habían realizado los tratamientos pre-hibridación y colocación del cubreobjeto.
- Incubación de los preparados en termociclador con el siguiente programa: 90°C por 10 min, 48°C por 10 min y 38°C por 5 min.
- Incubación en cámara húmeda a 37°C por 24 horas.

Lavados post hibridación

- Inmersión de los preparados en 2 x SSC a 42°C por 15 minutos para la remoción de los cubreobjetos.
- Lavados sucesivos en las siguientes soluciones: 0,1 x SSC 5 min, 2 x SSC 5 min, 4 x SSC 5 min. Todas las soluciones a 42°C.
- Lavado en 4 x SSC a temperatura ambiente por 5 min.

Bloqueo, detección y coloración

- Agregado de solución de bloqueo 5% de BSA (albúmina de suero bovino) a los preparados, colocación del cubreobjeto e incubación en cámara húmeda durante 5 min.
- Detección con solución de Avidina-FITC (Sigma-Aldrich) y Antidigoxigenina-Rodamina (Roche) en 5% de BSA para la detección de la sonda, incubación en cámara húmeda en oscuridad a 37°C por 60 min.
- Lavado con 4 x SSC 5 min.
- Montaje del preparado con 25 µl de Vectashield (Vector Lab.) conteniendo 1,5 µg/ml de DAPI.
- Los preparados se dejaron en oscuridad durante 3 a 5 días previos a la observación con microscopio de fluorescencia.

Los correspondientes idiogramas se realizaron tomando como base los realizados para los análisis de tinción convencional para las mismas especies.

Los cromosomas fueron observados y fotografiados con un microscopio óptico Zeiss Axiophot provisto de una cámara y de un analizador de imágenes.

Resultados

Se analizaron 16 especies de *Solanum*, 9 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 7 al clado *Dulcamaroide*. En la Tabla 5 se indica el número y posición de los loci de ADNr 45S y 5S que presenta cada taxón estudiado.

En todas las entidades analizadas fue posible localizar ambos agrupamientos ribosómicos y el patrón de distribución de las dos familias génicas de ADNr difirió entre las especies. Por otra parte, la localización de los sitios 45S se correlacionó con el correspondiente patrón de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ luego del bandeo fluorescente que fuera detallada en el capítulo anterior.

En *Morelloide*, los loci de ADNr 45S tuvieron posiciones terminales y variaron entre 2 y 4 sitios según las especies examinadas. En *S. chenopodioides* (Fig. 26 D y 30 D) los dos sitios se ubicaron en el primer par cromosómico *m* mientras que en *S. aloysiifolium* 2210 (Fig. 26 A y 30 A), *S. americanum* (Fig. 26 C y 30 C) y *S. palitans* (Fig. 26 F y 31 B) se ubicaron en el primer par cromosómico *sm*. *Solanum pilcomayense* 2279 mostró estos loci de ADNr 45S en el par *m* número 10 (Fig. 27 A y 31 C) y *S. triflorum* asociado al satélite del segundo par *sm* (Fig. 27 C y 31 E). Los 3 taxones de este clado que presentaron 4 sitios de ADNr fueron *S. aloysiifolium* 2152 (en el primer par *m* y asociado al satélite del segundo par cromosómico *m*) (Fig. 26 B y 30 B), *S. pilcomayense* 2287 (en el primer par *m* y en el satélite del brazo largo del segundo par *m*) (Fig. 27 A y 31 C) y *S. hastatilobum* (en el último par *m* y en el segundo par *sm*) (Fig. 26 E y 31 A). Además, se distinguieron heteromorfismos en cuanto a la presencia de uno de los sitios 45S sólo en uno de los cromosomas homólogos en *S. hastatilobum* (Fig. 26 E y 31 A).

Por otra parte, sólo hay 2 sitios de ADNr 5S en todas las entidades de *Morelloide* estudiadas. Éstos variaron en cuanto a su posición, a diferencia de los loci 45S que estuvieron todos en posiciones terminales. En *S. aloysiifolium* 2210 (Fig. 26 A y 30 A), *S. chenopodioides* (Fig. 26 D y 30 D) y *S. americanum* (Fig. 26 C y 30 C) estuvieron en el par cromosómico *m* número 10, en posiciones terminales y centromérica, respectivamente. En *S. pilcomayense* 2287 (Fig. 27 A y 31 C), *S. hastatilobum* (Fig. 26 E y 31 A) y *S. pilcomayense* 2279 (Fig. 27 A y 31 C), los loci de ADNr 5S se encontraron en posiciones terminales para los 2 primeros (pares cromosómicos 6 *m* y 9 *m*) y centromérica para el tercero (par 6 *m*), respectivamente. Las únicas entidades que presentaron locus de ADNr en cromosomas *sm* fueron *S. triflorum* (primer par) (Fig. 27

C y 31 E), *S. palitans* (segundo par) (Fig. 26 F y 31 B) y *S. aloysiifolium* 2152 (tercer par) (Fig. 26 B y 30 B), en posiciones terminales e intercalar.

En *Dulcamaroide*, los loci de ADNr 45S exhibieron todos posiciones terminales y excepto *S. salicifolium* 3158 que tiene 4 sitios (situados en el primer par *m* asociado al satélite y en el segundo par *m*) (Fig. 29 B y 32 F), el resto de los taxones mostraron 2 sitios 45S. En *S. angustifidum* (Fig. 28 B y 32 B), *S. dulcamara* (Fig. 28 D y 32 D) y *S. endoadenium* (Fig. 29 A y 32 E), estos sitios se hallaron en el primer par de cromosomas *m* (asociados a satélites para los dos primeros). Por último, *S. salicifolium* 794 (Fig. 29 C y 32 G) y *S. amygdalifolium* (Fig. 28 A y 32 A) fueron las únicas entidades en que los sitios 45S se encontraron en el primer par de cromosomas *sm*. *Solanum crispum* presenta un patrón diferencial de distribución de ADNr 45S no observado en el resto de las especies de *Dulcamaroide*. Este patrón consiste de un par de señales intensas en la región terminal del segundo par *m* y n conjunto de señales de menor intensidad en las regiones terminales de la mayoría del complemento cromosómico (Fig. 28 C y 32 C).

Los sitios de ADNr 5S variaron tanto en número como en posición para las distintas especies analizadas. En *S. amygdalifolium* (Fig. 28 A y 32 A), *S. endoadenium* (Fig. 29 A y 32 E), *S. salicifolium* 3158 (Fig. 29 B y 32 F) y *S. salicifolium* 794 (Fig. 29 C y 32 G) pudieron distinguirse 2 sitios en posiciones terminales para las 3 primeras especies e intercalar para la última entidad mencionada en pares cromosómicos *m* y *sm*. *Solanum angustifidum* (Fig. 28 B y 32 B) y *S. crispum* (Fig. 28 C y 32 C) fueron las únicas especies que exhibieron 4 sitios 5S en posiciones terminales, centroméricas e intercalares en cromosomas *m* y *sm*. Además, *S. crispum* presentó uno de los sitios 5S en sintenia con las señales intensas de 45S. En cuanto a los heteromorfismos, en *S. angustifidum* (Fig. 28 B y 32 B), fue posible visualizar la diferencia de tamaños de los sitios, tanto para el 45S como para el 5S.

Resulta importante destacar que el tamaño de los sitios 45S y 5S, para ambos clados, no siempre fue proporcional al tamaño de las bandas heterocromáticas asociadas a NORs correspondientes, observadas con la técnica de bandeo CMA/DAPI aplicada. De la misma manera, tanto para *Morelloide* como para *Dulcamaroide*, fue poco frecuente la visualización de los sitios 45S y 5S para sólo uno de los cromosomas homólogos del par correspondiente. Por lo general, aparecieron en ambos homólogos, con tamaños similares, siendo de esta manera, homomórficos en la mayoría de los taxones.

Tabla 5. Datos cromosómicos de los taxones de *Solanum* estudiados de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* examinados con la técnica de FISH utilizando las sondas para los genes ribosómicos 18-5,8-26S y 5S. (***) Dispersión en los cromosomas A de ADNr, c: centroméricas; i: intercalares; t: terminales

Especies	ADNr				Sintenia
	18-5,8-26S		5S		
	n°	Pos.	n°	Pos.	
Clado Morelloide					
<i>S. aloysiifolium</i> 2210	2	t	2	t	-
<i>S. aloysiifolium</i> 2152	4	t	2	t	-
<i>S. americanum</i>	2	t	2	c	-
<i>S. chenopodioides</i>	2	t	2	t	-
<i>S. hastatilobum</i>	4	t	2	t	-
<i>S. palitans</i>	2	t	2	t	-
<i>S. pilcomayense</i> 2287	4	t	2	c	-
<i>S. pilcomayense</i> 2279	2	t	2	t	-
<i>S. triflorum</i>	2	t	2	i	-
Clado Dulcamaroide					
<i>S. amygdalifolium</i>	2	t	2	t	-
<i>S. angustifidum</i>	2	t	4	t,c	-
<i>S. crispum</i>	2(***)	t	4	i,c	+
<i>S. dulcamara</i>	2	t	2	c	-
<i>S. endoadenium</i>	2	t	2	t	-
<i>S. salicifolium</i> 3158	4	t	2	t	-
<i>S. salicifolium</i> 794	2	t	2	i	-

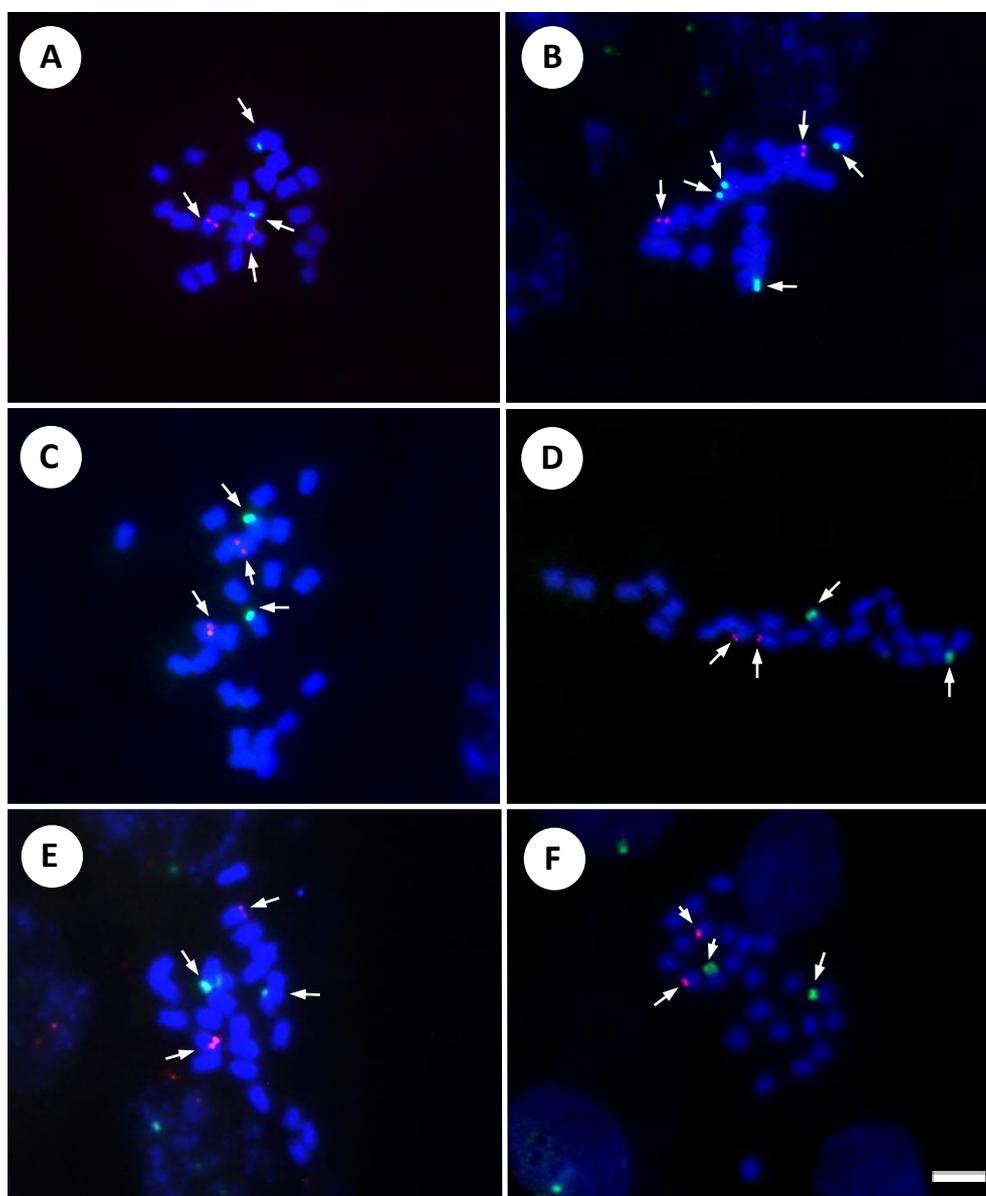


Fig. 26: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A**= *S. aloysiifolium* 2210, **B**= *S. aloysiifolium* 2152, **C**= *S. americanum*, **D**= *S. chenopodioides*, **E**= *S. hastatilobum*, **F**= *S. palitans*. Las flechas indican las señales de hibridación para las sondas 45S (verde) y 5S (rojo). Barra = 6 μ m.

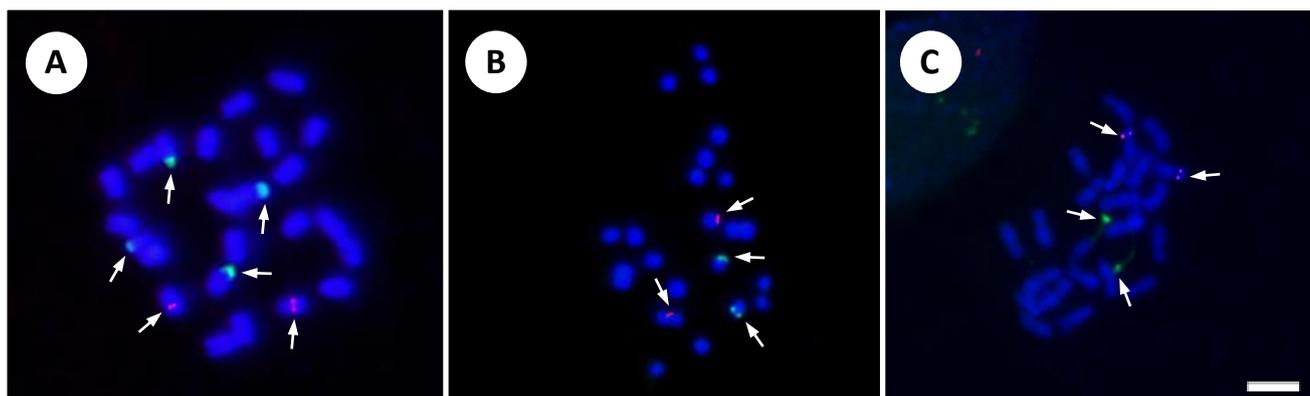


Fig. 27: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A**= *S. pilcomayense* 2287, **B**= *S. pilcomayense* 2279, **C**= *S. triflorum*. Las flechas indican las señales de hibridación para las sondas 45S (verde) y 5S (rojo). Barra = 6 μ m.

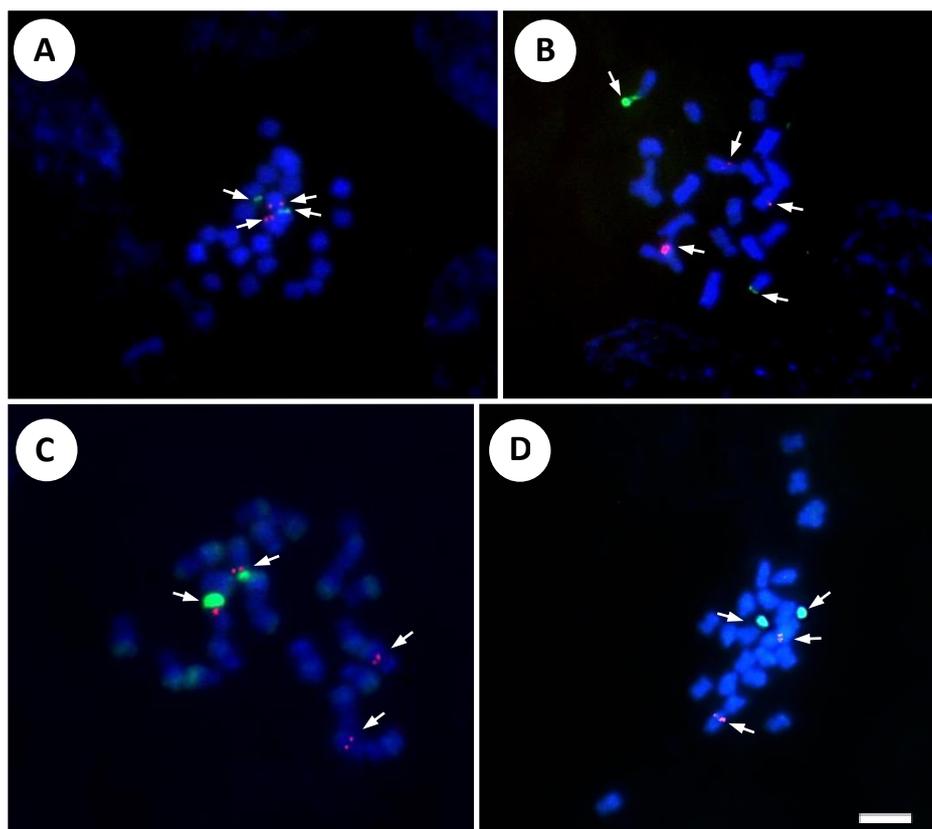


Fig. 28: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A=** *S. amygdalifolium*, **B=** *S. angustifidum*, **C=** *S. crispum*, **D=** *S. dulcamara*. Las flechas indican las señales de hibridación para las sondas 45S (verde) y 5S (rojo). Barra = 6 μ m.

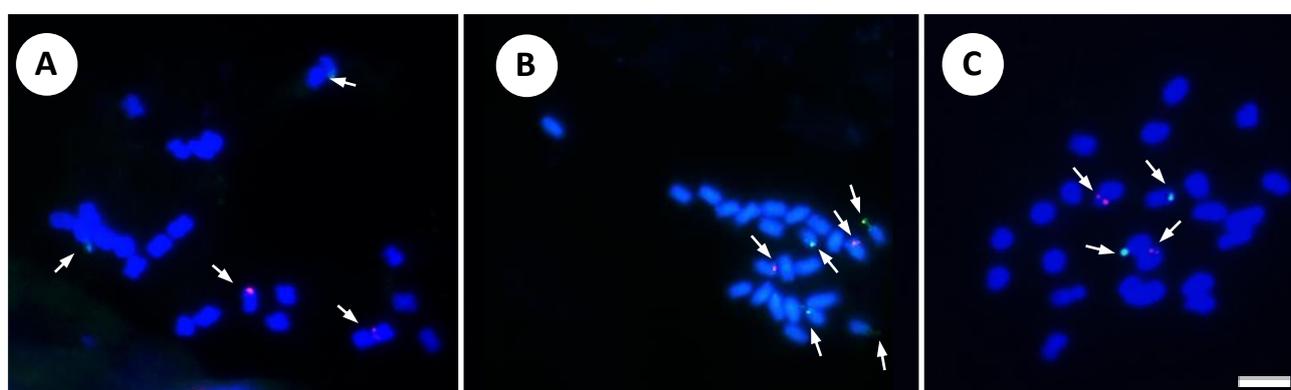


Fig. 29: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A**= *S. endoadenium*, **B**= *S. salicifolium* 3158, **C**= *S. salicifolium* 794. Las flechas indican las señales de hibridación para las sondas 45S (verde) y 5S (rojo). Barra = 6 μ m.

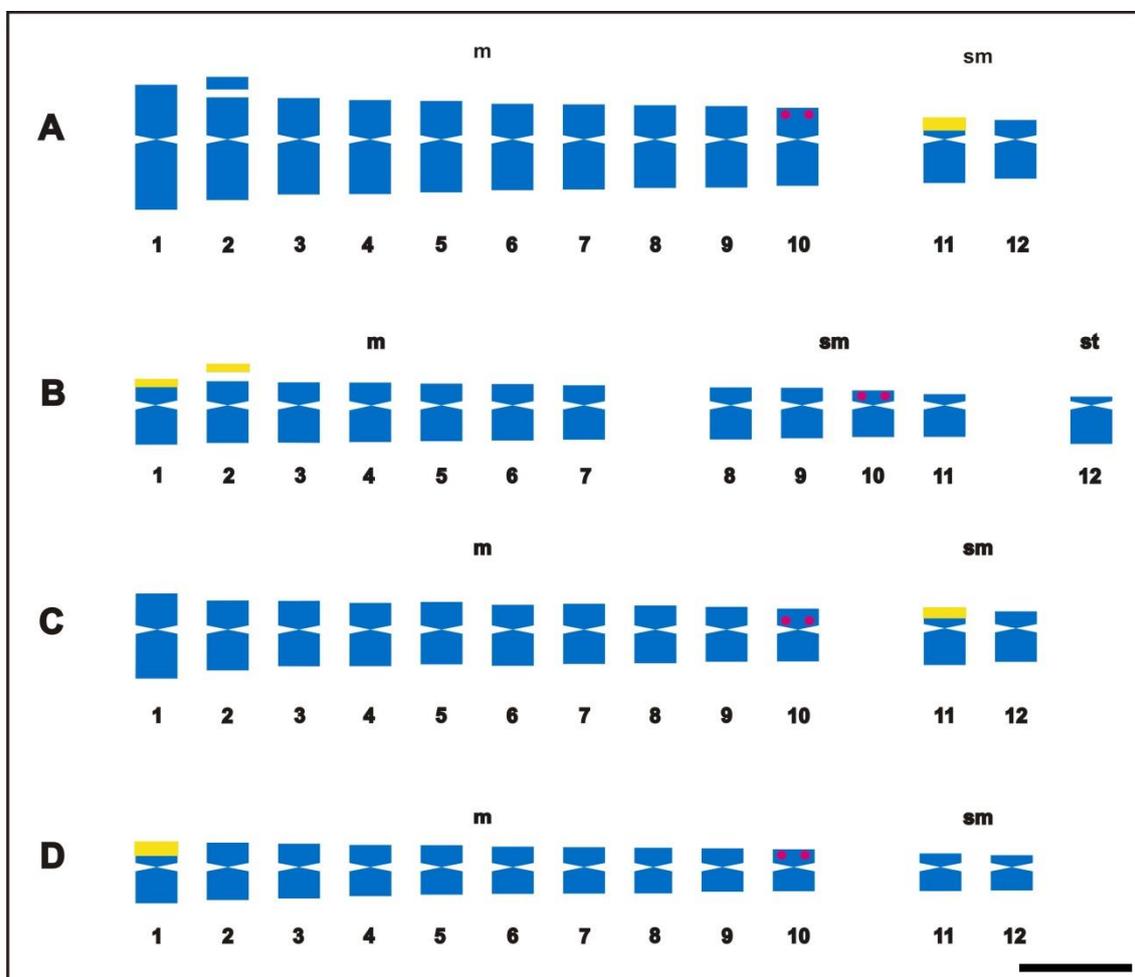


Fig. 30. Metafasas somáticas sometidas a FISH de especies de *Solanum* del clado *Morelloide*. **A**= *S. aloysiifolium* 2210, **B**= *S. aloysiifolium* 2152, **C**= *S. americanum*, **D**= *S. chenopodioides*. Barra= 6 μ m.

■ Indica sitios de ADNr 45S ● Indica sitios de ADNr 5S.

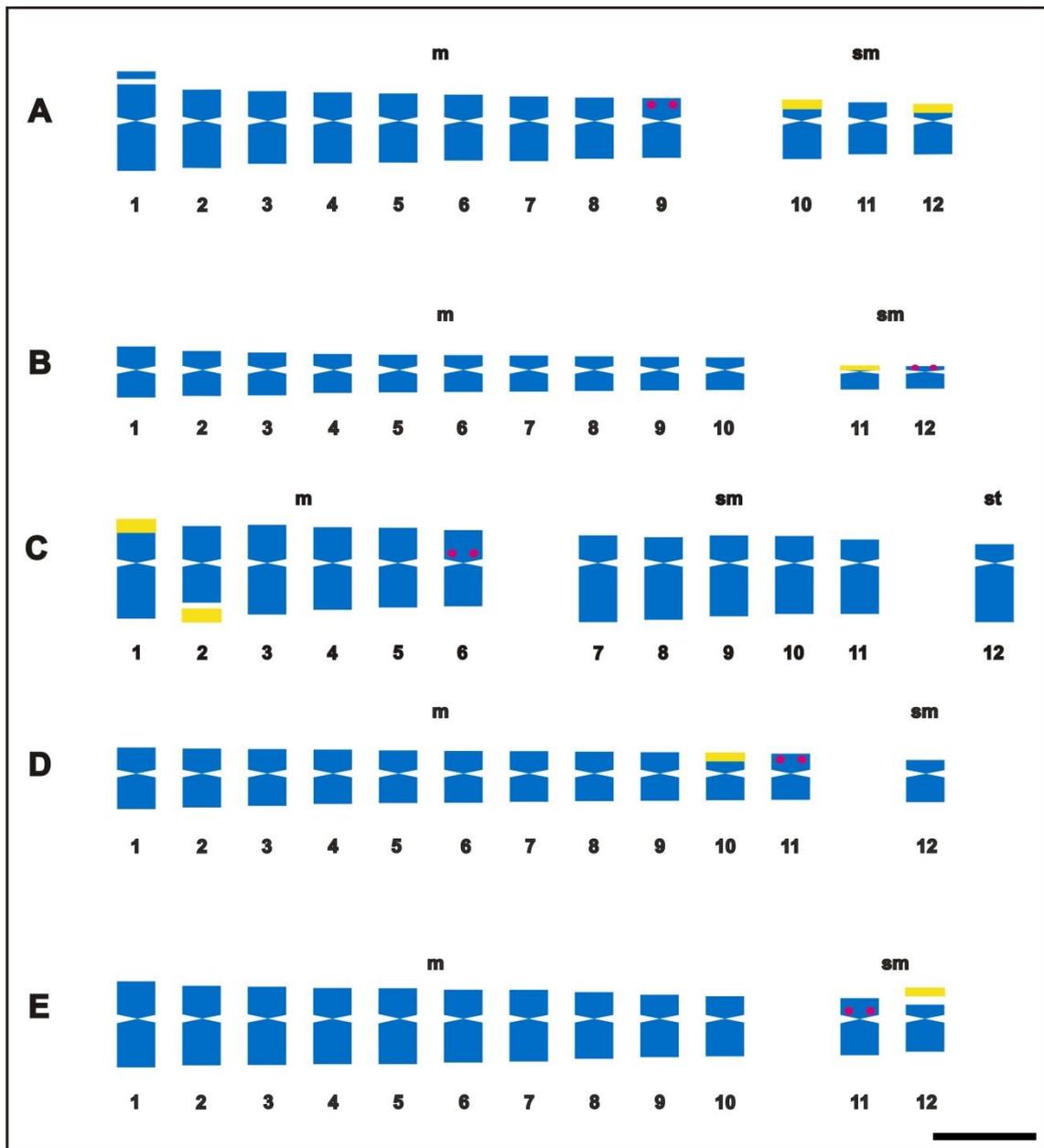


Fig. 31. Metafasas somáticas sometidas a FISH de especies de *Solanum* del clado Morelloide. **A=** *S. hastatilobum*, **B=** *S. palitans*, **C=** *S. pilcomayense* 2287, **D=** *S. pilcomayense* 2279, **E=** *S. triflorum*. Barra= 6 μm.

■ Indica sitios de ADNr 45S ● Indica sitios de ADNr 5S.

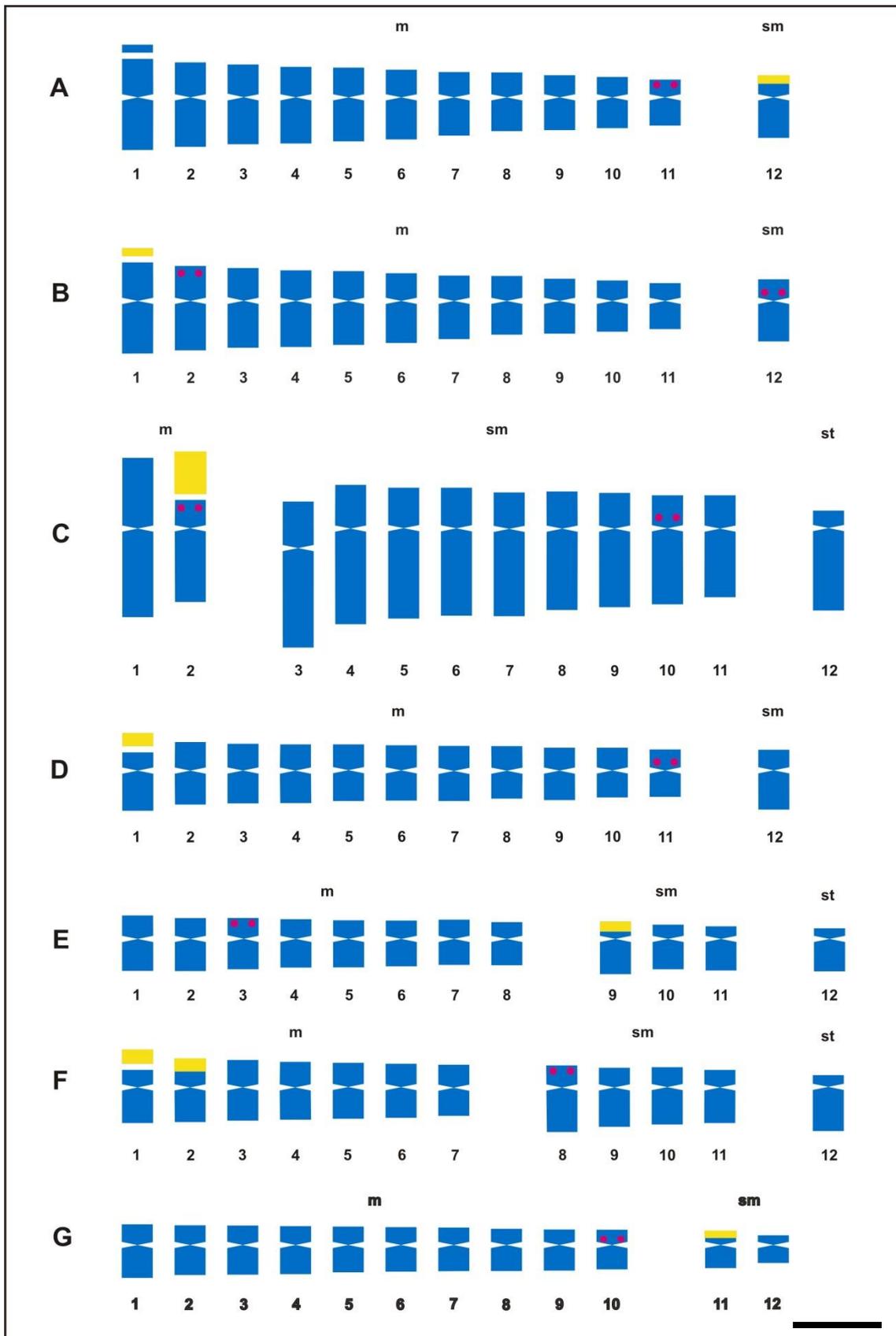


Fig. 32. Metafasas somáticas sometidas a FISH de especies de *Solanum* del clado *Dulcamaroide*. **A**= *S. amygdalifolium*, **B**= *S. angustifidum*, **C**= *S. crispum*, **D**= *S. dulcamara*, **E**= *S. endoadenium*, **F**= *S. salicifolium* 3158, **G**= *S. salicifolium* 794. Barra= 6 μ m.

■ Indica sitios de ADNr 45S ● Indica sitios de ADNr 5S

Discusión

La técnica de FISH, a diferencia de las tinciones convencionales sobre los cromosomas, se basa en reacciones moleculares específicas entre el ADN y otra secuencia cualquiera denominada sonda (Guerra, 2004). Por otra parte, FISH en combinación con la tinción doble con fluorocromos CMA/DAPI, se ha convertido en un poderoso método para generar nuevos patrones de polimorfismos útiles en la identificación y caracterización de cromosomas (e.g., Moscone *et al.*, 1999; Guerra, 2004; Fregonezi *et al.*, 2004, 2006). Una de las aplicaciones de esta técnica es la obtención de un mapa físico, funcional y estructural del genoma a partir de sondas de distinto origen. El análisis de la organización física de secuencias repetidas permite entonces identificar a los cromosomas, analizar la arquitectura del genoma y verificar hipótesis acerca de la relación entre posición y función de determinadas secuencias (Guerra, 2004).

Los genes ribosómicos 45S y 5S se encuentran entre los marcadores citogenéticos más comunes y abundantes. Sin embargo, las familias génicas pueden diferir en la organización espacial y el número de copias en especies relacionadas (Levin, 2002). La hibridación con la sonda de ADNr 45S confirmó los sitios de satélites observados por las técnicas de tinción convencional y de bandeado fluorescente en las especies estudiadas en la presente tesis. Esta localización sigue un patrón de distribución común, ocurriendo siempre en las regiones terminales de los cromosomas y que resulta frecuente en muchas familias de angiospermas (e.g., Zhang & Sang, 1998; Benko-Iseppon & Morawetz, 2000; Vaio *et al.*, 2005; Urdampilleta *et al.*, 2006). La disposición terminal de los sitios de ADNr 45S fue vista en varios géneros como por ejemplo: *Hordeum* (Leitch & Heslop-Harrison, 1992), *Sorghum* (Sang & Liang, 2000), *Helianthus* (Vanzela *et al.*, 2002) y *Maxillaria* (Cabral *et al.*, 2006), entre otros. También ha sido común en varios géneros de Solanáceas como *Capsicum* (Moscone *et al.*, 1999), *Nicotiana* (Lim *et al.*, 2000), *Nierembergia* (Acosta *et al.*, 2005), *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2006) y *Solanum* (Rego *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011, Chiarini *et al.*, 2013). En varias especies del subgénero *Solanum*, tales como: *S. pseudocapsicum*, *S. trachytrichium* (Clado *Geminata*), *S. granuloso-leprosum*, *S. mauritanum* y *S. gemellum* (Clado *Brevantherum*), también fue posible visualizar entre 2 y 4 sitios de ADNr 45S, en posiciones terminales de los cromosomas (Rego *et al.*, 2009). La misma

situación se observó para las especies de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* aquí estudiadas.

La hibridación con la sonda de ADNr 5S de *S. stuckertii* mostró señales en la región centromérica en *S. americanum* y *S. pilcomayense* 2287 (*Morelloide*) y en *S. angustifidum*, *S. dulcamara* y *S. crispum* (*Dulcamaroide*) en el presente trabajo. Esta posición del sitio 5S ha sido mencionada como característica tanto en angiospermas como en gimnospermas por distintos autores (Kulak *et al.*, 2002; Siljak-Jakovlev *et al.*, 2002; Besendorfer *et al.*, 2005). En otros géneros de Solanaceae como *Nicotiana* (Lim *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2001), *Lycopersicon* (en la actualidad género *Solanum*, Lapitan, 1992) y *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2006), los sitios de ADNr 5S también fueron localizados preferencialmente en la región centromérica. Esta información indica que estas secuencias poseen una localización conservada en estos cariotipos y siguen la teoría de campo cromosómico de Lima de Faria (1976) para regiones preferenciales de ocurrencia y funcionamiento de algunos segmentos de ADN. Sin embargo, en el resto de las especies analizadas en esta tesis, también se encontraron sitios 5S en posiciones terminales e intercalares. De esta manera, tanto para las entidades de *Morelloide* como de *Dulcamaroide* estudiadas, la hibridación con la sonda de ADNr de *S. stuckertii* mostró señales en las regiones centroméricas, intercalares y terminales, a diferencia de lo observado para los sitios 45S, en donde se encontraron siempre en posición terminal para ambos clados.

Los sitios del gen 5S fueron encontrados en uno o dos pares cromosómicos, siempre en un cromosoma diferente al portador del 45S, hecho que coincide con los hallazgos en varias angiospermas donde estas dos familias de genes ribosómicos (5S y 45S) están usualmente en cromosomas distintos (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Cerbah *et al.*, 1998). La excepción en este caso resultó ser *S. crispum* donde se hallaron 4 sitios en posiciones intercalares y centroméricas, éste último en sintenia con el 45S. Estos datos sugieren que los segmentos que contienen los sitios génicos para 45S y 5S no presentan un número y localización conservada entre las especies de *Solanum* y otras Solanáceas estudiadas hasta el momento (Rego *et al.*, 2009). Esta característica parece ser común en otros grupos de plantas (e.g., Sapindaceae; Urdampilleta *et al.*, 2006).

Determinadas secuencias de los genes 5S han sido utilizadas para hacer reconstrucciones filogenéticas ya que los loci de ADNr 5S han sido variables en cantidad y posición. Por consiguiente, esta variabilidad ha sido utilizada para obtener datos filogenéticos significativos como en Amaryllidaceae (Ran *et al.*, 2001), Fabaceae

(Crisp, 1999), Malvaceae (Cronn *et al.*, 1996), Myrtaceae (Udovicic *et al.*, 1955) Poaceae (Steele *et al.*, 1991; Kellogg & Appels, 1995; Baum & Johnson, 1996) y Cactaceae (Las Peñas, 2009). Sin embargo, en otras familias se observó que la codificación de la región es relativamente corta con un bajo índice de sustitución de bases y en consecuencia, estos sitios son filogenéticamente poco informativos y constantes en número y posición (Soltis & Soltis, 1998). Tal es el caso de algunos taxones de *Nierembergia* (Acosta, 2006) y géneros como *Aloe* (Adams *et al.*, 2000), *Arachis* (Seijo *et al.*, 2004), *Clivia* (Ran *et al.*, 2001) e *Hypochaeris* (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2003), entre otros.

Con respecto a las características de ambas señales de ADNr, se encontró que para *Morelloide*, los sitios 45S fueron más numerosos que los 5S. En el caso de *Dulcamaroide*, fueron los sitios 5S los que se encontraron en mayor cantidad. Esto último ya había sido indicado por otros autores en otras especies de angiospermas (Hemleben & Werts, 1988; Sastri *et al.*, 1992; Moscone *et al.*, 1999). En cuanto a la intensidad de las señales de FISH de ambos genes, Appels *et al.* (1980) y Weiss-Schneeweiss *et al.* (2003) señalan su similitud en los homólogos por lo que concluyen que no existirían diferencias entre ellos en el número de copias de genes. Sin embargo, en la presente tesis, pudieron observarse heteromorfismos (por ejemplo en *S. angustifidum* de *Dulcamaroide*), con respecto al tamaño de los sitios, tanto para el 45S como para el 5S.

Por último, los resultados obtenidos en *S. crispum* indicaron la existencia de un patrón diferencial de distribución de ADNr 45S constituido por varias señales de menor intensidad en las regiones terminales de la mayoría de los cromosomas del complemento. Esto indicó la presencia de ADN satélite, un tipo de ADN repetitivo común en el genoma de las plantas (Kubis *et al.*, 1998) que podría ser utilizado para caracterizar una mejor diferenciación cariotípica entre especies. Las posibles diferencias en cuanto al ADN satélite podrían ser consideradas en estudios filogenéticos y el análisis de las secuencias, reforzar los estudios sistemáticos en algunos taxa (Svitashev *et al.*, 1994; Hemleben *et al.*, 2007).

Por todo lo antedicho, consideramos que los resultados obtenidos con la técnica de FISH, sumados a los ya expuestos de tinción convencional y bandeo cromosómico, resultaron útiles para caracterizar especies. La utilización de dichas técnicas citogenéticas podría complementar muy bien a todos aquellos análisis de filogenia molecular basados en unos pocos genes cloroplásticos, así como también sería de suma

importancia incluir estudios a nivel morfológico y anatómico en aquellas especies que aún no han sido lo suficientemente exploradas. La aplicación de estas técnicas citogenéticas moleculares y la utilización de secuencias de ADN repetitivo en la discusión de problemas biosistemáticos, significaría un aporte importante en el estudio de las relaciones filogenéticas y sistemáticas de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* en Argentina.

Conclusiones

- Se analizaron con técnicas de hibridación del ADN *in situ* fluorescente (FISH) 16 especies de *Solanum*, 9 de las cuales pertenecen al clado *Morelloide* y 7 al clado *Dulcamaroide*.
- En todas las entidades analizadas para los dos clados fue posible localizar los agrupamientos ribosómicos de ADNr 45S y 5S y el patrón de distribución de las dos familias génicas de ADNr difirió entre las especies.
- Los loci de ADNr 45S se correspondieron con las regiones heterocromáticas constitutivas ricas en GC.
- En *Morelloide*, los loci de ADNr 45S tuvieron posiciones terminales y variaron entre 2 y 4 sitios según las especies examinadas. Por otra parte, sólo hay 2 sitios de ADNr 5S en todos los taxones que variaron en cuanto a su posición (terminales, intercalares y centroméricos).
- En *Dulcamaroide*, los loci de ADNr 45S exhibieron todas posiciones terminales y excepto *S. salicifolium* 3158 que tiene 4 sitios, el resto de los taxones mostraron 2 sitios 45S. Los sitios de ADNr 5S variaron tanto en número como en posición para las distintas especies analizadas.
- Fue posible visualizar heteromorfismos en cuanto a la diferencia de tamaños de los sitios, tanto para el 45S como para el 5S en una sola especie del clado *Dulcamaroide* (*S. angustifidum*). También en relación a la presencia de uno de los sitios 45S sólo en uno de los cromosomas homólogos de *S. hastatilobum* (Clado *Morelloide*).
- *Solanum crispum* fue la única entidad estudiada que presentó uno de los sitios 5S en sintenia con el 45S. Por otra parte, presentó un patrón de distribución diferencial de ADNr 45S que consistió de un par de señales intensas en la región terminal del segundo par *m* y un conjunto de señales de menor intensidad también en las regiones terminales de la mayoría del complemento cromosómico.

- Tanto el número como la posición de los genes ribosómicos resultó ser una herramienta útil para establecer posibles homeologías cromosómicas entre las especies y entre las distintas poblaciones de una misma especie.

Capítulo 5: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

De la presente tesis surgieron 26 recuentos cromosómicos de especies de *Solanum* pertenecientes a los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide*, todos con $2n=2x=24$. El análisis llevado a cabo en células mitóticas permitió la comparación de especies y la identificación de variaciones cromosómicas intra e interespecíficas. La gran mayoría de los cariotipos resultaron diferentes aún en especies estrechamente relacionadas, así como también fue posible observar un incremento en la asimetría cariotípica, lo que podría ser considerado un carácter avanzado durante el proceso de evolución.

En 16 taxones fueron descritos los patrones de bandeo cromosómico y la distribución de ADN_r a partir de la técnica de FISH. Se detectó la presencia de heteromorfismos en cuanto al tamaño y número de bandas entre individuos de la misma especie y también entre cromosomas homólogos en el mismo individuo. En ambos clados, la localización y número de los loci de ADN_r 18-5,8-26S y 5S fueron variables y podrían ser utilizados como marcadores específicos para algunos taxones. Por otra parte, la sintenia de estas familias génicas no resultó frecuente, siendo *S. crispum* la única especie que presentó esta característica.

Tanto los análisis efectuados con tinción clásica, como los de bandeo cromosómico y FISH resultaron útiles para caracterizar citogenéticamente a los taxones examinados y constituyeron una gran herramienta para inferir relaciones filogenéticas entre las especies. Específicamente, podría evaluarse el ADN repetitivo como carácter cromosómico y como marcador especie-específico y/o grupo-específico.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere que las futuras investigaciones deberían centrarse en el análisis del mayor número posible de especies pertenecientes a ambos clados, sobre todo de aquellas que fueron sinonimizadas. Los datos que surgieran, en conjunto con estudios de filogenias moleculares basadas en secuencias nucleares y cloroplásticas podrían esclarecer las relaciones de parentesco, confirmar sinonimias o apoyar la validez de algunas entidades como buenas especies.

Capítulo 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. C. **2006**. Estudio cromosómico en *Nierembergia* y géneros afines (Nicotianeae-Solanaceae). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Acosta, M. C. & E. A. Moscone. **2000**. Estudio cariotípico en *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 35: 227-236.
- Acosta, M. C.; Guerra, M. & E. A. Moscone. **2002**. Distribución de la heterocromatina en *Solanum* (Solanaceae) según técnicas cromosómicas de fluorescencia. En: Actas XXXI Congreso Argentino de Genética. *Journal Basic and Applied Genetics*, 15: 85.
- Acosta, M. C.; Bernardello, G.; Guerra, M. & E. A. Moscone. **2005**. Karyotype analyses in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*, 54: 713-723.
- Acosta, M.; Guerra, M. & E. A. Moscone. **2012**. Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount. *Plant Systematics and Evolution*, 8: 1547-1556.
- Adams, S. P.; Leitch, I.; Bennett, M. D.; Chase, M. W. & A. R. Leitch. **2000**. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*, 87: 1578-1583.
- Andrada, B. A.; Nora, M. D. A. & V. P. Adriana. **2003**. Caracterización citológica en *Solanum nigrum* L. *Agro Sur*, 31: 77-81.
- Appels, R.; Gerlach, W. L.; Dennis, E. S.; Swift, H. & W. J. Peacock. **1980**. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*, 78: 293-311.
- Barboza, G. E.; Knapp, S. & T. E. Särkinen. **2013**. Solanaceae. In: Anton AM, Zuloaga FO, editors. *Flora Argentina* (vol. 13). Buenos Aires: IBODA-IMBIV. p. 231-264.
- Barros e Silva, A. E. & M. Guerra. **2010**. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*, 85: 115-125.
- Baum, B. R. & D. A. Johnson. **1996**. The 5S rRNA gene units in ancestral two-rowed barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) and bulbous barley (*H. bulbosum* L.): Sequence analysis and phylogenetic relationships with the 5S rDNA units of cultivated barley (*H. vulgare* L.). *Genome*, 39: 140-149.
- 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 to 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. strigillatum*, *C. fasciculatum* and *C. elegans*. *Plant Systematics and Evolution*, 185: 259-273.
- Berg, C. & J. Greilhuber. **1993b**. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 185: 259-273.
- Bernardello, L. M. & G. J. Anderson. **1990**. Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 77: 420-431.
- Bernardello, L.; Heiser, C. B. & M. Piazzano. **1994**. Karyotypic studies in *Solanum* sect. *Lasiocarpa* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 81: 95-103.
- Besendorfer, V.; Krajacic-Sokol, I.; Jelenic, S.; Puizina, J.; Mlinarec, J.; Sviben, T. & D. Papes. **2005**. Two classes of 5S rDNA unit arrays of the silver fir, *Abies alba* Mill.: structure, localization and evolution. *Theoretical and Applied Genetic*, 110: 730-741.
- Bir, S.; Kumari, S.; Shoree, S. & M. Sagoo. **1978**. Cytological studies in certain Bicarpeolate from north and central India. *Journal Cytology and Genetic*, 13: 99-106.
- Bitter, G. **1919**. Die papuasichen Arten von *Solanum*. *Botanische Jahrbucher für Systematik*, 55: 59-113.
- Bohs, L. **1989**. *Solanum allophyllum* (Miers) Standl. and the generic delimitation of *Cyphomandra* and *Solanum* (Solanaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76: 1129-1140.
- Bohs, L. **1994**. A new species of *Solanum* section *Cyphomandropsis* (Solanaceae) from Bolivia. *Missouri Botanical Garden Press*, 4: 203-205.
- Bohs, L. **1995**. Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, 44: 583-587.
- Bohs, L. **2004**. A chloroplast DNA phylogeny of *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 29: 177-187.
- Bohs, L. **2005**. Major clades in *Solanum* based on ndhF sequence data. En: V. Hollowell, R. Keating, W. Lewis & T. Croat (Eds.). A festschrift for William D'Arcy. *Systematic Botany Monograph*, 104: 27-50.
- Bohs, L. & R. Olmstead. **1999**. *Solanum* phylogeny inferred from chloroplast DNA sequence data. In Nee M, Symon DE, Lester RN, Jessop JP, editors. *Solanaceae IV: advances in biology and utilization*. Kew: Royal Botanical Gardens. p. 97-110.
- Brasileiro-Vidal, A. C.; Melo-Oliveira, M. B.; Carvalheira, G. M. C. & M. Guerra. **2009**. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. *Micron*, 40: 851-859.

- Cabral, J. S.; Félix, P. L. & M. Guerra. **2006**. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 659-664.
- Cai, Q. & M. R. Bulum. **1991**. Characterization of genomes of timothy (*Phleum pratense* L.) I. Karyotypes and C-banding patterns in cultivated timothy and two wild relatives. *Genome*, 34: 52-58.
- Cai, Q.; Zhang, D.; Liu, Z. L. & X. R. Wang. **2006**. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobos* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany*, 97: 715-722.
- Cerbah, M.; Coulaud, J. & S. Siljak-Yakovlev. **1998**. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Journal of Heredity*, 89: 312-318.
- Chase, M. W.; Knapp, S.; Cox, A. V.; Clarkson, J. J.; Butsko, Y.; Joseph, J.; Savolainen, V. & A. S. Parokony. **2003**. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 92: 107-127.
- Chiarini, F. & G. Bernardello. **2006**. Karyotype studies in South American species of *Solanum* subgen. *Leptostemonum* (Solanaceae). *Plant Biology*, 8: 486-493.
- Chiarini, F.; Bernardello, G.; Anderson, G. & A. S. Guerra. **2006**. Chromosomal differentiation of *Solanum vespertilio* and *S. lidii* (Solanaceae), rare, endemic species of the Canary Islands (Spain). *Caryologia*, 59: 277-283.
- Chiarini, F. E. & G. E. Barboza. **2008**. Karyological studies in *Jaborosa* (Solanaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 156: 467-478.
- Chiarini, F.; Moreno, N. C.; Barboza, G. E. & G. Bernardello. **2010**. Karyotype characterization of Andean Solanoideae (Solanaceae). *Caryologia*, 63: 278-291.
- Chiarini, F. **2013**. *Solanum* grupo *Cyphomandra*. En: Barboza, G. E. (coord.). Solanaceae. *Flora Argentina*, 13: 166-175. En prensa.
- Chiarini, F.; Santiñaque, F. F.; Urdampilleta, J. D. & M. L. Las Peñas. **2013**. Genome size and karyotype diversity in *Solanum* sect. *Acanthophora* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*. On line.
- Child, A. & R. N. Lester. **2001**. Synopsis of the genus *Solanum* L. and its infrageneric taxa. In: van den Berg RG, Barendse GWM, van der Weerden GM, Mariani C., editors. Solanaceae V: advances in taxonomy and utilization. Nijmegen: Nijmegen University Press. p. 39-52.
- Crisp, M. D. **1999**. Revision of *Leptosema* (Fabaceae: Mirbelieae). *Australian Systematic Botany*, 12: 1-54.

- Cronn, R. C.; Zhao, X.; Paterson, A. H. & J. F. Wendel. **1996**. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular and Evolution*, 42: 685-705.
- Cuadrado, A. & N. Jouve. **1994**. Highly repetitive in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Genome*, 37: 709-712.
- D'Arcy, W. G. **1991**. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester R, Nee M, Estrada N, editors. *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Kew: Royal Botanic Gardens. p. 75-137.
- Doganlar, S.; Frary, A.; Daunay, M. C.; Lester, R. N. & S. D. Tanksley. **2002**. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics*, 161: 1697-1711.
- Dunal, M. F. **1816**. *Solanorum generumque affinium* synopsis. Montpellier.
- Dunal, M. F. **1852**. Solanaceae. En: A. P. De Candolle, *Prodromos*, 13: 27-387.
- Edmonds, J. M. & J. A. Chweya. **1997**. Black nightshades. *Solanum nigrum* L. and related species. IPGRI. Gatersleben, Alemania.
- Ellis, R. H.; Hong, T. D. & E. H. Roberts. **1985**. Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II. Compendium of specific germination, information and test recommendation. Handbook for genebanks 3. IBPGR, Rome.
- Entani, T.; Iwano, M.; Shiva, H.; Takayama, S.; Fukui, K. & A. Isogai. **1999**. Centromeric localization of an S-RNase gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 391-397.
- Fay, M. F.; Richardson, J. E.; Cowan, R. S. & P. A. Stranc. **1998**. The application of genetic fingerprinting techniques to plant conservation problems. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Font, M.; Valles, A. & N. García-Jacas. **2008**. Auto- and allopolyploidy in *Centaurea* sect. *Acrocentron* s.l. (Asteraceae, Cardueae): karyotype and fluorochrome banding pattern analysis. *Collectanea Botanica*, 27: 7-18.
- Fregonezi, J. N.; Rocha, C.; Torezan, J. M. D. & A. L. Vanzela. **2004**. The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *Cestrum strigillatum* (Solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenetic Genome Research*, 106: 184-188.
- Fregonezi, J. N.; Fernades, T.; Dominguez Torezan, J. M.; Vieira, O. & A. L. L. Vanzela. **2006**. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 97-104.
- Friebe, B. & B. S. Gill. **1996**. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploidy wheats. En: Jauhar, P. (Ed.). *Methods of genome analysis in plants*, CRC Press, Boca ratón, pp. 39-60.

- Fuchs, J.; Stehl, S.; Brandes, A.; Schweizer, D. & I. Schubert. **1998**. Molecular cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome- heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. *Chromosome Research*, 6: 219-230.
- Fukui, K & S. Nakayama. **1996**. Plant chromosomes: laboratory methods. CDR Press, Boca Ratón.
- Galasso, I.; Saponetti, L. S. & D. Pignone. **1996**. Cytotaxonomics studies in *Vigna* III. Chromosomal distribution and reacting properties of the heterochromatin in five wild species of the section *Vigna*. *Caryologia*, 49: 311-319.
- Ganapathi, A. & R. Rao. **1982**. Interrelationships between tetraploid *Solanum nigrum* L. and *Solanum americanum* Mill. Indian Science Congress Association, 69: 224.
- Gebhardt, C.; Walkemeier, B.; Henselewsky, H.; Barakat, A.; Delseny, M. & K. Stuber. **2003**. Comparative mapping between potato (*Solanum tuberosum*) and *Arabidopsis thaliana* reveals structurally conserved domains and ancient duplications in the potato genome. *Plant Journal*, 34: 529-541.
- Gerlack, W. L. & J. R. Bedbrook. **1979**. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acid Research*, 7: 1869-1885.
- Gerlack, W. L. & T. A. Dyer. **1980**. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contain 5S-rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 8: 4851-4865.
- Gill, L. S. & A. O. Obembe. **1991**. Chromosome studies in some trees and shrubs from S Nigeria. *Willdenowia*, 21: 233-238.
- Goodspeed, T. H. **1954**. The Genus *Nicotiana*. Waltham: Chronica Botanica.
- Grant, V. **1981**. Plant Speciation. New York, USA, Columbia University Press.
- Guerra, M. **1983**. Uso do Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre bandeamento simples e bandeamento. *Ciência e Cultura*, 35: 190-193.
- Guerra, M. **1986**. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética*, 9: 741-743.
- Guerra, M. **1993**. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, 71: 234-241.
- Guerra, M. **2000**. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 1029-1041.
- Guerra, M. **2004**. FISH, conceitos y aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Riberão Preto, pp. 176.

- Guerra, M.; Pedrosa, A.; Silva, A. E. B.; Cornelio, M. T. M.; Santos, K. & W. D. Soares. **1997**. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accesions of a *Citrus* germplasm bank. *Revista Brasileira de Genética*, 20: 489-496.
- Hasterok, R. O. B. E.; Wolny, E. L. Z. B.; Hosiawa, M. A. R. T.; Kowalczyk, M. A. L. G.; Kulak-Ksiazczyk, S. Y. L. W.; Ksiazczyk, T. O. M. A.; Heneen, W. K. & J. O. L. A. Maluszynska. **2006**. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Annals of Botany*, 97: 205-216.
- Hawkes, J. G. **1999**. The economic importance of the family Solanaceae. En: Nee, M., Symon, D. E., Lester, R. N., Jessop, J. P. (Eds.), *Solanaceae IV. Advances in biology and utilization*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 1-8.
- Hemleben, V. & D. Werts. **1988**. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*). *Gene*, 62: 165-169.
- Hennig, W. **1999**. Heterochromatin. *Chromosoma*, 108: 1-9.
- Hoshi, Y. & K. Kondo. **1998**. A chromosome phylogeny of the Droceraceae by using CMA/DAPI fluorescent banding. *Cytologia*, 63: 329-339.
- Hunziker, A. T. **2001**. *Genera Solanacearum*. Ruggell: ARG Gantner Verlag KG.
- INFOSTAT GROUP. **2002**. INFOSTAT. Version 1.1. Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Editorial Brujas.
- John, H. A.; Birnstiel, M. L. & K. W. Jones. **1969**. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582-587.
- Kato, A.; Vega, J. M.; Han, F.; Lamb, J. C. & J. A. Birchler. **2005**. Advances in plant chromosome identification and cytogenetics techniques. *Plant Biology*, 8: 148-154.
- Kellogg, E. A. & R. Appels. **1995**. Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes are decoupled in diploid wheat relatives. *Genetics*, 140: 325-343.
- Knapp, S. **2008**. A revision of *Solanum havanense* species group and new taxonomic additions to the *Geminata* clade (*Solanum*, Solanaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95: 405-458.
- Knapp, S. **2010**. New species of *Solanum* (Solanaceae) from Peru and Ecuador. *Phytokeys*, 1: 33-51.
- Knapp, S. **2013**. A revision of the *Dulcamaroid* clade of *Solanum* L. (Solanaceae). *PhytoKeys*, 22: 1-432.
- Kitamura, S.; Inoue, M.; Ohmido, N. & K. Fukui. **2001**. Quantitative chromosome maps and rDNA localization in the subgenome of *Nicotiana tabacum* L. and its putative progenitors. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 1180-1188.

- Komarova, N. Y.; Grabel, T.; Huigen, D. J.; Hemleben, V. & R. A. Volkov. **2004**. Organization differential expression and methylation of rDNA in artificial *Solanum* allopolyploids. *Plant Molecular and Biology*, 56: 439-463.
- Krishnappa, D. G. & M. S. Chennaveiraiah. **1975**. Cytotaxonomy of *Solanum indicum* complex. *Cytologia*, 40: 323-331.
- Kubis, S., Schmidt, T & J. S. Heslop-Harrison. **1998**. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany*, 82: 45-55.
- Kulak, S.; Hasterok, R. & J. Maluszynska. **2002**. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. *Hereditas*, 136: 144-150.
- Lapitan, N. L. V. **1992**. Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome*, 35: 171-181.
- Las Peñas, M. L.; Bernardello, G. & R. Kiesling. **2008**. Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 272: 211-222.
- Las Peñas, M. L.; Urdampilleta, J. D.; Forni Martins, E. R. & G. Bernardello. **2009**. Karyotypes, heterochromatin, and physical mapping of 18S-26S rDNA in Cactaceae. *Cytogenetics and Genome Research*. on line.
- Leitch, I. J. & J. S. Heslop-Harrison. **1992**. Physical mapping of the 18S-5,8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35: 1013-1018.
- Levan, A.; Fredga, L. & A. Sandberg. **1964**. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Levin, A. A. **2002**. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York.
- Lim, K.; Wennekes, J.; Jong, J. H.; Jacobsen, E. & J. M. Tuyl. **2001**. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, 44: 911-918.
- Lim, K. Y.; Souckova-Skalicka, V.; Clarkson, J. J.; Chase, M. W.; Kovarik, A. & A. R. Leitch. **2006**. A genetic appraisal of a new synthetic *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) and the Kostoff synthetic tobacco. *American Journal of Botany*, 93: 875-883.
- Lima de Faria, A. **1976**. The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas*, 83: 1-22.
- Linnaeus, C. **1753**. *Species plantarum*, ed. 1. Stockholm. Facsimile reprint 1957 by The Ray Society, London.
- Maluszynska, J. & J. S. Heslop-Harrison. **1993**. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. *Genome*, 36: 774-781.

- Melo, N. F. & M. Guerra. **2003**. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany*, 92: 309-316.
- Melo, C. A. F.; Martins, M. I. G.; Oliveira, M. B. M.; Benko-Iseppon, A. M. & R. Carvalho. **2011**. Karyotype analysis for diploid and polyploidy species of the *Solanum* L. *Plant Systematic and Evolution*, 293: 227-235.
- Merrit, J. F. **1974**. The distribution of heterochromatin in the genus *Nicotiana* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 61: 982-994.
- Miranda, M.; Ikeda, F.; Endo, T.; Morigucki, T. & M. Omura. **1997**. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Research*, 5: 86-92.
- Miguel, V. **2003**. Análisis cariotípico en *Solanum fusiforme* y *S. stuckertii* (sección *Cyphomandropsis*) con bandeos de fluorescencia y AgNOR. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Miguel, V.; Acosta, M. C. & E. A. Moscone. **2012**. Karyotype analysis in two species of *Solanum* (Solanaceae) sect. *Cyphomandropsis* based on chromosome banding. *New Zealand Journal of Botany*, 50: 217-225.
- Mizianty, M. **1985**. Banding patterns in plant chromosomes. II Bibliography (1970-1980) Anthophyta I. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53: 485-487.
- Moscone, E. A. **1989**. Estudios citotaxonómicos en las tribus *Solaneae* y *Nicotianeae* (Solanaceae) de América del Sur. Tesis Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Moscone, E. A. **1992**. Estudios sobre cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. *Darwiniana*, 31: 261-297.
- Moscone, E. A. **1993**. Estudios cromosómicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Análisis cariotípico de *C. parvifolium* y *C. annum* var. *annuum*. *Kurtziana*, 22: 9-18.
- Moscone, E. A.; Klein, F.; Lambrou, M.; Fucks, J. & D. Schweizer. **1999**. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome*, 42: 1224-1233.
- Moscone, E. A.; Lambrou, M.; Hunziker, A. T. & F. Ehrendorfer. **1993**. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 186: 213-229.
- Moscone, E. A.; Loidl, J.; Ehrendorfer, F. & A. T. Hunziker. **1995**. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany*, 82: 276-287.

- Moscone, E. A. **1999**. Análisis cariotípico en *Capsicum baccatum* var. *umblicatum* (Solanaceae) mediante bandeos AgNOR y de fluorescencia. *Kurtziana*, 27: 225-232.
- Moscone, E. A.; Baranyi, M.; Ebert, L.; Greilhuber, L.; Ehrendorfer, F. & A. T. Hunziker. **2003**. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92: 21-29.
- Moscone, E. A.; Lambrou, M. & F. Ehrendorfer. **1996**. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 202: 37-63.
- Moscone, E. A.; Samuel, R.; Schwarzacher, T. & D. Schweizer. **2007**. Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution. *Chromosome Research*, 15: 931-943.
- Mouras, A. **1982**. Caryogramme du *Nicotiana tabacum* et tentative d'identification des chromosomes par banding. *Genetica*, 60: 41-48.
- Mouras, A.; Wildenstein, C. & G. Salesses. **1986**. Analysis of karyotype and C-banding pattern of *Nicotiana plumbaginifolia* using two techniques. *Genetica*, 68: 197-202.
- Nakamura, R.; Kitamura, S.; Inoue, M. & K. Fukui. **2001**. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 810-814.
- Nee, M. **1999**. Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee M, Symon DE, Lester RN, Jessop JP, editors. *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Kew: Royal Botanic Gardens. p. 285-333.
- Obute, G. C.; Ndukwu, B. C. & B. E. Okoli. **2006**. Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (Solanaceae). *African Journal of Biotechnology*, 5: 689-692.
- Olmstead, R. G. & J. D. Palmer. **1992**. A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79: 346-360.
- Olmstead, R. G. & J. A. Sweere. **1994**. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology*, 43: 467-481.
- Olmstead, R. G. & J. D. Palmer. **1997**. Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic of Botany*, 22: 19-29.
- Olmstead, R. G.; Sweere, J. A.; Spangler, R. E.; Bohs, L. & J. D. Palmer. **1999**. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. En: Nee, M.; Symon, D. E.; Lester, R. N. & J. P. Jessop, editors. *Solanaceae IV: advances in biology and utilization*. London. Kew Royal Botanic Gardens. pp, 111-137.

- Olmstead, R. G.; Bohs, L.; Migid, H. A.; Santiago-Valentin, E.; García, V. F. & S. M. Collier. **2008**. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57: 1159-1181.
- Palomino, G.; Viveros R. & R. A. Bye. **1988**. Cytology of five mexican species of *Datura* L. (Solanaceae). *Southwestern Naturalist*, 33: 85-90.
- Pardue, M. L. & J. P. Gall. **1969**. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64: 600-604.
- Park, Y. K.; Kim, B. D.; Kim, B. S.; Armstrong, K. C. & S. N. Kim. **1999**. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18S-26S rRNA gene families in five different species of *Capsicum*. *Genes & Genetic System*, 74: 149-157.
- Park, Y. K.; Park, K. Ch.; Park, Ch. H. & N. S. Kim. **2000**. Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. *Molecules and Cells*, 10: 18-24.
- Peralta, I. E.; Knapp, S. & D. Spooner. **2008**. The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives (*Solanum* sections *Juglandifolium* and *Lycopersicoides*). *Monographs in Systematic Botany*, 84: 1-186.
- Pijnacker, L. P. & M. A. Fewerda. **1984**. Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Canadian Journal of genetics and cytology*, 26: 415-419.
- Pijnacker, L. P. & M. A. Fewerda. **1991**. Nucleolar organizer function in developing potato calli. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 587-592.
- Piovano, M. A. **1989**. El cariotipo de *Dysochroma longipes* (Solanaceae). *Kurtziana*, 20: 207-212.
- Poggio, L. **1996**. Algunos aportes a la citogenética y especiación vegetal. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Buenos Aires, Argentina, 48: 79-92.
- Poggio, L. & C. A. Naranjo. **2004**. Citogenética. En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires, Editorial INTA, pp. 69-79.
- Poggio, L.; Espert, S. M. & R. H. Fortunato. **2008**. Citogenética evolutiva en Leguminosas americanas. *Rodriguésia*, 59: 423-433.
- Pringle, G. J. & B. G. Murray. **1991**. Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. En: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M. & Estrada-R., N. (eds.), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Kew Royal Botanic Gardens. pp. 247-252.

- Pringle, G. J. & B. G. Murray. **1993**. Karyotypes and C-banding patterns in species of *Cyphomandra* Mart. Ex Sendtner (Solanaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 111: 331-342.
- Ran, Y.; Murray, B. G. & K. R. W. Hammet. **1999**. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica*, 106: 139-147.
- Ran, Y.; Hammett, K. R. W. & B. G. Murray. **2001**. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany*, 87: 823-830.
- Ratera, E. L. **1943**. Número de cromosomas de algunas Solanáceas argentinas. Buenos Aires. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 10: 318-325.
- Raven, P. H. **1975**. The bases of Angiosperm phylogeny: cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62: 724-764.
- Rego, L. N. A.; da Silva, C. R. M.; Torezan, J. M. D.; Gaeta, M. L. & A. L. L. Vanzela. **2009**. Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Plant Systematic and Evolution*, 279: 93-102.
- Rieseberg, L. H. **2001**. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 351-358.
- Robledo, G. & J. G. Seijo. **2008**. Characterization of *Arachis* D genome by FISH chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 724-771.
- Robledo, G. & J. G. Seijo. **2010**. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1033-1046.
- Roe, K. E. **1967**. Chromosome size in *Solanum* and *Cyphomandra*: taxonomic and phylogenetic implications. *American Naturalist*, 101: 295-297.
- Romero Zarco, C. **1986**. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 35: 526-530.
- Sang, I. & G. H. Liang. **2000**. Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA in three *Sorghum* species. *Genome*, 43: 918-922.
- Särkinen, T.; Bohs, L.; Olmstead, R. G. & S. Knapp. **2013**. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *Evolutionary Biology*, 13:214.
- Sastri, D. C.; Hilu, K.; Appels, R.; Lagudah, E. S.; Playford, J. & B. R. Baum. **1992**. An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Systematics and Evolution*, 183: 169-181.

- Schwarzacher, T. **2003**. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization in plants. *Journal of Experimental Botany*, 54: 11-23.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P. & D. Schweizer. **1980**. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 134: 293-297.
- Schwarzacher, T. P. & P. Heslop-Harrison. **2000**. Practical *in situ* hybridization. Bios, Oxford.
- Schwarzacher, T. & D. Schweizer. **1982**. Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 141: 91-113.
- Schweizer, D. **1976**. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Schweizer, D. **1979**. Fluorescent chromosome banding in plants: applications, mechanisms, and implications for chromosome structure. En: Davies, D. R.; Hopwood, D. A. (Eds.): *Proceedings of the Fourth John Innes Symposium*, Norwich: Crowe. pp. 61-72.
- Schweizer, D. & P. F. Ambros, **1994**. Chromosome banding: stain combinations for specific regions. En: Gosden, J. R. (Ed.). *Chromosome analysis protocols*. Totowa Humana Press.
- Seijo, J. G.; Lavia, G. I.; Fernández, A.; Krapovickas, A.; Ducasse, D. & E. A. Moscone. **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). *American Journal of Botany*, 91: 1294-1303.
- Seijo, G.; Lavia, G. I.; Robledo, G.; Fernández, A. & V. G. Solís Neffa. **2010**. La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, G., Hopp, E. & L. Mroginski (eds.). *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II*. pp. 34-46.
- Seithe, A. **1962**. Die Haararten der Gattung *Solanum* L. und ihre taxonomische Verwertung. *Botanische Jahrbücher*, 81: 261-335.
- Sharma, A. K. & A. Sharma. **1957**. Karyotype studies in *Cestrum* as an aid to taxonomy. *Genetica*, 29: 83-100.
- Sheidai, M.; Narengi, Z. & M. Khatamsaz. **1999**. Karyotype and seed protein analyses of *Lycium* (Solanaceae) in Iran. *Edinburgh Journal of Botany*, 56: 253-264.
- Siljak - Yakovlev, S.; Bartoli, A.; Roitman, G.; Barghi, N. & C. Mugnier. **1994**. Etude caryologique de tris especes d' *Hypochaeris* originaires d'Argentine: *H. chillensis*, *H. microcephala* var. *albiflora* et *H. megapotamica*. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1496-1502.

- Sinclair, J. H. & D. D. Brown. **1971**. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. *Biochemistry*, 10: 2761-2769.
- Smith, F. J. & J. L. Oud. **1972**. The possibility to distinguish chromosomes of *Petunia* hybrid by quinacrine fluorescence. *Genetica*, 43: 589-596.
- Snowdon, R.; Kusterer, B. & R. Horn. **2001**. Structural genome analysis using molecular cytogenetic techniques. *Progress in Botany*, 63: 55-79.
- Soltis, D. E. & P. S. Soltis. **1998**. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: Molecular systematics of plants II (Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. eds.) Kluwer Academic Publishers, London.
- Sone, T.; Fujisawa, M.; Takenaka, M.; Nakawaga, S.; Yamaoka, S.; Sakaida, M.; Nishiyama, R.; Yamato, K. T.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Fukuzawa, H. & K. Ohyama. **1999**. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Molecular Biology*, 41: 679-685.
- Souza, M. & A. N. Benko-Iseppon. **2004**. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brasil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144: 181-191.
- Spooner, D. M.; Van der Berg, R. G.; Rodríguez, A.; Ramberg, J.; Hijmans, R. J. & S. I. Lara Cabrera. **2004**. Wild potatoes (*Solanum* section *Petota*; Solanaceae) of North and Central America. *Monographs in Systematic Botany*, 61: 1-209.
- Stace, C. A. **2000**. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49: 451-477.
- Stebbins, G. L. **1971**. Chromosomal evolution in higher plants. E. Arnold, London, UK. pp. 216.
- Steele, K. P.; Holsinger, K. E.; Jansen, R. K. & D. W. Taylor. **1991**. Assessing the reliability of 5S rRNA sequence data for phylogenetic analysis in green plants. *Molecular Biology and Evolution*, 8: 240-248.
- Stiefkens, L. & G. Bernardello. **1996**. Karyotypic studies in South American *Lycium* (Solanaceae). *Cytologia*, 61: 395-402.
- Stiefkens, L. & G. Bernardello. **2002**. Karyotypic studies in *Lycium* section *Mesocope* (Solanaceae) from South America. *Caryologia*, 55: 199-206.
- Stiefkens, L.; Las Peñas, M. L.; Bernardello, G.; Levin, R. A. & J. S. Miller. **2010**. Karyotypes and fluorescent banding patterns in southern African *Lycium* (Solanaceae). *Caryologia*, 63: 1-11.
- Sultana, S. S. & S. S. Adam. **2007**. Differential fluorescent chromosome banding of *Solanum nigrum* L. and *S. villosum* L. from Bangladesh. *Cytologia*, 72: 213-219.

- Sumner, A. T. **1990**. Chromosome banding. Unwin Hyman, London.
- Sumner, A. T. **2003**. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing Limited, pp. 304.
- Svitashev, S.; Bryngelsson, T.; Vershinin, A.; Pedersen, C.; Sall, T. & R. Von Bothmer. **1994**. Phylogenetic analysis of the genus *Hordeum* using repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 801-810.
- Tabachnik, B. & L. Fidell. **1996**. Using multivariate statistics. Harper Collins Publishers, pp. 507-508.
- Taketa, S.; Ando, H.; Takeda, K.; Ichii, M. & R. Von Bothmer. **2005**. Ancestry of american polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany*, 96: 23-33.
- Trivedi, R. N. & A. K. Sinha. **1986**. Karyomorphological studies in three population of *Solanum surattense*, a weed. *Cytologia*, 51: 157-161.
- Tyagi, B. R. & B. S. Gill. **1990**. C-banded karyotype of *Hyoscyamus muticus* L. *Journal of Heredity*, 81: 401-402.
- Udovicic, F.; McFadden, G. I. & P. Y. Ladiges. **1995**. Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 4: 247-256.
- Urdampilleta, J. D.; Ferruci, M. S. & A. L. L. Vanzela. **2005**. Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 149: 451-455.
- Urdampilleta, J. D.; Ferrucci, M. S.; Torezan, J. M. D. & A. L. L. Vanzela. **2006**. Karyotype relationships among four South American species of *Urvillea* (Sapindaceae; Paullinieae). *Plant Systematics and Evolution*, 258: 85-95.
- Vaio, M.; Speranza, P.; Valls, J. F.; Guerra, M. & C. Mazzella. **2005**. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the *Quadrifaria* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*, 96: 191-200.
- Vanzela, A. L. L.; Ruas, C. F.; Oliveira, M. F. & P. M. Ruas. **2002**. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica*, 114:105-111.
- Vosa, C. G. **1976**. Heterochromatin classification in *Vicia faba* and *Scilla sibirica*. *Chromosome Today*, 5: 185-192.
- Vosa, C. G. **1989**. Chromosome banding: plants. *Genome*, 31: 474-475.
- Wagenvoort, M.; Rouwendal, G. J. A.; Kuiper-Groenwold, G. & H. P. J. De Vries Van Hulten. **1994**. Chromosome identification in potato trisomics ($2n = 2x + 1 = 25$) by

conventional staining, Giemsa C-banding and non-radioactive *in situ* hybridization. *Cytologia*, 59: 405-417.

Weese, T. L. & L. Bohs. **2007**. A Three – Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32: 445-463.

Weiss-Schneeweiss, H.; Stuessy, T. F.; Siljak-Yakovlev, S.; Baeza, C. M. & J. Parker. **2003**. Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution*, 241: 171-184.

Whalen, M. D. **1984**. Conspectus of species groups in *Solanum* subgenus *Leptostemonum*. *Gentes Herbarum*, 12: 179-282.

Wijsman, H. J. W.; De Jong, J. H. & T. M. Pedersen. **1983**. On the interrelationships of certain species of *Petunia* III. The position of *P. linearis* and *P. calycina*. *Acta Botanica Neerlandica*, 32: 323-332.

Xiang-Hui, J.; Young-Hua, Z.; Ming Liu, X. & S. Chao-Wen. **2011**. Karyotype analysis of three *Solanum* plants using combined PI-DAPI staining and double fluorescence *in situ* hybridization with 45S and 5S rDNA probes. *African Journal of Biotechnology*, 10: 18948-18957.

Yokota, M. **1990**. Karyomorphological studies on *Habenaria*, Orchidaceae and allied genera from Japan. *Journal of Science of the Hiroshima University*, 2: 53-161.

Zhang, D. & T. Sang. **1998**. Chromosomal structural rearrangement of *Paeonia brownii* and *P. californica* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, 41: 848-853.

Ziolkowski P. A. & J. Sadowski. **2002**. FISH-mapping of rDNAs and *Arabidopsis* BACs on pachytene complements of selected *Brassicas*. *Genome*, 45: 189-197.

Taxones analizados de *Solanum* de los clados *Morelloide* y *Dulcamaroide* con las técnicas clásicas de tinción, bandeado cromosómico CMA/DAPI y FISH. El asterisco indica los números cromosómicos que son informados por primera vez.

Clado *Morelloide*

Taxón	2n	T. convencional	Bandeo CMA/DAPI	FISH
<i>S. aloysiifolium</i> Dunal				
Barboza <i>et al.</i> 2210	24	X	X	X
Barboza <i>et al.</i> 2152	24	X	X	X
<i>S. americanum</i> Mill.				
Barboza <i>et al.</i> 2139	24	X	X	X
<i>S. chenopodioides</i> Lam.				
Barboza <i>et al.</i> 2292	24	X	X	X
<i>S. concarense</i> Hunz.				
Chiarini <i>et al.</i> 821	24*	X		
<i>S. echegarayi</i> Hieron.				
Barboza <i>et al.</i> 3253	24*	X		
<i>S. hastatilibum</i> Bitter				
Chiapella <i>et al.</i> 2630	24*	X	X	X
<i>S. palitans</i> C. V. Morton				
Barboza <i>et al.</i> 2178	24	X	X	X
<i>S. pilcomayense</i> Morong				
Barboza <i>et al.</i> 2287	24	X	X	X
Barboza <i>et al.</i> 2279	24	X	X	X
<i>S. reductum</i> C. V. Morton				
Barboza <i>et al.</i> 3516	24*	X		

<i>S. sarrachoides</i> Sendtn.				
Chiapella <i>et al.</i> 1840	24	X		
<i>S. sinuatirecurvum</i> Bitter				
Barboza <i>et al.</i> 3551	24*	X		
<i>S. triflorum</i> Nutt.				
Chiapella <i>et al.</i> 1839	24	X	X	X
<i>S. tripartitum</i> Dunal				
Barboza <i>et al.</i> 2228	24	X		
<i>S. zuloagae</i> Cabrera				
Barboza <i>et al.</i> 3569	24*	X		

Clado *Dulcamaroides*

Taxón y colectores	2n	T. convencional	Bandeo CMA/DAPI	FISH
<i>S. aligerum</i> Schtdl.				
Barboza <i>et al.</i> 2155	24	X		
<i>S. amygdalifolium</i> Steud.				
Barboza <i>et al.</i> 1566	24*	X		X
<i>S. angustifidum</i> Bitter				
Barboza <i>et al.</i> 3489	24*	X	X	X
<i>S. crispum</i> Ruiz & Pav.				
Chiapella <i>et al.</i>	24*	X	X	X
<i>S. dulcamara</i> L.				
	24	X	X	X
<i>S. endoadenium</i> Bitter				
Barboza <i>et al.</i> 3476	24	X	X	X

S. salicifolium Phil.				
Barboza <i>et al.</i> 3488	24	X		
Barboza <i>et al.</i> 3158	24	X	X	X
Chiarini <i>et al.</i> 818	24	X	X	
Chiarini <i>et al.</i> 794	24	X	X	X