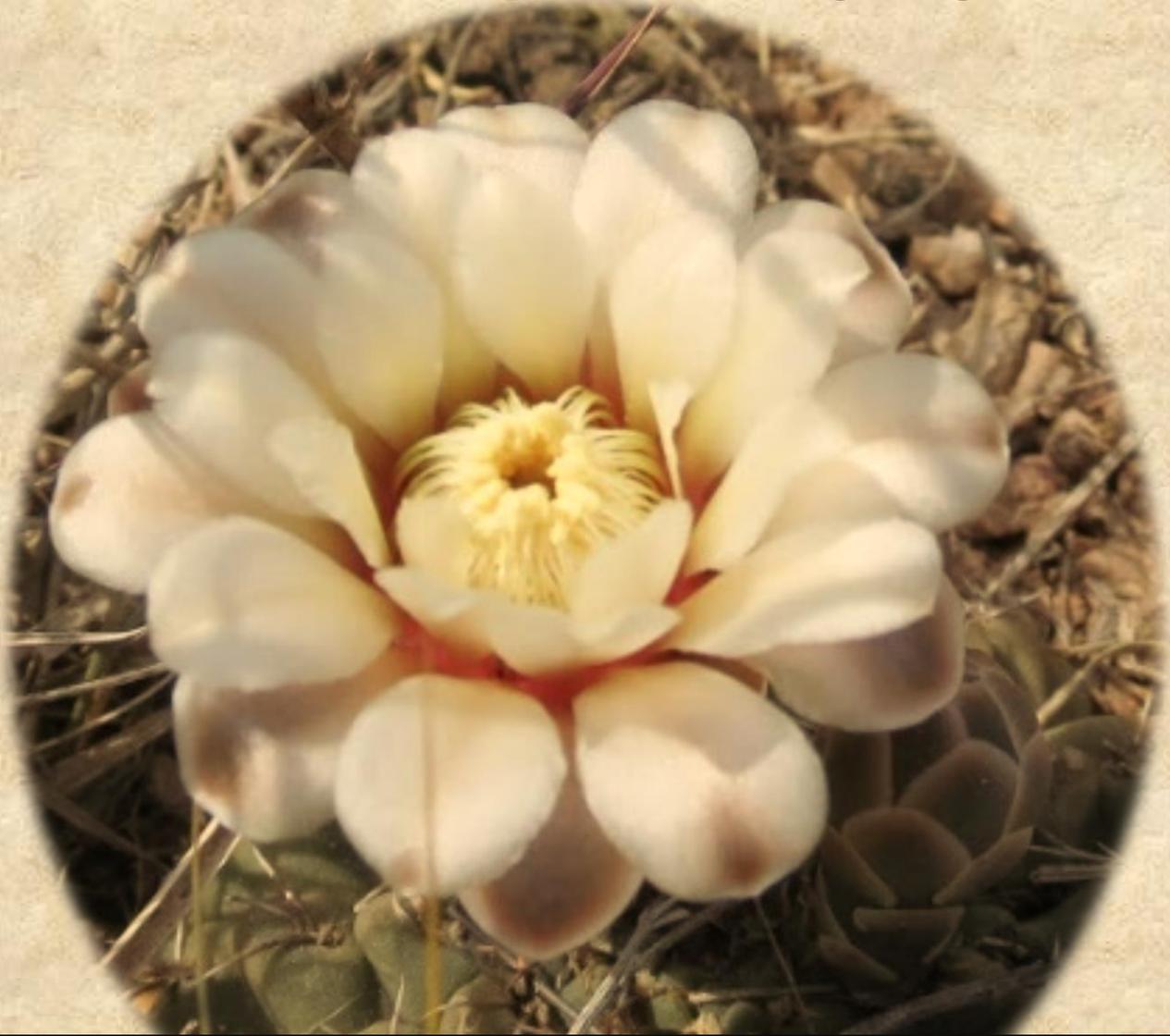


Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Carrera de Ciencias Biológicas  
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal



**Estudios genéticos y ecológicos en *Gymnocalycium quehlianum* (F. Haage ex Quehl) Vaupelex Hosseus (Cactaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en las Sierras de Córdoba**

**Tesinista: Martino Pamela**

**Directora: Las Peñas M. Laura**

**Co-Director: Gurvich E. Diego**

**2017**

**Estudios genéticos y ecológicos en *Gymnocalycium quehlianum* (F. Haage ex Quehl) Vaupelex Hosseus (Cactaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en las Sierras de Córdoba**

**Tribunal Examinador**

❖ Nombre y Apellido: .....

Firma: .....

❖ Nombre y Apellido: .....

Firma: .....

❖ Nombre y Apellido: .....

Firma: .....

❖ Calificación: .....

❖ Fecha: .....

## AGRADECIMIENTOS

- ♣ A mis padres, Syl y José por su amor, comprensión, paciencia y porque sin su apoyo esto no podría haber sido posible.
- ♣ A mi hermano Eze por cada consejo y crítica que me dio.
- ♣ A mi novio Mati por acompañarme, aconsejarme y aguantarme en cada situación.
- ♣ A mi directora Laura por guiarme, ayudarme y alentarme en todo este camino.
- ♣ A mi co-director Diego, por su paciencia y todas sus enseñanzas.
- ♣ A Karen y Gonza, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.
- ♣ A TODOS los integrantes del laboratorio, por toda su colaboración a lo largo de mi tesina.
- ♣ A mis amigas, las biolopibas y Lean, por cada momento y compañía compartida durante toda la carrera.
- ♣ A mis amigas Katy y Ani, por cada charla y consejo brindado.
- ♣ A toda mi familia (tíos, abuelos, primos) que siempre estuvieron pendientes de mí.
- ♣ Al jardín botánico de Córdoba, especialmente a Diego Serra y Sergio García, quienes fueron los promotores para que trabajara con esta especie.
- ♣ Al tribunal examinador, por sus sugerencias.
- ♣ A la FCEFyN, por permitirme llevar a cabo mis estudios.
- ♣ Al IMBIV, por la asistencia que me brindo no solo como institución sino también su personal.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>OBJETIVOS</b> .....	7
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
Área de estudio.....	8
Contenido de ADN (Cx) estimado por citometría de flujo .....	9
Citogenética: técnica convencional, Bando y FISH.....	9
Caracteres ecológicos.....	12
Análisis de datos .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	14
Contenido de ADN y análisis citogenéticos .....	14
Características ecológicas .....	22
<b>DISCUSIÓN</b> .....	27
Características genéticas .....	27
Características ecológicas .....	29
<b>CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33
<b>ANEXO</b> .....	39

## RESUMEN

A lo largo de gradientes altitudinales existen importantes cambios en los tipos de vegetación. Sin embargo, existen especies que pueden presentar amplios rangos altitudinales. *Gymnocalycium quehlianum* es un cactus globular endémico de las Sierras de Córdoba, que se encuentra desde los 500 hasta los 1200 msnm. Estudiar aspectos de su genética y ecología a lo largo de su distribución altitudinal es de vital importancia para comprender estos patrones. Como objetivo de este trabajo me propuse realizar estudios genéticos y ecológicos en *G. quehlianum* en un gradiente altitudinal en las Sierras de Córdoba. El estudio se realizó en un gradiente altitudinal que va desde San Marcos Sierras hasta el Camino del Cuadrado; en el cual se seleccionaron tres poblaciones de *G. quehlianum* a 615 msnm (San Marcos Sierras), 948 msnm (Valle Hermoso) y a 1257 msnm (Camino del Cuadrado). En cada uno de los sitios se midieron el contenido de ADN, nivel de ploidía, características citogenéticas y germinativas, y la densidad poblacional. Las tres poblaciones presentaron las mismas características citogenéticas: contenido de ADN, nivel de ploidía, número cromosómico, patrón de bandeo y distribución de genes ribosómicos. Las poblaciones resultaron ser diploides ( $2n=22$ ), excepto un individuo de la población a 948 msnm que resultó ser tetraploide. Se halló una disminución gradual en el tamaño de los cromosomas **m** y todas las poblaciones presentaron un único par **sm**. La especie presentó cariotipos simétricos y mostraron heterocromatina constitutiva CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> asociada a regiones organizadoras nucleolares (NORs), que se encontraron siempre en el primer par cromosómico **m**. Los genes ribosomales 18-5,8-26S se localizaron en las regiones terminales del primer par de cromosomas **m**; y el 5S hibridó al lado del 45S en el primer par cromosómico, pero además lo hizo en posición paracentromérica del último par **m**. Respecto a las características ecológicas en la mayoría de los casos se encontraron diferencias entre las poblaciones. El peso de las semillas fue mayor en las alturas extremas y menor en la intermedia. Tanto la germinación total como la velocidad de germinación ( $T_{50}$ ) no presentaron diferencias entre las poblaciones. El tamaño de las plántulas (alto y ancho) fue mayor en las alturas extremas y menor en la intermedia. La población a altitud intermedia presentó la mayor densidad poblacional; la cual disminuye con la altitud. Sin embargo, el tamaño de los individuos fue menor en la altura intermedia y mayor en los extremos. Los resultados de este trabajo indican que las características genéticas tendrían poca relación con la amplitud altitudinal de la especie. Por otro lado, las características

ecológicas sí mostraron diferencias entre las poblaciones, indicando su posible importancia en explicar la distribución altitudinal de la especie.

**Palabras claves:** *G. quehlianum*, gradiente altitudinal, tamaño genómico, nivel de ploidía, peso de semillas, germinación, tamaño de plántulas.

# INTRODUCCIÓN

En ambientes montañosos el gradiente altitudinal es el principal factor que moldea la vegetación. Al aumentar la altitud, disminuye la temperatura del aire y aumenta la irradiación; en referencia a los efectos que producen las precipitaciones es muy variable ya que depende de cada cadena montañosa (Körner, 2007). Estos gradientes son los que determinan los principales pisos de vegetación que se encuentran en las montañas (Cabido *et al.*, 2010). A pesar de esto, especies particulares presentan amplios rangos de distribución a lo largo de estos gradientes (Knight & Ackerly, 2002; Gurvich *et al.*, 2014; Bauk *et al.*, 2015). Tanto variables genéticas como ecológicas pueden variar a lo largo de gradientes altitudinales, lo que puede ayudar a comprender como las especies pueden presentar esas distribuciones (Knight & Ackerly, 2002; Gurvich *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, comprender estos patrones permitirían comprender los efectos del cambio climático sobre las distribuciones geográficas de las especies (Téllez-Valdés, 2003).

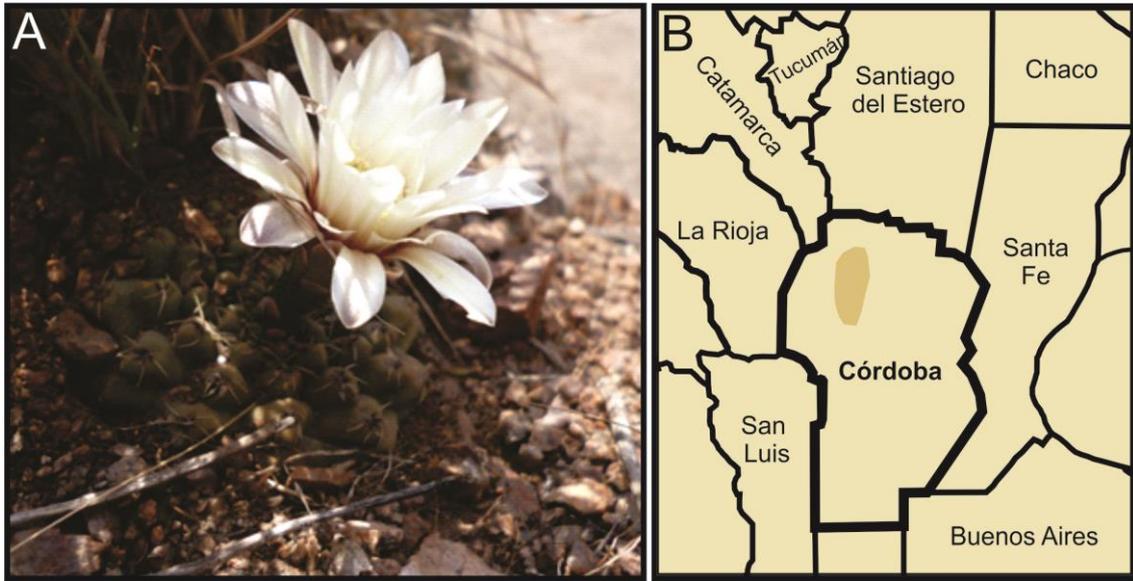
El contenido de ADN es una variable genética importante que se ha relacionado con variables ambientales (Knight & Ackerly, 2002); que medido a través de la técnica de citometría de flujo es útil para la determinación del tamaño del genoma (Ohri, 1998; Bennett *et al.*, 2000). Se ha observado que el contenido de ADN en *Gymnocalycium* puede variar entre 6,2 pg a 7,33 pg (Das & Das, 1998). Knight & Ackerly (2002), analizaron las relaciones entre el contenido de ADN nuclear y variables climáticas en diferentes especies de plantas, encontrando que las especies con bajos valores de ADN son comunes a lo largo de todo el gradiente ambiental, pero que las especies con altos valores son más frecuentes en latitudes y alturas intermedias. Por otro lado, Murray *et al.* (2005) encontraron una relación inversa, es decir, que altos niveles de contenido de ADN fueron encontrados en ambientes extremos. A nivel intraespecífico, se han realizado diversos estudios que investigan la estabilidad del tamaño del genoma, entre poblaciones aisladas geográficamente; en la mayoría de los casos estudiados se encontraron diferencias insignificantes (Baranyi y Greilhuber, 1995; Lysák *et al.*, 2000), al contrario Šmarda & Bureš (2006) estudiando la variabilidad intraespecífica de contenido de ADN y el nivel de ploidía en *Festuca pallens* (Poaceae) a distintas escalas geográficas, encontraron que el contenido de ADN de los tetraploides se correlacionó de forma positiva con la altitud, no ocurriendo lo mismo con los diploides; por lo que se sugiere que el genoma nuclear puede ser más plástico de lo que se creía, en algunos casos.

El nivel de ploidía es una característica importante que puede estar afectando la especiación, pero también se ha visto que puede afectar la ecología de las especies (Grant, 1981; Levin, 2002). El nivel de ploidía es otra variable citogenética que se puede relacionar con la altitud; Morales Nieto *et al.* (2007) caracterizaron a la diversidad de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., mediante su nivel de ploidía, y encontraron que el mismo se relacionó principalmente con la distribución altitudinal y el rango de temperatura. El número básico para la familia es  $x = 11$ , siendo la principal variación existente la poliploidía (Raven, 1975; Ross, 1981; Pinkava & Parfitt, 1982; Pinkava *et al.*, 2002). En Cactaceae hay un solo estudio (*G. monvillei*, Bauk 2014) que analizó como varía el contenido de ADN y el nivel de ploidía en un gradiente altitudinal; pero no encontró diferencias significativas entre las poblaciones. Además en Cactaceae son pocos los estudios de patrones de bandedo y mapeo de genes mediante FISH (Las Peñas *et al.*, 2008, 2009, 2016; Bauk *et al.*, 2016), y existe un solo análisis de los patrones cromosómicos en una especie de Cactaceae (*G. monvillei*, Bauk 2014) en el cual no se hallaron diferencias a lo largo de un gradiente de altitud. Hasta el momento no se conoce el cariotipo, el patrón de bandas ni la posición de los genes ribosomales en *G. quehlianum*.

Diferentes variables, como el peso de las semillas, las características de germinación, el tamaño y forma de las plántulas han sido observados como factores importantes que afectan el crecimiento y establecimiento de las plantas (Bowers & Pierson, 2001; Baloch *et al.*, 2001; Contreras & Valverde, 2002). A pesar de esto, al momento existen pocos estudios que hayan analizado estas variables a lo largo de gradientes altitudinales. Baker (1972) y Murray *et al.* (2003) encontraron que el peso de las semillas disminuye con la altitud. Moles *et al.* (2007) y Murray *et al.* (2003) encontraron que el peso de las semillas es mayor en especies de latitudes altas. A nivel interespecífico, Sosa *et al.* (2014) analizaron la relación entre la masa de las semillas y las características de germinación de 17 especies de cactus; y no encontraron una relación significativa entre la masa de las semillas y las características de germinación consideradas; sin embargo vieron que las semillas más pesadas, producían plántulas de mayor tamaño cilíndrico. A nivel intraespecífico existen pocos estudios que hayan analizado cambios en el tamaño de las semillas a lo largo de gradientes altitudinales. Particularmente en cactáceas, en *G. monvillei* no se encontró una relación entre el tamaño de las semillas y la altitud; pero al analizar cómo afecta la altitud al tamaño de las plántulas (alto y ancho) y la forma (globoso o cilíndrico) observaron que el alto de las plántulas se incrementaba con la altitud, por lo que las plántulas se hacían más globosas

con la disminución de las altitudes; y respecto a la germinación notaron que decrece con la altitud (Bauk *et al.*, 2015, 2016). Gurvich *et al.* (2008) hallaron que *G. quehlianum*, presenta alta tasa de germinación aunque produce pocas semillas por fruto (360 semillas), lo que podría indicar que los bajos niveles de producción de semillas, quizás se compensan con la alta germinación. Estudios en otras especies son necesarios para confirmar los patrones descritos anteriormente. Existen estudios en Cactaceae sobre los cambios en la composición de especies a lo largo de gradientes altitudinales (Guerrero *et al.*, 2011; Gurvich *et al.*, 2014), pero son pocos los estudios que analizan la variación de la abundancia de una especie a lo largo de gradientes. En cactáceas, Bauk (2014) analizando 5 poblaciones de *Gymnocalycium monvillei* en un gradiente altitudinal, describe que la densidad poblacional varía de manera unimodal, presentando un óptimo en una altura intermedia del gradiente estudiado, por lo que se cree que la altitud juega un papel en la estructuración de las poblaciones.

*Gymnocalycium* comprende unas 50 especies, la mayor parte de ellas endémicas de regiones geográficas restringidas (Charles, 2009; Metzger, 2012). En Argentina es el género de la familia con mayor número de especies (41), representando el 18% de la riqueza total de Cactaceae (Kiesling *et al.*, 2008). Actualmente al género se lo divide en subgéneros de acuerdo a la clasificación establecida por Schütz (1986) basado en las características de la semilla, la anatomía floral y del fruto. *G. quehlianum* (subgénero *Trichomosemineum*) es endémico de la Provincia de Córdoba y se distribuye a lo largo de la Sierra Chica hasta la Sierra Norte (Fig. 1B). Es abundante en ambientes serranos entre 500 y 1200 msnm (Charles, 2009; Gurvich *et al.*, 2014). Se caracteriza por tener tallos cónicos enterrados, mayormente morados o verde grisáceos. Con aproximadamente 11 costillas, formadas por 4 a 6 tubérculos redondeados que llevan una giba notable, aguda, que se proyecta hacia abajo, presenta cinco espinas radiales generalmente arqueadas sobre la giba. Flores blancas con garganta rojiza (Fig. 1A) y los frutos subcilíndricos de 2 a 3 cm (Kiesling *et al.*, 2009).



**Figura 1.A.** Planta de *Gymnocalycium quehlianum*. **B.** Área de distribución de la especie.

La importancia de este estudio se basa en la integración de aspectos ecológicos y genéticos en *G. quehlianum* a lo largo de un gradiente altitudinal. Se conoce que la especie ocupa nichos ecológicos estrechos respecto a otras especies de cactus (Gurvich *et al.*, 2006) pero no se conoce como varía su abundancia a lo largo del mismo; respecto a la diversidad de cactus globosos de las Sierras Chicas de Córdoba (1200 msnm) se encontró que la abundancia de *G. quehlianum* es de 0,17 individuos/m<sup>2</sup> (Gurvich *et al.*, 2006). *G. quehlianum* es diploide ( $2n= 22$ ) y el contenido de ADN es de  $2C= 6,46$  pg (Das & Das, 1998). Teniendo en cuenta que solo existe un estudio en Cactaceae que relacionen estas variables con gradientes altitudinales, es que en esta tesina se pretende analizar características genéticas y ecológicas a lo largo de un gradiente en las Sierras Chicas de Córdoba.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Analizar como varían características genéticas y ecológicas en *Gymnocalycium quehlianum* a lo largo de un gradiente altitudinal e identificar si existe relación entre estas características y la altitud.

## Objetivos específicos

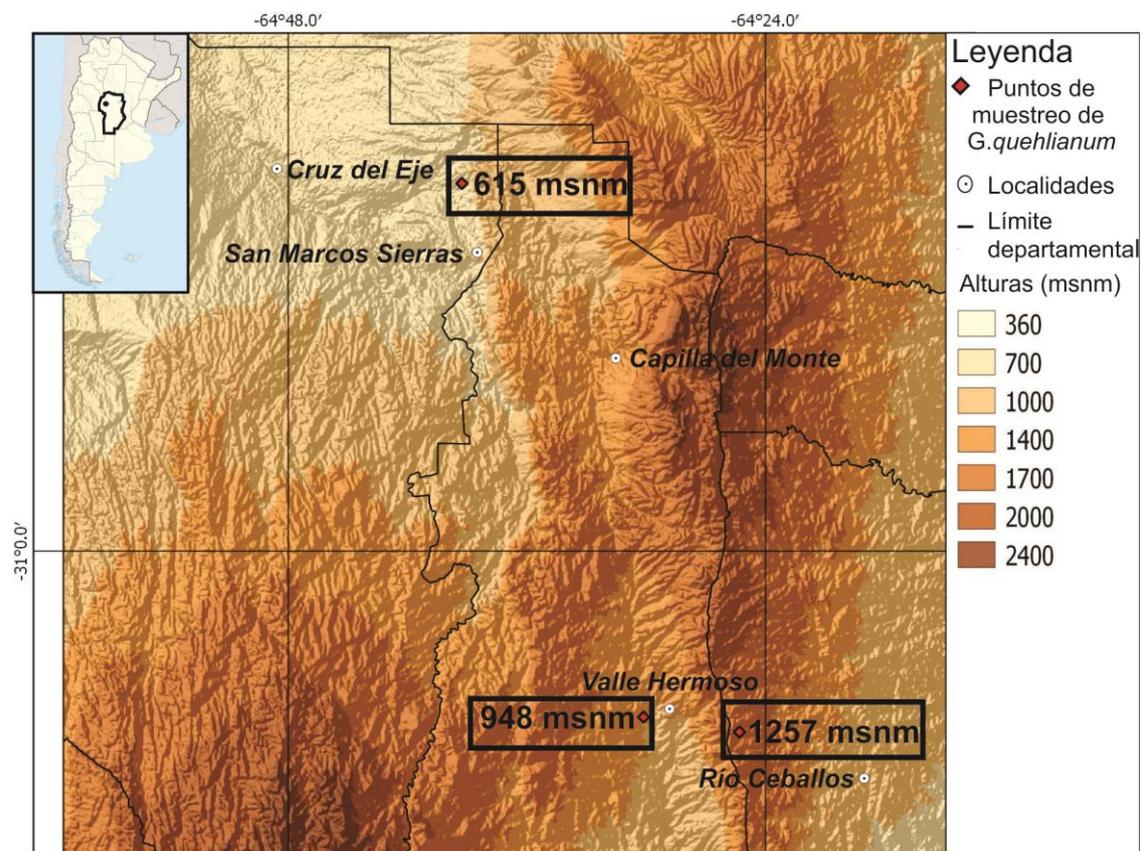
Determinar en tres poblaciones de *G. quehlianum* que se encuentran a distintas altitudes:

- ❖ El contenido de ADN.
- ❖ El número cromosómico, el cariotipo, la heterocromatina y localizar los genes ribosomales.
- ❖ El peso de las semillas, porcentaje y velocidad de germinación, tamaño y forma de las plántulas.
- ❖ Densidad poblacional.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Área de estudio

El estudio se realizó en tres poblaciones de *G. quehlianum* en un gradiente altitudinal que comprende desde la Ruta Provincial E-57 o popularmente conocida como Camino del Cuadrado que une Valle Hermoso con Río Ceballos (altitud: 1250 msnm; coordenadas: 31° 7'51"S 64°25'07"O) hasta San Marcos Sierras (altitud: 615 msnm; 30°44'00.8"S 64°34'16.0"). Esta diferencia en altitud implica importantes cambios en la temperatura y precipitación media anual, siendo respectivamente de 18,7°C y 480 mm en las zonas más bajas, 14°C y 850 mm en el límite superior (De Fina, 1992). A lo largo del gradiente se seleccionaron 3 poblaciones ubicadas a 615, 948 y 1257 msnm (Fig. 2); en cada uno de los cuales se seleccionaron afloramientos rocosos donde se encuentra la especie. Se recolectaron plantas y frutos de cada población para ser utilizados según corresponda a cada análisis.



**Figura 2.** Sitios de muestreo a diferentes altitudes de *Gymnocalycium quehlianum*. San Marcos Sierras (615 msnm), Valle Hermoso (948 msnm) y Camino del Cuadrado (1257 msnm).

## **Contenido de ADN (Cx) estimado por citometría de flujo**

Para calcular el contenido de ADN nuclear se utilizó la técnica de citometría de flujo. Por cada medición de cada población, se usaron de 5 a 7 plántulas de alrededor de 45 días que fueron logradas a partir de semillas obtenidas a campo en cada uno de los sitios ya descritos. El contenido de ADN se midió a partir de una suspensión de núcleos de acuerdo con Doležel *et al.* (2007). Los trozos de plántulas de la muestra se cortaron con bisturí en una placa de Petri de vidrio conteniendo 0,4 ml de solución de Otto I (ácido cítrico 0,1 M + 0,5% de Tween 20) y 0,2 ml de 1% de PVP (PVP 10). La suspensión de núcleos fue filtrada a través de una membrana de malla de nylon y fueron incubados en hielo durante 60 minutos. Se centrifugaron durante diez minutos a 4500 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 0,1 ml de Otto I y se lo incubó en hielo otros diez minutos. Después se incluyeron 0,5 ml de buffer Otto II (0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Luego se añadió yoduro de propidio (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y ARNasa (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 10 minutos y fueron analizadas en citómetro Bd Accuri™ C6 en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Córdoba). Se llevaron a cabo tres estimaciones de ADN para cada población (5.000 núcleos por análisis) en dos días diferentes. Se utilizaron como testigos *Solanum lycopersicon* con un valor de 1.96 pg para 2C y *Glycine max* con 2,50 pg. El contenido de ADN nuclear 2C en pg, se calculó como pico promedio de la muestra/pico promedio estándar. Valores de cx, que representan el contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado con el número de cromosomas x, se calculó como la cantidad de ADN nuclear 2C dividido por el nivel de ploidía.

## **Citogenética: técnica convencional, Bando y FISH**

### **➤ Preparados cromosómicos**

Para la obtención de preparados cromosómicos se utilizaron raíces de al menos dos individuos adultos, previamente pre tratadas con 8-Hidroxiquinoleína 2 mM durante 6 a 8 horas en estufa a 14 °C y 16-18 hs en heladera, luego fueron fijadas con la mezcla Farmer (3:1; alcohol etílico: ácido acético glacial) y conservadas en freezer hasta su uso. Las preparaciones cromosómicas, se llevaron a cabo mediante digestión enzimática con Pectinex a 37 °C durante 60 minutos. Luego se aplastaron los meristemas con ácido

acético 45%. Posteriormente, se congelaron con aire líquido y se procedió a la remoción del cubreobjetos. Los preparados fueron conservados en freezer para utilizarlos en las diferentes técnicas citogenéticas.

➤ **Coloración convencional**

Se utilizó la técnica de HCl/Giemsa según Guerra (1983) coloreando los preparados con una solución de Giemsa al 2% preparada en el momento, y se montaron con Entellan.

➤ **Bandeo cromosómico fluorescente CMA/DAPI**

El bandeo cromosómico fluorescente se realizó según la técnica descrita por Schwarzacher *et al.* (1980) y Schweizer (1994), con algunas modificaciones (Las Peñas *et al.*, 2008). Los preparados fueron teñidos con Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) por 90 minutos incubados en cámara húmeda a temperatura ambiente en oscuridad, lavados con agua destilada por un período de 10 minutos y posteriormente coloreados con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 30 minutos mantenidos en cámara húmeda. Luego se remueve el cubreobjetos y se lava con agua destilada nuevamente durante 10 minutos y finalmente fueron montados con Buffer MacIlvaine: glicerol (1:1). Los preparados fueron conservados en heladera en oscuridad.

➤ **Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**

Para las hibridaciones *in situ* se siguió el protocolo de Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000), con pequeñas modificaciones. Como sondas se utilizaron regiones de ADN altamente repetitivo, como ADN ribosómico 18-5,8-26S (pTa71) (Gerlach & Bedbrook, 1979) y 5S (fragmento obtenido a partir genoma de *P. aculeata* según Las Peñas *et al.*, 2011). Los fragmentos fueron marcados con digoxigenina-11-dUTP o biotina-16-dUTP (Roche) mediante la técnica de nicktranslation (Nick Translation Kit, Roche). Las señales de hibridación se detectaron utilizando Avidina-FITC (Sigma) y anti-DIG-Rodamina (Roche) y los cromosomas coloreados con DAPI.

➤ **Confeción de los cariotipos y localización de bandas de heterocromatina y genes ribosomales**

Las placas metafásicas se observaron con microscopio Olympus BX61 software Cytovision<sup>®</sup> (Leica Biosystems) y cámara JAI<sup>®</sup> modelo CV-M4+ CL monocromática; este instrumental se utilizó con los filtros correspondientes para todas las técnicas realizadas.

Los idiogramas correspondientes a cada punto de muestreo se realizaron con la mediciones obtenidas del programa ImageJ (NIH ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, desarrollado por: National Institutes of Health, disponible en el sitio <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y organizando los cromosomas en grupos de acuerdo a su índice braquial (r) e índice centromérico (i) siguiendo la terminología de Levan *et al.* (1964):

$$r = l/s$$

$$i = 100 s/c$$

Dónde: **l** = longitud del brazo largo.

**s** = longitud del brazo corto.

**c** = largo total del cromosoma.

Según su índice braquial, los cromosomas fueron ubicados dentro de las siguientes categorías:

**Metacéntricos (m)** r = 1-1,69

**Submetacéntricos (sm)** r = 1,7-3

Los cromosomas fueron ordenados de forma decreciente según su longitud dentro de las categorías anteriormente mencionadas. Se calculó el largo total del genoma haploide “**Lt**”, sumando la medida del largo total de cada par cromosómico, el largo cromosómico promedio “**C**”, y la razón entre el cromosoma más largo y el más corto “**R**”. Finalmente, se realizaron los idiogramas de cada población, utilizando los valores promedios de cada par cromosómico.

Las bandas heterocromáticas obtenidas con bandeo de fluorescencia y las señales de ADN<sub>r</sub> fueron contadas en 2-5 placas metafásicas correspondientes a 2-4 individuos de la especie. En cada placa se efectuaron mediciones en los cromosomas referidas a la longitud del brazo corto, brazo largo y largo total, calculándose en cada caso la media y el desvío estándar, datos con los que se construyeron los idiogramas respectivos. La construcción de los idiogramas se realizó con el programa Corel Draw 7X.

La asimetría de los cariotipos fue estimada usando los índices de asimetría intracromosómica “**A<sub>1</sub>**” e intercromosómica “**A<sub>2</sub>**” propuestos por Romero Zarco (1986): **A<sub>1</sub>** y **A<sub>2</sub>** varían entre 0 y 1. Cuando **A<sub>1</sub>** tiende a cero indica que los cromosomas son metacéntricos, y cuando **A<sub>2</sub>** es próximo a cero, indica que los cromosomas tienen una longitud total similar.

## **Caracteres ecológicos**

### ➤ **Peso de las semillas**

Se recolectaron a campo frutos maduros de al menos 11 individuos en cada población. Las semillas fueron removidas de los frutos, limpiadas y se dejaron secar a temperatura ambiente. A partir de las semillas se tomaron al azar 10 submuestras de 5 semillas que fueron pesadas en una balanza analítica. Se calculó el valor medio de peso de las muestras de cada altura, para obtener el valor individual por semillas. A partir de este mismo pool de semillas se realizaron los experimentos de germinación, mediciones del tamaño y forma de las plántulas.

### ➤ **Experimentos de germinación**

Se realizó un experimento de germinación donde se utilizaron 3 cajas de Petri (réplicas) de 5,5 cm de diámetro con papel filtro estéril humedecido con 10 ml de agua destilada. En cada caja de Petri se colocaron 20 semillas, que fueron mantenidas en una cámara de germinación a 15/25°C. Se registró la germinación cada 48 hs durante 30 días, siendo la protrusión de la radícula el indicador de que la semilla germino. A partir de esta información se calculó el número y porcentaje de germinación de acuerdo a Dubrovsky (1998); y la velocidad de germinación, el  $t_{50}$ , el cual expresa el tiempo de germinación del 50% de las semillas incubadas.

### ➤ **Tamaño y forma de las plántulas**

Estas mediciones se realizaron utilizando las plántulas germinadas en el experimento anteriormente descrito; se utilizaron siete plántulas con 35 días de germinadas por altitud. Las mismas fueron medidas siguiendo el procedimiento previsto en Sosa Pivatto *et al.* (2014). A través de fotografías digitales a cada plántula se le midió el alto y ancho (mm), utilizando el ImageJ 1.43u. Con la obtención de estos datos se calculó un índice de forma (relación alto/ancho), donde un valor de 1 indica que la plántula tiene una forma esférica, mientras que valores mayores indican una forma columnar y valores menores una forma aplastada (Sosa Pivatto *et al.*, 2014).

### **Tamaño poblacional**

En cada una de las poblaciones se ubicaron al azar 30 parcelas de 1m<sup>2</sup>. En cada una de ellas, se tomaron registros de características del suelo y vegetación; donde también se midió el diámetro de cada *Gymnocalycium quehlianum* presente.

## **Análisis de datos**

Para el análisis de todas las variables medidas, tanto genéticas como ecológicas se utilizó el análisis de varianza o su equivalente no paramétrico Kruskal Wallis, seguido de un análisis de comparación de medias (Tukey,  $P < 0,05$ ).

Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 1999)

# RESULTADOS

## Contenido de ADN y análisis citogenéticos

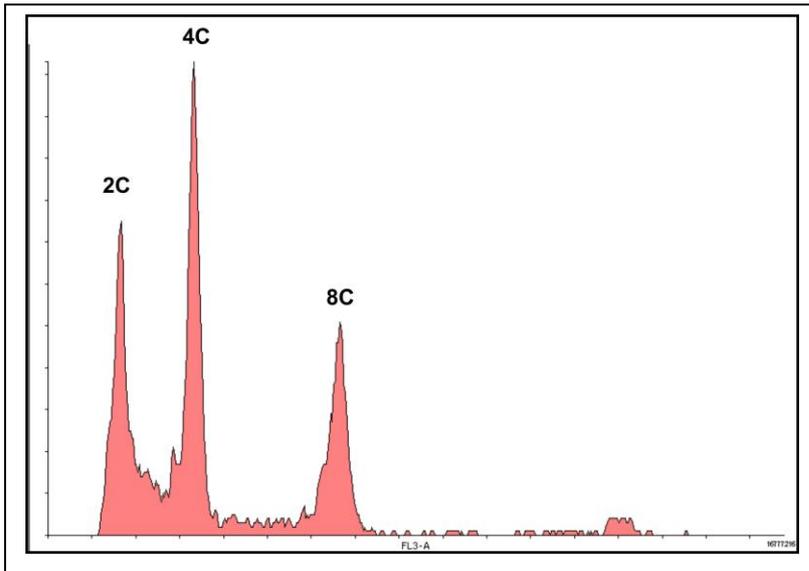
### ➤ Contenido de ADN (2C) estimado por citometría de flujo

En el análisis del contenido de ADN nuclear en *G. quehlianum* se observan en todas las poblaciones analizadas, tres picos donde la mayoría de los núcleos están en fase G<sub>2</sub> (contenido de ADN 4C, Fig. 3). En el histograma observamos para 2C los núcleos en fase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> y para 8C los núcleos se encuentran endoreduplicados (Fig. 3). Se sugiere un proceso de endopoliploidía que se presenta en todas las poblaciones analizadas, al observar la presencia de los tres picos.

El contenido de ADN 2C (Tabla 1) varió de 3,55 pg a 4,30 pg, pero no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,1109$ ) entre las poblaciones. Sin embargo, existió una tendencia en la cual los mayores valores de contenido de ADN están en altitudes bajas y disminuyen con el gradiente altitudinal. Se hallaron valores desde 7,23 a 9,12 pg para 4C desde 1257 msnm a 615 msnm, respectivamente. Y en el caso de 8C se obtuvieron valores desde 14,68 a 17,52 pg.

**Tabla 1.** Valores promedio estimados de ADN nuclear de *G. quehlianum* para las tres alturas.

Alturas	2C (pg)	4C (pg)	8C (pg)
615 msnm	4,30	9,12	17,52
948 msnm	3,89	7,77	15,43
1257 msnm	3,55	7,23	14,68



**Figura 3.** Histograma del contenido de ADN nuclear de la población de San Marcos Sierras (615 msnm), los picos representan los valores de 2C, 4C Y 8C. Los testigos internos no fueron incluidos en la figura.

Las tres poblaciones presentaron las mismas características citogenéticas: contenido de ADN, nivel de ploidía y número cromosómico. Se encontró que todas las poblaciones analizadas presentaron un número cromosómico somático de  $2n=22$  (Tabla 2; Fig. 4; anexo). Sin embargo, un individuo de la población de Valle Hermoso (948 msnm), resultó tetraploide con  $2n=44$ . En los cromosomas **m** se pudo observar una disminución gradual en el tamaño de los mismos en todas las alturas estudiadas. Además, en las tres poblaciones se encontró un único par **sm** (Fig. 7). Los datos obtenidos arrojaron que la longitud cromosómica promedio “C” es  $2,98 \mu\text{m}$  y la longitud de mayor valor “c” ( $4,08 \mu\text{m}$ ) fue encontrada en el par 1 del sitio a 1257 msnm y la de menor valor ( $2,27 \mu\text{m}$ ) en el par 10 del sitio a 948 msnm. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cromosomas en cuanto a “C” ( $p=0,0120$ ), presentando a los 615 msnm a los cromosomas más cortos con una media de  $2,64 \mu\text{m}$  y con un promedio de  $3,15 \mu\text{m}$  a los 948 msnm y a los 1257, entre los cuales no se encontraron diferencias significativas. La longitud del genoma haploide “Lt” varió entre  $29,02 \mu\text{m}$  y  $34,65 \mu\text{m}$ , siendo  $32,77 \mu\text{m}$  su promedio. La relación entre el par cromosómico de mayor y de menor tamaño “R” de las poblaciones analizadas varió en un rango de 1,58 a los 615 msnm y 1,82 a los 948 msnm. La especie cuenta con cariotipos simétricos en todos los sitios, lo cual se ve reflejado en los índices de asimetría calculados (Romero Zarco, 1986), que arrojaron un rango de  $A_1 + A_2 = 0,32-0,36$  para el sitio a 615 msnm y el sitio a 948 msnm respectivamente. Los valores de asimetría intracromosómica ( $A_1$ ) variaron entre 0,19 para el sitio ubicado a 615 msnm y 0,20 para el sitio ubicado a 948 msnm. Por otro lado, el

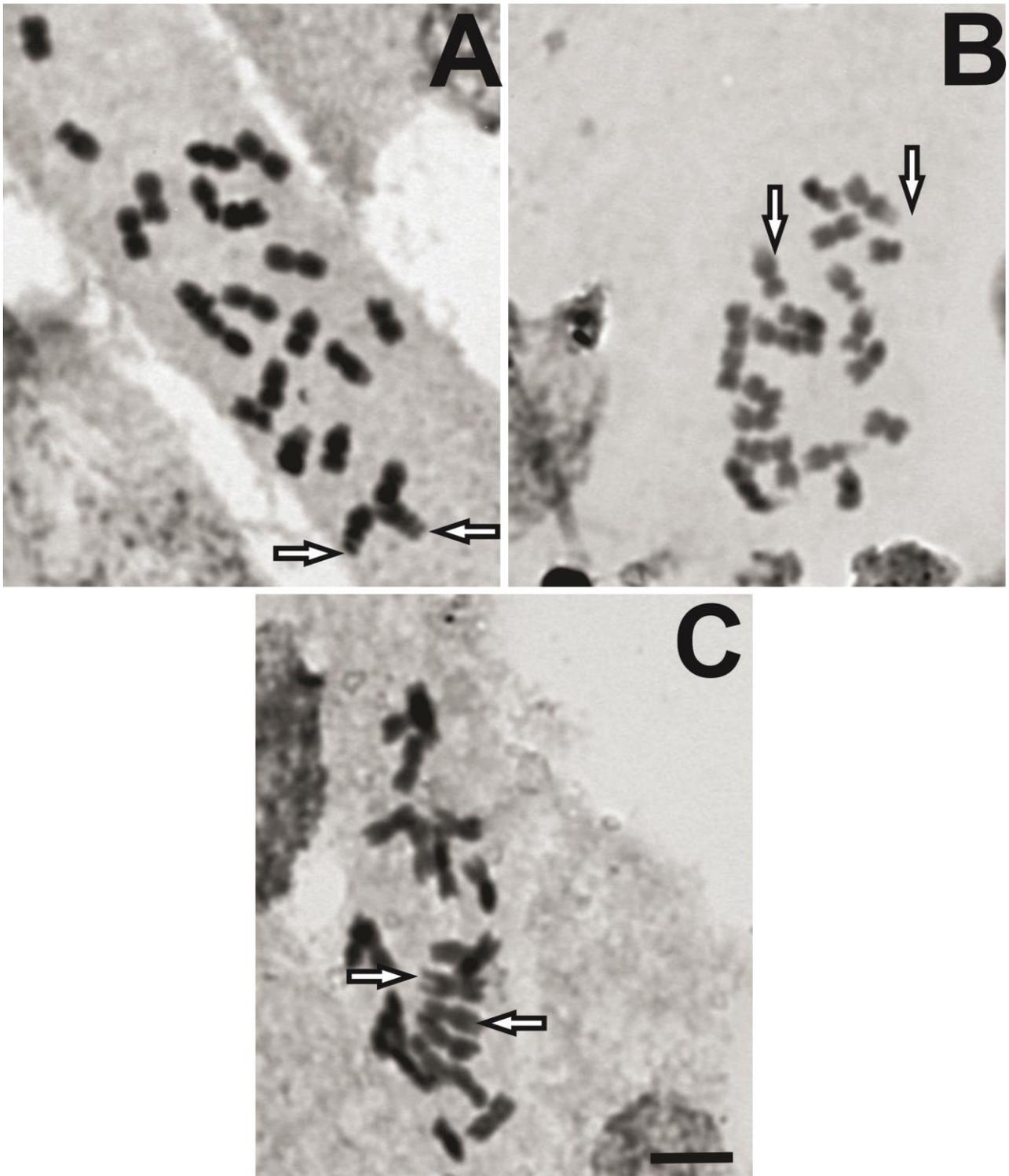
índice de asimetría intercromosómica ( $A_2$ ) osciló entre 0,13 para el sitio ubicado a 615 msnm, 0,16 para el sitio ubicado a 948 msnm y 0,14 para el sitio ubicado a 1257 msnm; reflejando el tamaño similar entre los cromosomas de estos complementos.

Con la técnica de bandeo cromosómico fluorescente, las tres poblaciones presentaron un par cromosómico con bandas de heterocromatina constitutiva CMA<sup>+</sup>/DAPI asociada a regiones organizadoras nucleolares (NORs) ricas en pares de nucleótidos GC. Estas regiones se encontraron en el primer par de cromosomas **m**, con ubicación en la constricción secundaria y parte del brazo portador de la NOR. No se detectaron en las poblaciones analizadas heterocromatina rica en pares de bases AT (Fig. 5).

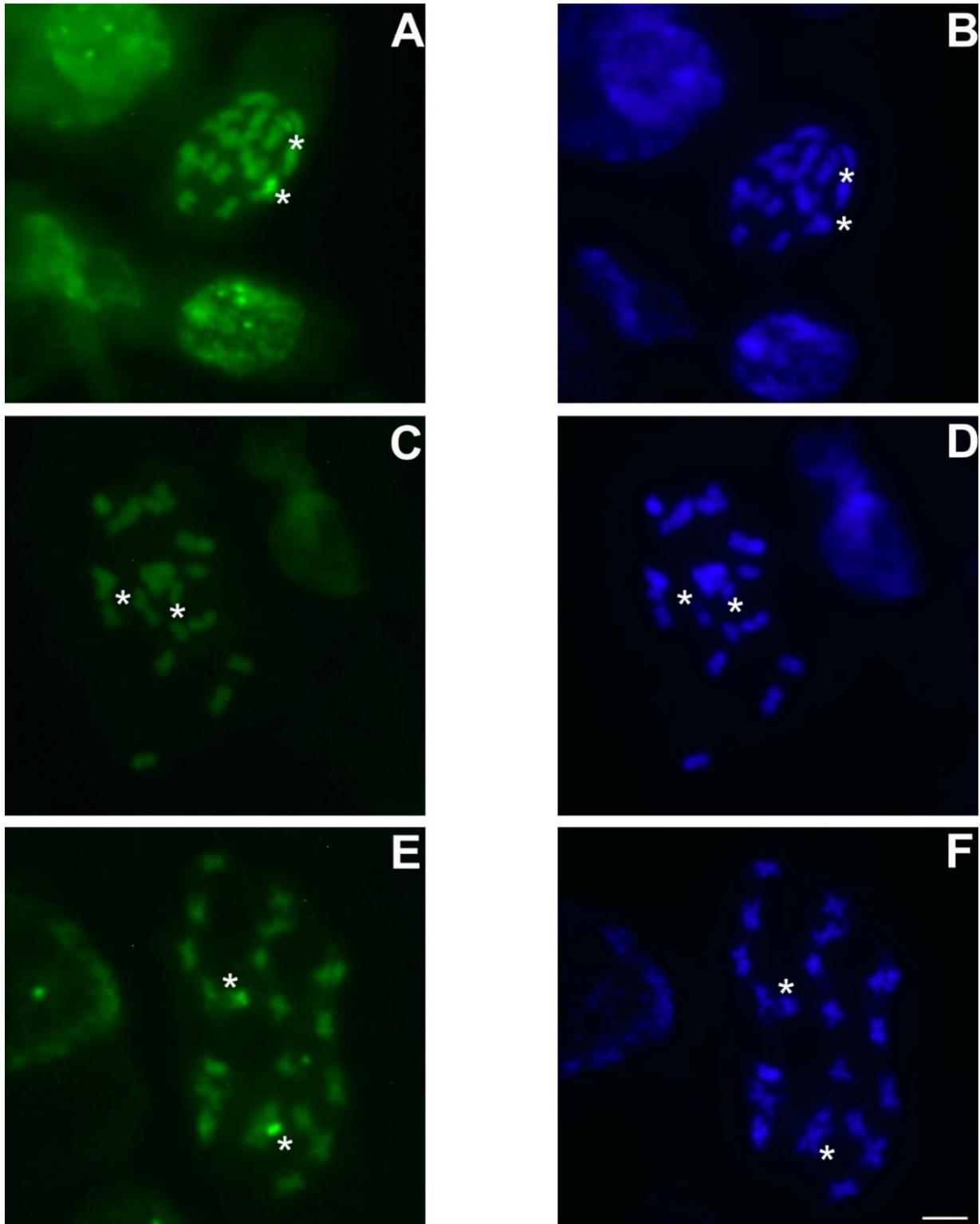
Por otra parte la técnica de FISH mostró que los genes ribosomales 18-5,8-26S se localizaron en las regiones terminales del primer par de cromosomas **m**. En todas las poblaciones se observó un par de señales asociadas al brazo portador de la constricción secundaria de cada miembro del par (Fig. 6), se observó que la distribución de los genes ribosómicos fue consistente con el patrón de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI (NORs). El locus 5S se localizó en dos pares de cromosomas, hibridó por un lado en el primer par de cromosomas **m** al lado del 18-5,8-26S y por otro lado en el último par **m**, en posición paracentromérica (Fig. 6 y 7). Ambos genes (18-5,8-26S y 5S) fueron detectados con tamaños similares en los pares, siendo por lo tanto homomórficos.

**Tabla 2.** Características cariotípicas de *G. quehlianum* en las tres poblaciones: números cromosómicos (2n), fórmula cariotípica (FC),\* indica primer par con constricción secundaria, presencia de pares cromosómicos con satélites (CMA/DAPI-NORs), largo total del genoma haploide (Lt), largo cromosómico promedio (C), relación entre el par cromosómico de mayor y menor tamaño (R), índice de asimetría intracromosómico (A<sub>1</sub>) e intercromosómico (A<sub>2</sub>). Lt y C están expresados en  $\mu\text{m}$ .

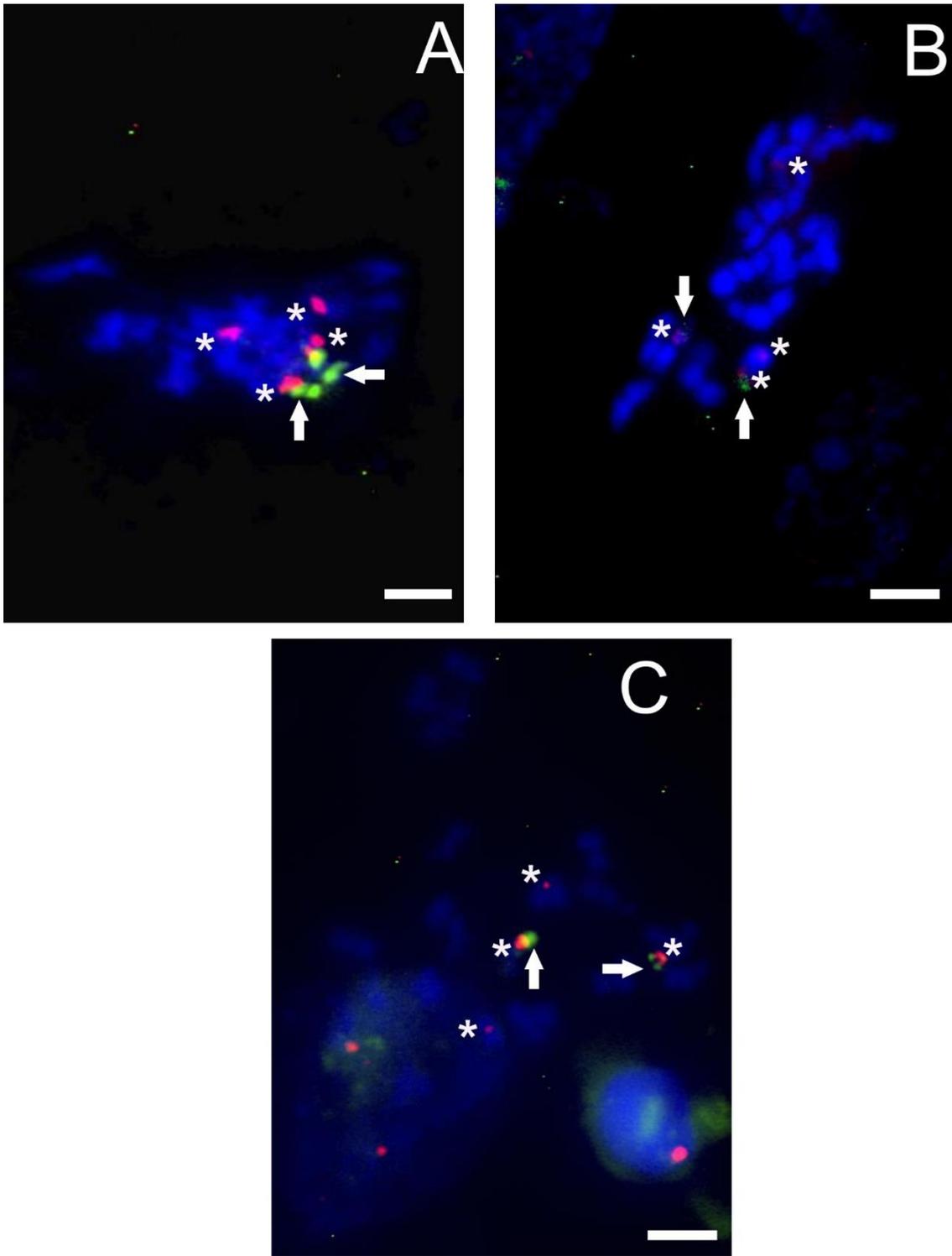
<b>Población</b>	<b>2n</b>	<b>FC</b>	<b>NORs</b>	<b>Lt</b>	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2</sub></b>
San Marcos Sierras (615 msnm)	22	10 <b>m*</b> +1 <b>sm</b>	2	29,02	2,64	1,58	0,19	0,13
Valle Hermoso (948 msnm)	22	10 <b>m*</b> +1 <b>sm</b>	2	34,65	3,15	1,82	0,2	0,16
Camino del Cuadrado (1257 msnm)	22	10 <b>m*</b> +1 <b>sm</b>	2	34,65	3,15	1,60	0,19	0,14



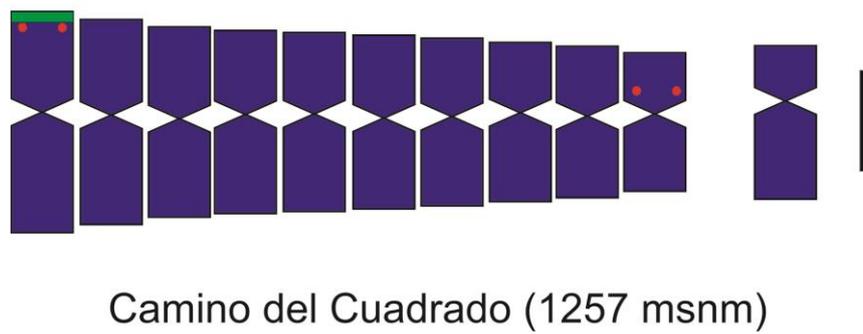
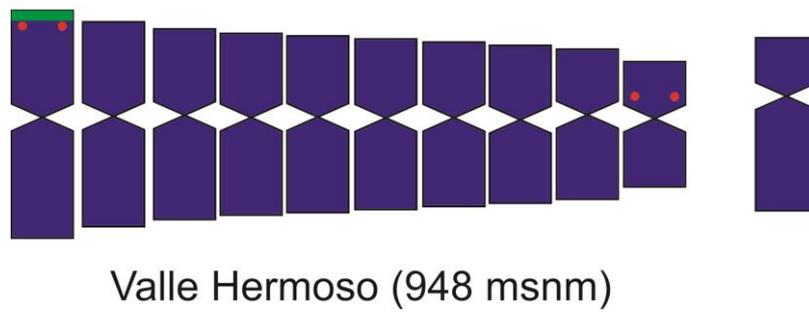
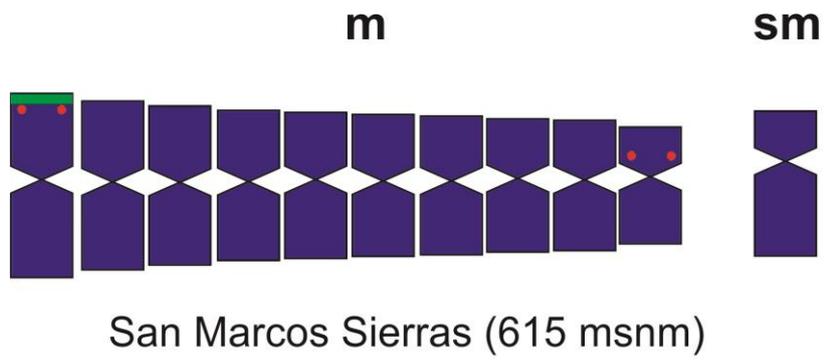
**Figura 4.** Fotomicrográficas de cromosomas mitóticos de *G. quehlianum*, teñidos con Giemsa. **A:** San Marcos Sierras (615 msnm); **B:** Valle Hermoso (948 msnm); **C:** Camino del Cuadrado (1257 msnm). Las flechas indican la presencia de satélites. La escala representa 5  $\mu$ m.



**Figura 5.** Cromosomas metafásicos de *G. quehlianum* teñidos con CMA/DAPI. **A y B:** San Marcos Sierras (615 msnm); **C y D** Valle Hermoso (948 msnm); **E y F** Camino del Cuadrado (1257 msnm). **A, C, E** CMA; **B, D, F** DAPI. Los asteriscos señalan la heterocromatina CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> asociada a NORs. La escala representa 5  $\mu$ m.



**Figura 6.** Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en cromosomas metafásicos de *G.quehlianum*. **A:** San Marcos Sierras (615 msnm); **B:** Valle Hermoso (948 msnm); **C:** Camino del Cuadrado (1257 msnm). Las flechas indican la señal de hibridación para la sonda ADNr 18-5,8-26S (verde) y los asteriscos indican la señal de hibridación para la región ADNr 5S (rojo). La escala representa 5  $\mu$ m.

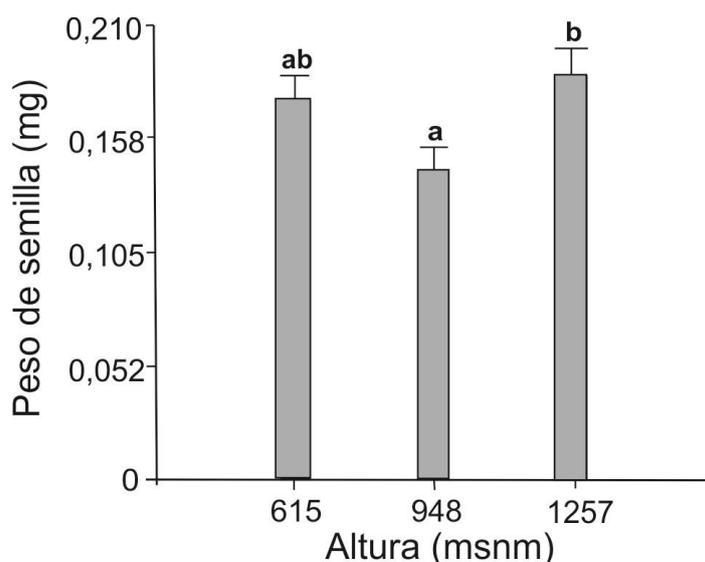


**Figura 7.** Idiogramas de *G. quehlianum* de cada población. Los bloques verdes indican las regiones de ADNr 18-5,826S (45S) y bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI asociadas a NORs. Los círculos rojos representan al locus 5S. La escala representa 2  $\mu$ m.

## Características ecológicas

### ➤ Peso de las semillas

Se encontraron diferencias significativas ( $p=0,033$ ) en el peso de las semillas, siendo las de la población intermedia, Valle Hermoso, las que presentaron semillas más livianas (0,144 mg) mientras que las semillas de las otras poblaciones fueron más pesadas (0,187 mg la población del Camino del Cuadrado; Fig. 8).

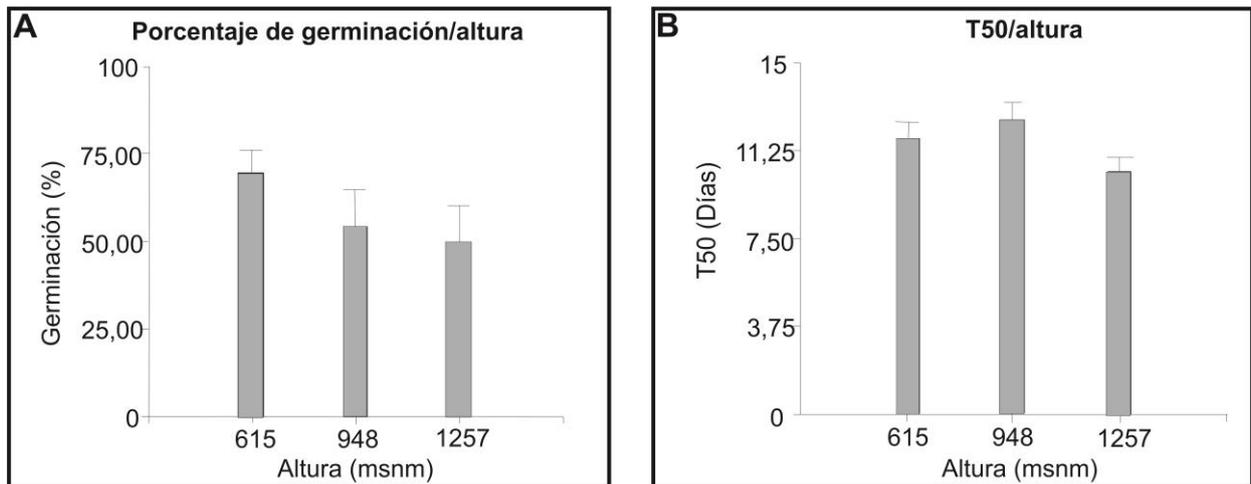


**Figura 8.** Peso de las semillas de *G. quehlianum* en las tres poblaciones analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las poblaciones.

### ➤ Germinación

La germinación total varió entre 49,67% a 1257 msnm y 69,64% a 615 msnm. Pero no se hallaron diferencias significativas ( $p=0,298$ ) entre las alturas. Sin embargo, existe una tendencia donde el porcentaje de germinación disminuye con la altitud (Fig. 9A).

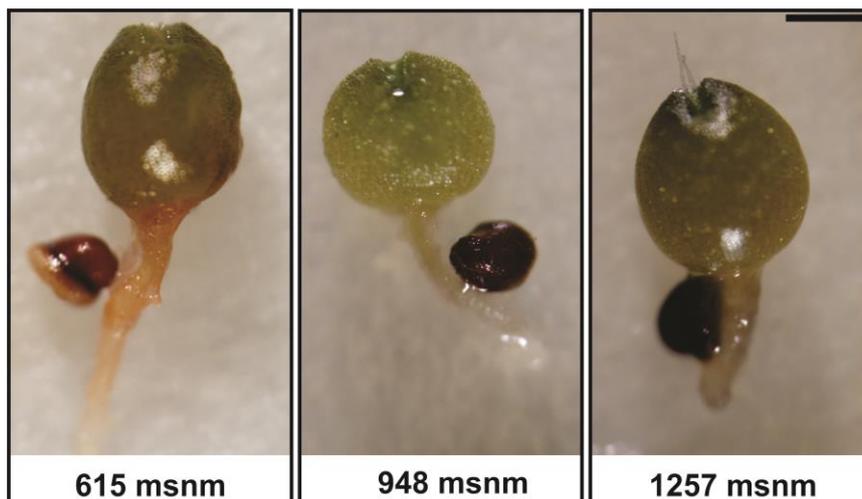
La velocidad de germinación ( $T_{50}$ ) varió entre 10 y 12 días, pero no se hallaron diferencias significativas entre las alturas consideradas ( $p=0,145$ ; Fig. 9B).



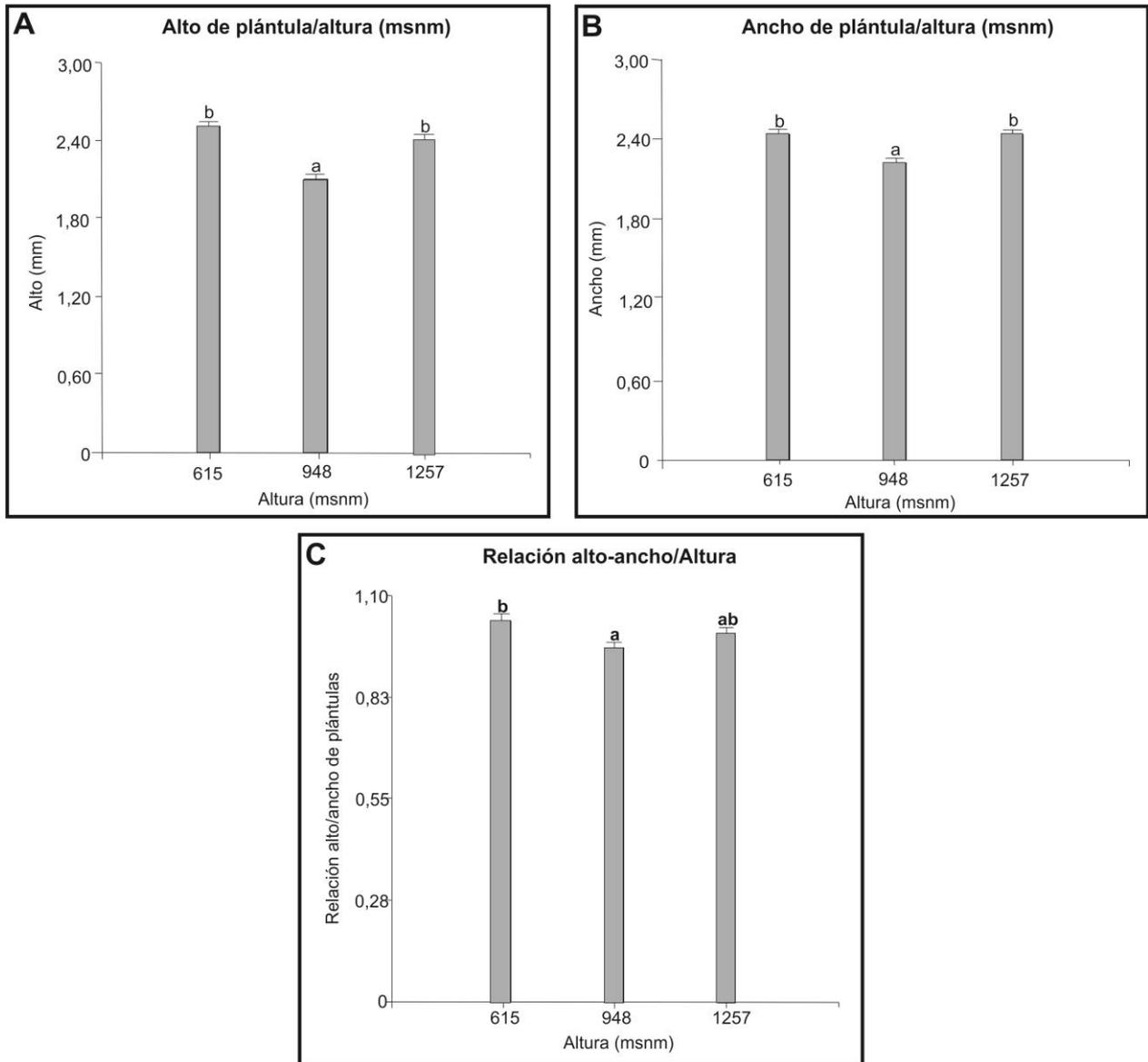
**Figura 9.** **A.** Porcentaje de germinación final de *G. quehlianum* en las tres poblaciones. **B.** Índice T<sub>50</sub> de *G. quehlianum*. En ninguno de los dos análisis se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las poblaciones.

### ➤ Tamaño de las plántulas

El alto, ancho y forma (índice de esfericidad) de las plántulas variaron significativamente entre las poblaciones ( $p < 0,05$ ). En las tres variables el patrón fue similar: menor valor en la población en altura intermedia y mayores en las extremas (Fig. 11). Las poblaciones extremas presentaron plántulas más altas, anchas, y con forma más columnar que las plántulas de la población intermedia que son más redondeadas. En la Fig. 10 se observan plántulas típicas de cada población.



**Figura 10.** Fotografías de plántulas típicas de 35 días de *G. quehlianum*. La escala representa 1 mm.

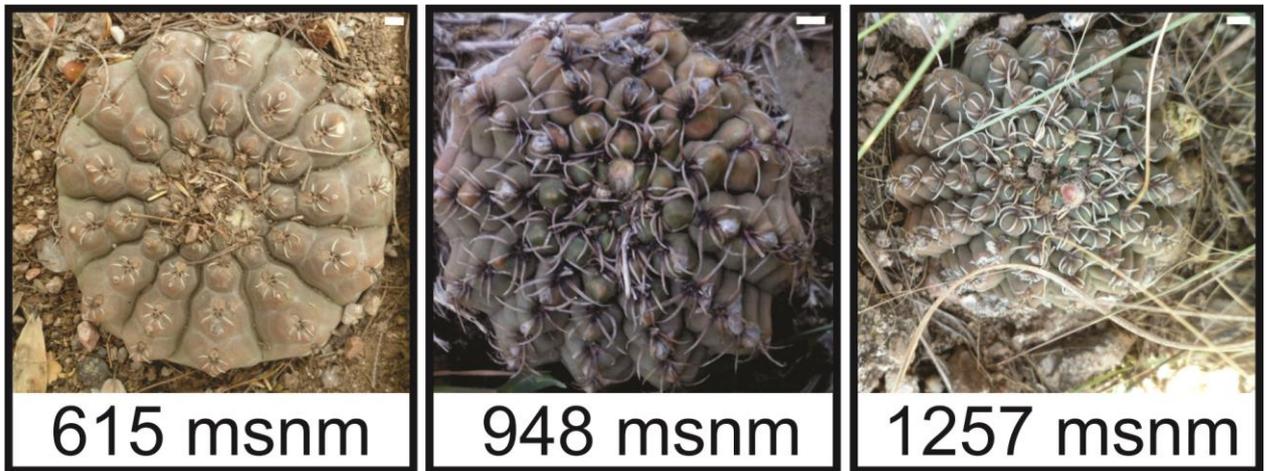


**Figura 11.** **A.** Alto de plántulas de *G. quehlianum*. **B.** Ancho de plántulas de *G. quehlianum*. **C.** Relación alto/ancho de las plántulas de *G. quehlianum*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las poblaciones.

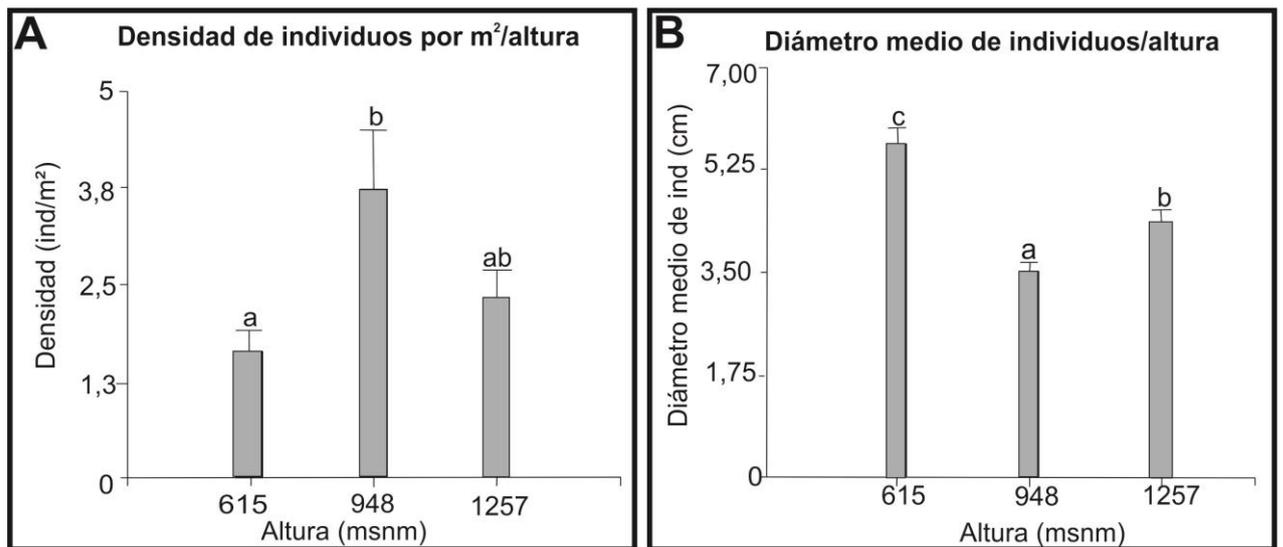
### ➤ **Tamaño poblacional**

En total se registraron 49, 112 y 70 individuos en los sitios 615, 948 y 1257 msnm respectivamente. En la Figura 12 se muestran individuos típicos de cada población. La densidad de individuos varió significativamente ( $p = 0,027$ ) entre las alturas, siendo mayor a 948 msnm (3,7 individuos/m<sup>2</sup>) y menor a los 615 msnm y a los 1257 msnm, con una media de 1,6 y de 2,3 individuos/m<sup>2</sup> respectivamente (Fig. 13A).

El tamaño medio de los individuos también varió significativamente entre las alturas (Fig. 13B;  $p \leq 0,05$ ), siendo mayor a 615 msnm (5,69 cm), intermedio a 1257 msnm (4,35 cm) y menor a 948 msnm (3,52 cm).

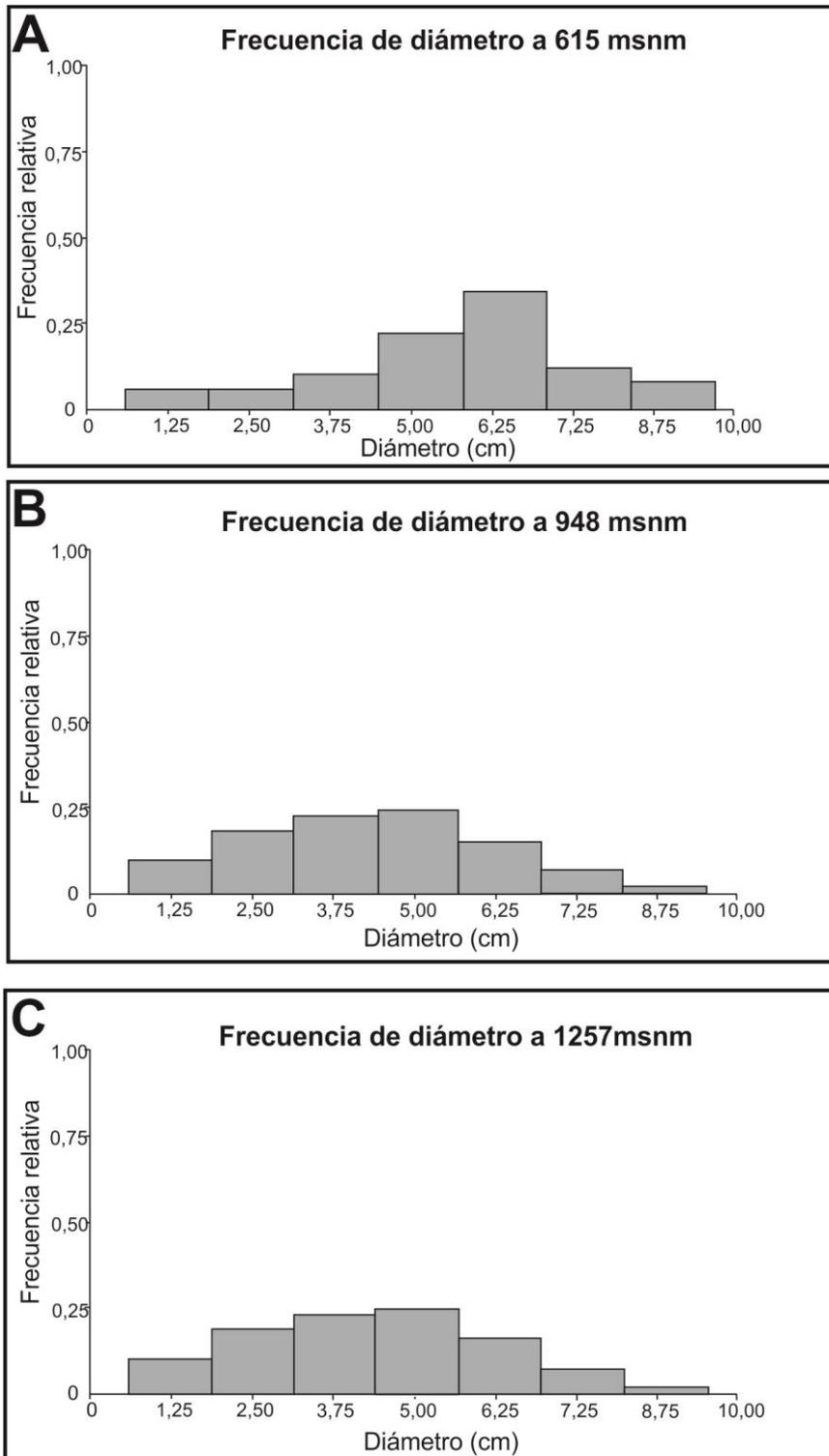


**Figura 12.** Fotografías de plantas típicas de *G. quehlianum*. La escala representa 5 mm.



**Figura 13. A.** Número de individuos de *G. quehlianum* por m<sup>2</sup> por poblaciones. **B.** Diámetro de los individuos de *G. quehlianum* según las alturas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las poblaciones.

Las estructuras de las diferentes clases de tamaños variaron entre las altitudes. En la población a menor altura, la distribución de tamaños estaba mayormente sesgada hacia individuos de mayor tamaño con respecto a las otras dos poblaciones, donde las clases de tamaño más pequeñas son las que presentaron mayor número de individuos (Fig. 14).



**Figura 14.** **A.** Frecuencia de diámetro de individuos de *G. quehlianum* en San Marcos Sierras (615 msnm). **B.** Frecuencia de diámetro de individuos de *G. quehlianum* en Valle Hermoso (948 msnm). **C.** Frecuencia de diámetro de individuos de *G. quehlianum* en Camino del Cuadrado (1257 msnm).

# DISCUSIÓN

## Características genéticas

A pesar de que características genéticas de las plantas, como el contenido de ADN y el nivel de ploidía se han relacionado con características ecológicas, como por ejemplo la distribución a lo largo de gradientes altitudinales (Knight & Ackerly, 2002), en el presente trabajo las variables genéticas analizadas no mostraron diferencias entre las poblaciones estudiadas. Los resultados concuerdan con un estudio previo en una especie del mismo género, *G. monvillei* donde tampoco se encontraron diferencias entre los valores de contenido de ADN, nivel de ploidía y otras características citogenéticas (Bauk, 2014). Šmarda & Bureš (2006) estudiaron la variabilidad intraespecífica de contenido de ADN y el nivel de ploidía en *Festuca pallens* (Poaceae) en diferentes escalas geográficas, y encontraron que la variabilidad observada en el contenido de ADN era menor con la disminución de la escala geográfica estudiada; por lo que tal vez si hubiésemos analizado la distribución completa de *G. quehlianum* las diferencias podrían haber sido mayores. Sin embargo, al no encontrar diferencias en el contenido de ADN y el nivel de ploidía, los mismos no estarían relacionados a la amplia distribución altitudinal de la especie. Cabe destacar que un individuo de la población a 948 msnm resultó tetraploide, por lo que se debería estudiar con mayor detalle las poblaciones para conocer si existen más individuos con esta característica.

Los valores obtenidos de contenido de ADN nuclear de las plántulas de *G. quehlianum* presentaron una mezcla de núcleos con tres picos 2C, 4C y 8C, sugiriendo este patrón endopoliploidía. Este proceso se considera un mecanismo importante para la adaptación a altas temperaturas y escasez de agua (Nagl, 1978; Negron-Ortiz, 2007; Leitch & Leitch, 2013). Cabe destacar que *G. monvillei* (especie que habita a mayores alturas, o sea sitios más frescos y húmedos) no presentó endopoliploidía (Bauk, 2014). Este patrón se presenta en especies con genoma pequeño, lo que también les proporciona ventajas en ambientes áridos (Palomino *et al.*, 1999; Del Angel *et al.*, 2006). Los procesos de endoduplicación del genoma pueden variar entre los individuos de una misma especie como respuesta a las distintas condiciones ambientales en las que se encuentran (Barow, 2006; Leitch & Leitch, 2013). En Cactaceae se encontró endopoliploidía solo en la subfamilia de las Opuntioideae (Negron-Ortiz, 2007; Segura *et al.*, 2007); y en algunas

especies de Cactoideae particularmente del género *Mammillaria* (Palomino *et al.*, 1999; Del Angel *et al.*, 2006) y en *Stetsonia coryne* (Bauk *et al.*, 2016).

En antecedentes encontrados sobre valores de contenido de ADN en *G.quehlianum*, Das & Das (1998) obtuvieron con el método de densitometría de Feulgen un valor para 2C de 6,46 pg; lo que sería un valor superior al obtenido en este estudio que fue de un promedio de 3,86 pg entre las tres poblaciones. Esto podría deberse a las diferencias que se producen con la utilización de distintas técnicas metodológicas para la obtención de los valores de contenido de ADN, siendo que el método de densitometría con Feulgen podría no ser tan preciso como la citometría de flujo. Por lo que sería importante seguir estudiando con distintas técnicas los valores para la especie en cuestión. Al analizar el número cromosómico de *G.quehlianum*, se encontró que presenta un número haploide de  $n=11$ . En Cactaceae el número cromosómico básico más común es  $x=11$  (Pinkava, 2002; Goldblatt & Johnson, 2006; Das & Mohanty, 2006; Las Peñas *et al.* 2009, 2011); aunque existen algunas excepciones tales como *Selenicereus testudo* con  $n=12$  (Bhattacharyya, 1970) y *Schlumbergera truncata*  $2n=34$  (Ortolani *et al.*, 2007). Das & Das (1998) realizaron estudios meióticos a través de la determinación de células madre de polen y encontraron un número cromosómico de  $n=11$  para *G. quehlianum*. Por lo que la especie aquí estudiada coincide con los reportes para la familia y la especie.

El largo cromosómico promedio en Cactaceae es de 2,75  $\mu\text{m}$  y con escasas diferencias de tamaño. Los cromosomas de la especie en estudio presentaron un largo cromosómico promedio de 2,98  $\mu\text{m}$  por lo que son considerados como pequeños, el cariotipo fue simétrico, siendo la mayoría de los pares cromosómicos metacéntricos y presentando poca diferencia en el tamaño ( $A_1$  y  $A_2$ ) lo que coincide con la homogeneidad cariotípica que presenta la familia (Cota & Philbrick, 1994; Cota & Wallace, 1995; Bandyopadhyay & Sharma, 2000; Das *et al.*, 2000; Das & Mohanty, 2006; Las Peñas *et al.* 2008, 2009, 2014). En este trabajo, se determinó por primera vez el cariotipo, la distribución de heterocromatina y posición de los genes ribosomales en poblaciones de *G. quehlianum*, comparando si existen variaciones con respecto al gradiente altitudinal. No se encontraron diferencias entre las poblaciones analizadas. Por lo que en todos los casos *G. quehlianum* presentó los genes ribosomales 18-5,8-26S en las regiones terminales del primer par de cromosomas metacéntricos, observándose que la distribución de los genes ribosómicos es consistente con el patrón de bandas  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}$  /asociados a NORs. La localización de este gen se encuentra altamente conservado en Cactaceae

(Las Peñas *et al.* 2009, 2014), por lo que la especie en estudio concuerda con los antecedentes de la familia. También ha sido reportada esta asociación en otras familias como Asteraceae y Solanaceae (Blanco *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; Chiarini & Gauthier, 2016). En nuestro caso el ADNr 5S también hibridó en el primer par metacéntrico, al lado del 45S, el segundo par cromosómico donde hibridó el 5S se encuentra posiblemente en el último par metacéntrico; pero siendo que los valores de las mediciones del tamaño de los cromosomas son muy similares es difícil especificar con exactitud cuál es la posición del segundo par con ADNr 5S.

## Características ecológicas

A diferencia de los caracteres genéticos los atributos ecológicos analizados presentaron diferencias significativas entre las poblaciones.

El peso promedio de las semillas de *G. quehlianum* de las tres poblaciones estudiadas en un gradiente altitudinal es de 0,169 mg, Sosa *et al.* (2014) encontraron que el peso de las semillas de *G. quehlianum* era de 0,16 mg, coincidiendo con el valor hallado en este trabajo. La población a los 948 msnm presentó las semillas más livianas. En estudios realizados a nivel intraespecífico se han hallado resultados contrastantes respecto a cómo varía esta variable en relación a gradientes altitudinales. Por ejemplo, Guo *et al.* (2010) al estudiar especies de *Pedicularis* (Orobanchaceae) que habita en el Himalaya, encontraron que el peso de las semillas disminuía con la altitud; a niveles intra e interespecíficos. En contraste, Pluess *et al.* (2005) encontraron en 29 especies de plantas en los Alpes Suizos, que el peso de la semilla aumenta con la altitud al comparar entre especies, y no en el caso de analizar las diferencias intraespecíficas. En cactáceas Bauk *et al.* (2015) no encontraron una relación clara entre el peso de las semillas de *G. monvillei* y un gradiente altitudinal. El patrón encontrado en el presente trabajo indicaría que las condiciones más extremas en las poblaciones de mayor altura (menores temperaturas) y la población más baja (mayores temperaturas, menor disponibilidad de agua) ejercen un efecto positivo sobre el peso de las semillas. El mayor peso de las semillas se reflejó en plántulas más grandes, las que probablemente posean una mayor capacidad de establecimiento en esas condiciones ambientales (Sosa *et al.*, 2014).

El porcentaje de germinación promedio entre las tres poblaciones fue de alrededor de 60%, valor un poco menor al encontrado en estudios previos en la especie (Gurvich *et*

al., 2008). Por otro lado, no existieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre las poblaciones. Este resultado contrasta con Bauk *et al.* (2017) que encontraron un aumento de la germinación en *G. monvillei* con la altura. En el presente trabajo no solo se encontró que no existieron diferencias estadísticas, sino que las tendencias fueron contrarias a lo reportado en Bauk *et al.* (2017), o sea que la germinación disminuyó con el aumento de altitud. Respecto a la velocidad de germinación ( $T_{50}$ ) tampoco se encontraron diferencias entre las poblaciones. Bauk *et al.* (2017) si encontraron diferencias aunque de manera no clara con el gradiente altitudinal. Estos resultados indican que los patrones tanto de germinación total como de su velocidad son específicos para cada especie. Estudios con un mayor número de especies serían necesarios para poder dilucidar de mejor manera la existencia de patrones, o no, de estas variables.

La forma de las plántulas podría considerarse un rasgo clave para supervivencia de los cactus, ya que podría estar implicada en la capacidad de absorción de la luz o en la adaptación a los cambios de temperatura y por ende afectar el establecimiento (Sosa *et al.*, 2014; Bauk *et al.*, 2015). En el presente trabajo se encontró que el patrón de tamaño y forma de las plántulas se relaciona con el peso de las semillas. Poblaciones con semillas más pesadas (los extremos de la distribución) presentaron plántulas de mayor tamaño y de forma más columnar; lo que podría deberse a incrementar la posibilidad de establecimiento de las plántulas. Por otro lado, los resultados encontrados se contradicen con Bauk *et al.* (2015) que encontraron un aumento del alto de las plántulas con el incremento de la altitud, al tiempo que no hallaron una relación entre las características de las plántulas con el peso de las semillas.

La densidad poblacional fue mayor en la altura intermedia, lo que estaría dado por las mejores condiciones en las altitudes medias. Este resultado concuerda con Benavides-Martínez *et al.* (2007) que también encontraron el mismo patrón en *Espeletia pycnophylla* ssp. *angelensis* Cuatrec. (Asteraceae). En cactáceas, solo Bauk (2014) analizó cambios en la densidad de individuos en un gradiente altitudinal y encontró un patrón similar al reportado en el presente trabajo. La frecuencia de las clases de tamaño en cada altura indicaría que la población intermedia tendría una mayor tasa de reclutamiento de individuos. Este dato indicaría que en este sitio se dan las condiciones ambientales óptimas para el establecimiento de esta especie. Respecto al tamaño de los individuos encontramos que a alturas intermedias, aunque la densidad es mayor, el tamaño de los

mismos es menor; siendo más grandes los individuos que se encuentran en alturas extremas. Lo que concuerda con Benavides-Martínez *et al.* (2007), quienes concluyen que en la altitud en donde la densidad poblacional era mayor, el tamaño de los individuos era menor, lo que podría estar dado por una competencia intraespecífica. Esto es contrario a lo encontrado en Bauk (2014) para *Gymnocalycium monvillei*, donde se encontró que en el sitio en donde el tamaño poblacional era mayor, también lo fue el tamaño de las plantas. Por lo que en nuestro caso sí habría una competencia entre los individuos de la misma especie, tal como lo propusieron Benavides-Martínez *et al.* (2007).

Los resultados aquí obtenidos constituyen uno de los primeros aportes al conocimiento no solo de las características citogenéticas de *G. quehlianum*; especie endémica de la Provincia de Córdoba; sino también de características ecológicas relacionándose a su vez con distintas altitudes. Por lo que sería importante seguir estudiando esta especie en distintos gradientes altitudinales.

## CONCLUSIONES

- ✓ Se describieron por primera vez caracteres citogenéticos de *G. quehlianum*, a lo largo de un gradiente altitudinal que va desde los 615 msnm a los 1257 msnm en las Sierras de Córdoba; los cuales no presentaron diferencias.
- ✓ Se encontró endopoliploidía en todas las poblaciones, la cual es una característica que se relaciona a ambientes estresantes.
- ✓ Se describieron caracteres ecológicos de *G. quehlianum*, que fueron relacionados a un gradiente altitudinal en las Sierras de Córdoba, donde la mayoría presentaron diferencias entre las poblaciones.
- ✓ La población a altitud intermedia presentó mayor densidad de individuos, semillas más livianas y plántulas de menor tamaño.
- ✓ Las poblaciones en las alturas extremas presentaron menor densidad de individuos, semillas más pesadas y plántulas más grandes.
- ✓ No existieron diferencias significativas en el porcentaje y velocidad de germinación entre las poblaciones.
- ✓ Los resultados del presente trabajo sugieren que la amplia distribución altitudinal de *G. quehlianum* estaría dada por mecanismos relacionados a características ecológicas (probablemente plasticidad fenotípica) y no a variaciones en las características genéticas, al menos en las analizadas en el presente estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

Baker, H.G. 1972. Seed weight in relation to environmental conditions in California. *Ecology*, 53: 997–1010.

Baloch, H. A.; DiTommaso, A. & Watson, A. K. 2001. Intrapopulation variation in *Abutilon theophrasti* seed mass and its relationship to seed germinability. *Seed Sci. Res.* 11: 333-345.

Bandyopadhyay, B. U. L. & Sharma, A. 2000. The use of multivariate analysis of karyotypes to determine relationships between species of *Opuntia* (Cactaceae). *Caryologia* 53: 121-126.

Baranyi, M. & Greilhuber, J. 1995. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 194(3), 231-239.

Barow, M. 2006. Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* 28: 271-281.

Bauk, K. Variabilidad intraespecífica de contenido de ADN y el nivel de ploidía en *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (Cactaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal de las Sierras de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. 2014. Argentina.

Bauk, K.; Zeballos, S. R.; Las Peñas, M. L.; Flores, J.; Gurvich, D.E. 2015. Are seed mass and seedling size and shape related to altitude? Evidence in *Gymnocalycium monvillei* (Cactaceae). Botany. Natl Research Council Canadá-NRC Research Press.

Bauk, K. ; Santinaque, F.; López-Carro, B. y Las Peñas, M. L. Contenido de ADN y patrón de genes ribosomales en el género monotípico *Stetsonia* (Cactaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* [online]. 2016, vol.51, n.2, pp. 323-330.

Bauk, K.; Flores, J.; Ferrero, C.; Pérez-Sánchez, R.; Las Peñas, M. L., & Gurvich, D. E. 2017. Germination characteristics of *Gymnocalycium monvillei* (Cactaceae) along its entire altitudinal range. *Botany*, 95(4), 419-428.

Benavides-Martínez, I. F.; Burbano-Martínez, D. L.; Urbano-Apráez, S. M.; Solarte-Cruz, M. 2007. Efecto del gradiente altitudinal sobre aspectos autoecológicos de *Espeletia pycnophylla* ssp. *Angelensis* Cuatrec. (Asteraceae) en el páramo el infiernillo (nariño-colombia) *Actual Biol.* 29: 41-53.

Bennett, M. D.; Bhandol, P; Leitch I. J. 2000. Nuclear DNA amounts and their modern uses: 807 new estimates. *Ann Bot* 86: 859–909.

Bhattacharyya, P. K. 1970. Cytological study of *Deamia testudo* (Karw). Britton & Rose: A cactus growing wild in West Bengal. *Science & Culture* 36: 108.

Blanco, S.; Las Peñas, M.L.; Bernardello, G. & Stiefkens, L. 2012. Mapeo de genes ribosómicos y heterocromatina en seis especies de *Lycium* de Sudamérica (Solanaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47: 389-399.

Bowers, J. E. & Pierson, E. A. 2001. Implications of seed size for seedling survival in *Carnegie gigantea* and *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae). *Southwestern Nat.* 46: 272-281.

Cabido, M; Giorgis, M & Tourn, M. 2010. Guía para una excursión botánica en las Sierras de Córdoba. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 45: 209-219.

Charles, G. 2009. *Gymnocalycium* in habitat and culture.

Chiarini, F. E., & Gauthier, M. J. 2016. Chromosome differentiation in three species of *Leptostemonum* (Solanum, Solanaceae) endemic to oceanic islands. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 51(2), 331-340.

Contreras, C. & Valverde, T. 2002. Evaluation of the conservation status of a rare cactus (*Mammillaria crucigera*) through the analysis of its population dynamics. *J. Arid Environ.* 51: 89-102.

Cota, J.H. & C.T. Philbrick. 1994. Chromosome number variation and polyploidy in the genus *Echinocereus* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81: 1054-1062.

Cota, J. H. & Wallace, R. S. 1995. Karyotypic studies in the *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia* 48: 105-122.

Das, A. B. & Das, P. 1998. Nuclear DNA content and chiasma behavior in six species of *Gymnocalycium* Pfeiff. of the family Cactaceae. *Caryologia* 51: 159-165.

Das, A. B.; Mohanty, S. & Das, P. 2000. Cytophotometric estimation of 4C DNA content and chromosome analysis in four species of *Astrophytum* Lem. of the family Cactaceae. *Cytologia* 65: 141-148.

Das, A. B. & Mohanty, S. 2006. Karyotype analysis and in situ nuclear DNA content in seven species of *Echinopsis* Zucc. of the family Cactaceae. *Cytologia* 71: 79.

De Fina, A. 1992. Aptitud agroclimática de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Buenos Aires.

Del Angel, C., Palomino, G., García A. & Méndez I. 2006. Nuclear genome size and karyotype analysis in *Mammillaria* species (Cactaceae), *Caryologia*. 59: 177-186.

Di Rienzo, J.; Bobledo, W.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; González, L.; Robledo, C. W. & Tablada, E. M. 1999. InfoStat, Estadística y Biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Córdoba, Argentina.

Doležel, J; Greilhuber, J & Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2: 2233–2244.

Dubrovsky, J. G. 1998. Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *Bull. Torrey Bot. Club* 125: 33-39.

Gerlach, W. L & Bedbrook, J. L. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7: 1869-1885.

Goldblatt, P. & Johnson, E. D. 2006. Index to Plant Chromosome numbers 2001-2003. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 106. St. Louis, Missouri.

Grant, V. 1981. *Plant speciation*. New York: Columbia University Press xii, 563p.-illus., maps, chrom. nos. En 2nd edition. Maps, Chromosome numbers.

Guerra, M. 1983. O uso da Giemsa na citogenética vegetal. *Cienc. Cult.* 35: 190-19.

Guerrero, P. C.; Durán, A. P.; Walter, H. E. 2011. Latitudinal and altitudinal patterns of the endemic cacti from the Atacama desert to Mediterranean Chile. *J. Arid Environ.* 75: 991–997.

Guo, H.; Mazer, S.J. & Du, G. 2010. Geographic variation in seed mass within and among nine species of *Pedicularis* (Orobanchaceae): effects of elevation, plant size and seed number per fruit. *J. Ecol.* 98: 1232–1242.

Gurvich, D. E.; Demaio, P. & Georgis, M. A. 2006. The diverse globose cactus community of Argentina's Sierras Chicas Ecology and conservation. *Cactus and Succulent Journal* 78: 2-8.

Gurvich, D. E.; Funes, G; Georgis, M. A & Demaio, P. 2008. Germination Characteristics of Four Argentinean Endemic *Gymnocalycium* (Cactaceae) species with different flowering phenologies. *Natural Areas Journal.* 28: 104–108.

Gurvich, D. E.; Zeballos, S. R.; Demaio, P. H. 2014. Diversity and composition of cactus species along an altitudinal gradient in the Sierras del Norte Mountains (Córdoba, Argentina). *S. Afr. J. Bot.* 93: 142–147.

Kiesling, R.; Larrocca, L.; Faúndez J.; Metzing D.; Albesiano, S. 2008. Cactaceae. En: *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur* (F.O. Zuolaga, O. Morrone & M. J. Belgrano eds.) *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 107, Saint Louis, EUA. Vol 2, Pp: 1715-1830.

Kiesling, R. y Ferrari, O. 2009. 100 cactus argentinos. Buenos Aires: Editorial Albatros.

Knight, C. & Ackerly, D. 2002. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters*. 5: 66-76.

Körner, C. 2007. The use of altitude in ecological research. *Trends. Ecol. Evol.* 22: 569–574.

Las Peñas, M. L.; Bernardello, G. & Kiesling, R. 2008. Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Plant. Syst. and Evol.* 272: 211-222.

Las Peñas, M. L. 2009. Estudios citogenéticos en Cactaceae de Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad de Córdoba.

Las Peñas M. L.; Urdampilleta J. D.; Bernardello G. & Forni-Martins, E. R. 2009. Karyotypes, heterochromatin, and physical mapping of 18S-26S rDNA in Cactaceae. *Cytogenet. Genome Res.* 124: 72-80.

Las Peñas, M. L.; Kiesling, R. & Bernardello, G. 2011. Karyotype, Heterochromatin, and physical mapping of 5S and 18-5.8-26S rDNA Genes in *Setiechinopsis* (Cactaceae), an Argentine Endemic Genus. *Haseltonia*. 9: 83–90.

Las Peñas, M. L.; Bernardello, G. & Kiesling, R. 2014. Classical and molecular cytogenetics and DNA content in *Maihuenia* and *Pereskia* (Cactaceae). *Plant. Syst. and Evol.* 300: 549-558.

Las Peñas, M. L.; Santiñaque, F.; López-Carro, B. & Stiefkens, L. 2016. Estudios citogenéticos y de contenido de ADN en *Brasiliopuntia schulzii* (Cactaceae). *Gayana Bot*, 73, 2.

Leitch, I.J. & Leitch, A.R. 2013. Genome size diversity and evolution in land plants. In: I.J. Leitch, J. Greilhuber, J. Dolezel & J. Wendel (eds.), *Plant Genome Diversity*, Vol. 2, pp. 307-320. Springer-Verlag, Vienna, Austria.

Levan, A; Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.

Levin, D. A. 2002. The role of chromosome change in plant evolution. Oxford University Press, New York.

Lysák, M. A., Rostková, A., Dixon, J. M., Rossi, G., & Doležel, J. 2000. Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany*, 86(2), 399-403.

Metzing, D. 2012. *Die Gattung Gymnocalycium: Nacktdistel und Spinnenkaktus*. Dt. Kakteen-Ges.

Moles, A.T., Ackerly, D.D., Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Smith, R., Leishman, M.R., Mayfield, M.M., Pitman, A., Wood, J.T., and Westoby, M. 2007. Global patterns in seed size. *Global Ecol. Biogeogr.* 16: 109–116.

Morales Nieto, C. R.; Quero Carrillo, A. R. & Avendaño Arrazate, C. H. 2007. Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], mediante su nivel de ploidía. *Téc Pecú Méx.* 45: 263-278.

Moreno N. C.; Stiefkens L.; Las Peñas M. L.; Bartoli A., Tortosa R. & Bernardello, G. 2012. Molecular cytogenetic studies of the “*Xanthocephalum group*” (Asteraceae). *Plant. Syst. and Evol.* 298: 1503-1514.

Murray, B.R.; Brown, A.H.D. & Grace, J.P. 2003. Geographic gradients in seed size among and within perennial Australian *Glycine* species. *Aust. J. Bot.* 51:47–56.

Murray, B.; De Lange P. J. & Ferguson A. R. 2005. Nuclear DNA variation, chromosome numbers and polyploidy in the endemic and indigenous grass flora of New Zealand. *Ann. Bot.* 96: 1293–1305.

Nagl, W. 1978. Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution: towards an understanding of quantitative and qualitative variation of nuclear DNA in ontogeny and phylogeny. North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Negrón-Ortiz, V. 2007. Chromosome numbers, nuclear DNA content and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. *American Journal of Botany* 94: 1360-1370.

Ohri, D. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Ann. Bot.* 82: 75-83.

Ortolani F. A.; Mataqueiro, M. F. & Moro, J. R. 2007. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera × buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). *Acta Bot. Bras.* 21: 361–367.

Palomino, G.; Dolezel, J.; Cid, R.; Brunner, I.; Méndez, I. & A. Rubluo. 1999. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long term in vitro culture. *Plant Science* 141: 191-200.

Pinkava, D. J. & Parfitt, B. D. 1982 Chromosome number in some cacti of western North American-IV. *Bull. Torrey Bot. Club.* 109: 121-128.

Pinkava, D. J. 2002. On the evolution of the North American Opuntioideae. En: Hunt D. N. Taylor (eds.), *Studies in the Opuntioideae*, pp. 78–99. Royal Botanic Gardens, Kew.

Pluess, A. R.; Schütz, W. & Stöcklin, J. 2005. Seed weight increases with altitude in the Swiss Alps between related species but not among populations of individual species. *Oecologia* 144: 55-61.

Raven, P. H. 1975 The bases of angiosperm phylogeny: cytology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 724-764.

Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 556-530.

Ross, R. 1981 Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *Amer. J. Bot.* 68:463-470.

Schütz, B. 1986. Monografie rodu *Gymnocalycium*. KK Astrophytum Brno.

Schwarzacher, T & Heslop-Harrison, P. 2000. Practical *in situ* hybridization. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford.

Schweizer, D. & P. Ambros. 1994. Chromosome banding. In: J.R. Gosden (ed.), *Methods in Molecular Biology. Chromosome analysis protocols*, pp. 97-112 Humana Press, Totowa, United States of America.

Schwarzacher, T., Ambros, P. & Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.* 134: 293-297.

Segura, S., L. Scheinvar, G. Olalde, O. LEBLANC, S. Filardo, A. Muratalla, C. Gallegos & S. Flores. 2007. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1033-1041.

Šmarda, P & Bureš, P. 2006. Intraspecific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. *Ann. Bot.* 98: 665–678.

Sosa Pivatto, M., Funes G., Ferreras, A. E. & Gurvich, D. E. 2014. Seed mass, germination and seedling traits for some central Argentinian cacti. *Seed Sci. Res.* 24: 71–77.

Téllez-Valdés, O. 2003. Protected Areas and Climate Change: a Case Study of the Cacti in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, México. *Conservation Biology*, 17(3), 846-853.

## ANEXO

**Datos cromosómicos de *G. quehlianum* en cada una de las alturas correspondientes a un gradiente altitudinal.**

**Abreviaturas:** Brazo corto (s), brazo largo (l), largo total (c), índice braquial (r), nomenclatura Levan *et al.* (1964) (n). Longitud cromosómica ( $\mu\text{m}$ ) (media $\pm$ DE).

### San Marcos Sierras (615 msnm)

Par	s	l	c	r=l/s	n
1	1,54 $\pm$ 0,01	1,78 $\pm$ 0,17	3,32 $\pm$ 0,18	1,16	m
2	1,44 $\pm$ 0,03	1,60 $\pm$ 0,07	3,04 $\pm$ 0,10	1,11	m
3	1,36 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,02	2,87 $\pm$ 0,11	1,11	m
4	1,26 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,01	2,66 $\pm$ 0,02	1,14	m
5	1,19 $\pm$ 0,00	1,44 $\pm$ 0,02	2,63 $\pm$ 0,02	1,21	m
6	1,18 $\pm$ 0,02	1,38 $\pm$ 0,06	2,56 $\pm$ 0,08	1,17	m
7	1,15 $\pm$ 0,00	1,35 $\pm$ 0,02	2,50 $\pm$ 0,02	1,17	m
8	1,05 $\pm$ 0,00	1,35 $\pm$ 0,04	2,40 $\pm$ 0,04	1,29	m
9	1,05 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,06	2,28 $\pm$ 0,07	1,17	m
10	0,84 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,03	2,07 $\pm$ 0,07	1,46	m
11	0,88 $\pm$ 0,07	1,72 $\pm$ 0,07	2,60 $\pm$ 0,14	1,95	sm

Valle Hermoso (948 msnm)

Par	s	l	c	r=l/s	n
1	1,91 ± 0,10	2,19 ± 0,06	4,10 ± 0,16	1,15	m
2	1,68 ± 0,03	2,01 ± 0,03	3,69 ± 0,06	1,20	m
3	1,53 ± 0,03	1,90 ± 0,07	3,43 ± 0,10	1,24	m
4	1,50 ± 0,06	1,78 ± 0,03	3,28 ± 0,09	1,19	m
5	1,44 ± 0,05	1,74 ± 0,03	3,18 ± 0,08	1,21	m
6	1,40 ± 0,01	1,67 ± 0,03	3,07 ± 0,04	1,19	m
7	1,34 ± 0,02	1,61 ± 0,02	2,95 ± 0,04	1,20	m
8	1,32 ± 0,01	1,52 ± 0,04	2,84 ± 0,05	1,15	m
9	1,16 ± 0,01	1,54 ± 0,07	2,70 ± 0,08	1,33	m
10	1,00 ± 0,13	1,25 ± 0,08	2,25 ± 0,21	1,25	m
11	1,03 ± 0,03	2,08 ± 0,12	3,11 ± 0,15	2,02	sm

Camino del Cuadrado (1257 msnm)

Par	s	l	c	r=l/s	n
1	1,80 ± 0,11	2,21 ± 0,03	4,01 ± 0,14	1,23	m
2	1,70 ± 0,07	1,99 ± 0,03	3,69 ± 0,10	1,17	m
3	1,63 ± 0,03	1,79 ± 0,04	3,42 ± 0,07	1,10	m
4	1,49 ± 0,10	1,81 ± 0,14	3,30 ± 0,24	1,21	m
5	1,45 ± 0,03	1,78 ± 0,00	3,23 ± 0,03	1,23	m
6	1,47 ± 0,08	1,66 ± 0,06	3,13 ± 0,14	1,13	m
7	1,39 ± 0,01	1,63 ± 0,04	3,02 ± 0,05	1,17	m
8	1,25 ± 0,01	1,62 ± 0,09	2,87 ± 0,10	1,30	m
9	1,24 ± 0,04	1,49 ± 0,00	2,73 ± 0,04	1,20	m
10	1,08 ± 0,02	1,41 ± 0,13	2,49 ± 0,15	1,31	m
11	0,98 ± 0,07	1,79 ± 0,06	2,77 ± 0,13	1,83	sm