

TAMAÑO DEL GENOMA, CARACTERÍSTICAS CARIOTÍPICAS Y TAMAÑO DEL POLEN EN ESPECIES ARGENTINAS DE *SPERGULA* (CARYOPHYLLACEAE)

MARTA CAROLINA BREM^{1*}, JUAN PABLO COULLERI¹, CAROLA REGINA VOLPONI² y
MARÍA SILVIA FERRUCCI¹

Resumen: El objetivo de este trabajo fue estimar el contenido de ADN (2C) en cuatro especies de *Spergula* que habitan Argentina y analizar la variación del tamaño del genoma (Cx) en relación con las características cariotípicas y palinológicas. Se analizó por primera vez el contenido de ADN de cinco taxones y el tamaño del genoma de cuatro, que variaron muy poco entre las especies, desde Cx= 0,458 pg (*S. salina*, 4x) a Cx= 0,856 pg (*S. arvensis*, 2x). Se registraron dos nuevos recuentos cromosómicos para el género y el tamaño del polen varió de pequeños a medianos. Los coeficientes de regresión sugieren que el número de cromosomas varía de manera inversamente proporcional al tamaño del genoma, mientras que el tamaño del genoma presenta una baja relación con la longitud cromosómica total (LCT) del genoma diploide, aunque muestra una alta relación con respecto a la longitud cromosómica promedio (LCP). En tanto, el tamaño del polen varía independientemente con respecto al tamaño del genoma. La variación cariotípica detectada podría deberse a cambios numéricos y estructurales durante la evolución del género, mientras que el tamaño del polen podría estar relacionado con presiones de selección asociadas a estrategias de dispersión.

Palabras clave: *Spergula*, Argentina, contenido de ADN, nivel de ploidía, tamaño cromosómico, tamaño del polen.

Summary: Genome size, karyotypic features and pollen size in Argentinian species of *Spergula* (Caryophyllaceae). The objective of this work was to estimate the DNA content (2C) in four species of *Spergula* that inhabit Argentina and to analyze the variation of genome size (Cx) in relation to karyotypic and palynological features. The DNA content of five taxa and the genome size of four, which varied very little between species, were analyzed for the first time from Cx= 0.458 pg (*S. salina*, 4x) to Cx= 0.856 pg (*S. arvensis*, 2x). Two new chromosomal counts were recorded for the genus and the pollen size varied from small to medium. The regression coefficients suggest that the chromosome number varies inversely proportional in regards to the genome size, while the genome size presents a low relation with the total chromosome length (TCL) of the diploid genome, although it shows a high relation with respect to the average chromosome length (ACL). Meanwhile, the pollen size varies independently regarding to the genome size. The detected karyotypic variation could be due by numerical and structural changes during the genus evolution, while the pollen size could be related with selection pressures associated with dispersal strategies.

Key words: *Spergula*, Argentina, DNA content, ploidy level, chromosome size, pollen size.

¹ Instituto de Botánica del Nordeste, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas –Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2131, Corrientes, Capital, Argentina.

² Comisión de Investigaciones Científicas, prov. de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, Avenida 122 y 60, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Autor correspondiente: martacarolinabrem@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Spergula L. pertenece a la familia Caryophyllaceae Juss., subfamilia Paronychoideae (A. L. Juss.) Meisn., son hierbas anuales, raramente perennes. Comprende alrededor de 70 especies de distribución casi cosmopolita, cuyos centros de diversidad se localizan en la región del Mediterráneo y en Chile (Pedersen, 1984). En Argentina, *Spergula* se halla representada por 12 especies, dos subespecies y dos variedades (Zuloaga *et al.*, 2008; Brem, 2017), éstas son mayoritariamente halófitas, comunes en pastizales y algunas de alta montaña (Pedersen, 1984; Volponi, 1994).

Spergularia (Pers.) Pers. ex J. Presl & C. Presl es un género muy afín a *Spergula*, su estatus taxonómico ha sido controvertido debido a la presencia de caracteres superpuestos o graduales con *Spergula* (Pedersen, 1984; González, 2010; Brem, 2017); tal es así que actualmente varias especies de *Spergularia* se circunscriben a *Spergula*, como *S. bocconii* (Scheele) Pedersen, *S. diandra* (Guss.) Murb. y *S. salina* (J. Presl & C. Presl) D. Dietr., entre otras.

La poliploidía es una alteración cromosómica en la cual un organismo posee más de dos juegos cromosómicos completos, pudiendo ser $2n=14$ (diploide), 28 (tetraploide), 42 (hexaploide), 56 (octoploide), etc., donde n representa el número de cromosomas en los gametos. Los números somáticos se basan en el número de cromosomas gaméticos de las especies diploides, que se conoce como el número cromosómico básico (x); en una especie diploide $n=x$, pero en una especie poliploide n es un múltiplo de x . La inferencia del número básico de una serie poliploide es un paso importante para la comprensión del número cromosómico en la formulación de una hipótesis evolutiva (Kenyon, 1997). La evolución del número cromosómico en Caryophyllaceae fue investigada por Fernandes & Leitão (1971), estos autores suponen que Caryophyllaceae descende de Phytolaccaceae vía Molluginaceae con un número básico principalmente de $x=9$, considerando a éste ancestral para la familia. A partir de este número básico ocurre una serie descendente en Paronychoideae de $x=5$ y en Alsinoideae de $x=6$; y una serie ascendente hasta $x=12$ en Caryophylloideae. Respecto a las subfamilias,

Paronychoideae es la menos variable, caracterizada por los números básicos $x=8$ y $x=9$, y menos frecuente $x=7$ en algunas especies de *Paronychia* Mill. y *Chaetonychia cymosa* (L.) Sweet, o incluso $x=5$ en *Illecebrum verticillatum* L., la principal causa de variación es la poliploidía (Ratter, 1976; Bittrich, 1993).

La cantidad de ADN en un genoma nuclear gamético no replicado se conoce como el “valor 1C” o “valor C”, comúnmente llamado tamaño del genoma (Soltis *et al.*, 2003). Esta magnitud es igual al contenido de ADN nuclear 2C dividido por el nivel de ploidía (Bennett *et al.*, 1998). Sin embargo, la terminología presenta dificultades en su uso en organismos de diferentes niveles de ploidía, por ello Greilhuber *et al.* (2005) proponen una terminología unificada que describe el tamaño del genoma con facilidad y sin ambigüedad. Estos autores sugieren el término completo “tamaño del genoma monoploide” y el término abreviado “valor Cx” para el contenido de ADN del genoma monoploide en poliploides y no poliploides, sosteniendo que el valor C y el valor Cx son congruentes.

La estimación del contenido de ADN ha facilitado los estudios de evolución y especiación en numerosos grupos de plantas debido a que tanto el número cromosómico como el tamaño del genoma varían considerablemente en las plantas con flores (Soltis *et al.*, 2003). En las angiospermas, el contenido de ADN nuclear (2C) varía entre 1 y 125 pg por núcleo diploide (Bennett & Leitch, 2012), dicha variabilidad llevo a Leitch *et al.* (2005) a proponer 5 categorías para tamaño del genoma: muy pequeños ($\leq 1,4$ pg), pequeños ($\leq 3,5$ pg), intermedios ($> 3,5$ a < 14 pg), grandes (≥ 14 pg) y muy grandes (≥ 35 pg). El tamaño del genoma ha sido estimado en aproximadamente 8510 especies (Bennett & Leitch, 2012), entre las cuales sólo se conoce para *Spergula* el valor C de *S. arvensis* correspondiente a $1C=1,05$ pg (Bennett *et al.*, 1998).

Respecto al conocimiento citogenético en *Spergula*, este es muy escaso, solo registrándose los siguientes números cromosómicos: *Spergula arvensis* L. $2n=18$ (Arohonka, 1982; Sidhu & Bir, 1983; Runemark, 1996); *S. bocconii* $2n=36$ (Dalgaard, 1985; Runemark, 1996); *S. diandra*: $n=9$ (Humphries *et al.*, 1978; Kaur & Singhal, 2012), $n=18$ (Kaur & Singhal, 2012); y *S. salina*: $2n=18$ (Probatova, 2006), $2n=36$ (Petrova, 1995; Lifante *et al.*, 1992).

En relación al estudio palinológico en *Spergula*, los granos de polen de *S. arvensis* han sido los más estudiados. Se destacan, los trabajos realizados por Sáenz (1980) quien analiza el polen de esta especie de tres provincias de España, y lo caracteriza como suboblato, exarrugados, con aperturas dispuestas globalmente, y de exina muy delgada, con gránulos esferoidales y diminutos poros homogéneos. Taia (1994) describe para *S. arvensis* granos subprolato, 4–6–8 colpados, con presencia de membrana y tectum granuloso. Erdtman (1966) referencia para la especie granos 6 colpados, mientras que Perveen & Qaiser (2006) describe la especie sobre material de Pakistán, con granos 3–4–10 colpados. Para Argentina, Volponi (2013) analiza 5 especies de *Spergula*: *S. arvensis*, *S. laevis* (Cambess.) D. Dietr., *S. platensis* (Cambess.) Shinnars var. *balansae* (R. Rossbach) Pedersen, *S. platensis* (Cambess.) Shinnars var. *platensis* Phil., *S. ramosa* (Cambess.) D. Dietr. ssp. *ramosa* y *S. villosa* Pers., las cuales agrupa bajo el Tipo *Spergula ramosa*. Este tipo polínico incluye granos 3–colpados (algunos granos en *Spergula arvensis* son 4–colpados); predominantemente pequeños; prolato–esferoidales a oblato–esferoidales, de ámbito subcircular; colpos largos, de 1,8–4 µm de ancho; exina de 0,5–1,3 µm de espesor, adelgazada hacia las aperturas, algo más gruesa en los polos, granos tectados microequinados, imperforados o punteados.

Recientes estudios han encontrado una fuerte relación positiva entre el tamaño del genoma y el tamaño de las células, dejando abierta la posibilidad de que el tamaño del genoma puede determinar en parte, o correlacionarse, con el tamaño de polen (Beaulieu *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 2010). En concordancia, existen estudios que sugieren que el tamaño del polen aumenta con la ploidía (Gould, 1957; Johansen & von Bothmer, 1994; Knight *et al.*, 2010).

La falta de conocimiento sobre el tamaño del genoma, los escasos datos cromosómicos y su relación con el tamaño del polen en *Spergula* nos llevó a plantear los siguientes objetivos: (1) estimar el tamaño del genoma; (2) estudiar la relación entre el tamaño del genoma y las características cariotípicas; y (3) analizar la relación entre la variación del tamaño del genoma y el tamaño del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

El material analizado en la estimación del contenido de ADN, los recuentos cromosómicos y la estimación tamaño del polen se presenta en la Tabla 1. Los ejemplares correspondientes fueron depositados en el herbario del Instituto Botánica del Nordeste (CTES). Las muestras palinológicas se obtuvieron de ejemplares de los herbarios BAB, CTES y SI.

Estimación del tamaño del genoma

El contenido de ADN (2C) fue estimado usando un citómetro PA flow (Partec GmbH, Germany) en núcleos aislados de tejido foliar. Las muestras fueron analizadas a partir de material fresco o de material conservado en sílica-gel a -10°C. Una hoja completa fue molida finamente con hoja de afeitar en 0,5 mL de buffer de extracción (CyStain® UV Precise P), y se filtró a través de una malla de nylon de 40 µm para separar la suspensión de núcleos del material grueso. Posteriormente, éstos fueron teñidos con una solución de yoduro de propidio, luego de una hora de incubación las muestras fueron examinadas.

Se llevaron a cabo tres estimaciones de ADN para cada muestra (5.000 núcleos por análisis), siendo representada ésta por un individuo para cada taxón (Tabla 1), y se utilizó como estándar interno a *Paspalum dilatatum* Chirú (2n= 6x= 60= 3,57 pg) (Vaio *et al.*, 2007). El contenido de ADN nuclear (2C) desconocido se calculó mediante la fórmula: 2C contenido de ADN de la muestra= (Media del pico de la muestra/Media del pico del estándar) × 2C contenido de ADN del estándar. Las medias y los desvíos estándar fueron estimados en cada medida del contenido de ADN de la muestra.

Los valores Cx, que representan el contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado con el número cromosómico x (Greilhuber *et al.*, 2005), se calcularon dividiendo la cantidad de ADN nuclear 2C por el nivel de ploidía.

Características cariotípicas

Números cromosómicos. – Los recuentos cromosómicos fueron realizados a partir de meristemas radicales de semillas germinadas en cajas de Petri. Los ápices radicales fueron pretratados con 8-hidroxiquinoleína 0,002 M

Tabla 1. Material estudiado de *Spergula* para el análisis del tamaño del genoma (Cx), contenido de ADN (2C), estudios citogenéticos y tamaño del polen, se indican: taxones, coleccionista, número y herbario, localidad, Valor Cx (pg), 2C (contenido de ADN) y su error estándar, nivel de ploidía y número cromosómico, longitud cromosómica total (LCT), longitud cromosómica promedio (LCP) y longitud del eje polar (P), su promedio y medidas mínimas y máximas. Se define con un asterisco (*) el primer recuento para la especie.

Taxones	Coleccionista, número y herbario	Localidad	Valor Cx (pg)	2C±SE (pg)	Nivel de ploidía y N° cromosómico	LCT (µm)	LCP (µm)	P (µm)
<i>S. arvensis</i>	Schinini 9597 (CTES)	Corrientes. BellaVista, Bella Vista.						
<i>S. arvensis</i>	Pedersen 3944 (CTES)	Corrientes. Mburucuyá, Mburucuyá.						29,8 (27-36)
<i>S. arvensis</i>	Brem 15 (CTES)	Corrientes. Empedrado, Riachuelo.	0,856	1,712 ± 0,036	2n = 2x = 18	44,96	2,49	
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i>	Schulz 16008 (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, 1° de Mayo.						
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i> *	Brem 6a (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, Colonia Benítez.	0,665	1,33 ± 0,026	2n = 2x = 18	43,18	2,35	19,9 (18-22)
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i>	Krapovickas & Cristóbal 13015 (CTES)	Corrientes. San Cosme, San Cosme.						
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Schulz 12317 (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, 1° de Mayo.						
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Tressens <i>et al.</i> 540a (CTES)	Corrientes. Curuzú Cuatiá, Curuzú Cuatiá.						19,2 (17-22)
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Brem 6b (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, Antequera.	-	1,297 ± 0,026	2n = 2x = ?	-		
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i> *	Brem & Volponi 5 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	0,511	2,045 ± 0,147	2n = 4x = 36	56,97	1,57	
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i>	Schinini <i>et al.</i> 19183 (CTES)	Corrientes. Lavelle, Yataity Calle.						21,8 (20-23)
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i>	Schinini 22652 (CTES)	Buenos Aires. General Donovan, La Verde.						
<i>S. salina</i>	Corra <i>et al.</i> 4122 (BAB)	Chubut. Sarmiento, Sarmiento.						
<i>S. salina</i>	Brem & Volponi 14 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	0,458	1,834 ± 0,056	2n = 4x = 36	57,38	1,61	22,93 (20-28)
<i>S. salina</i>	Prina <i>et al.</i> 1826 (SI)	Mendoza. Malargüe, Laguna del Azufre.						
<i>S. villosa</i>	Pedesen 11366 (CTES)	Corrientes. Paso de los Libres. Paso de los Libres.						
<i>S. villosa</i>	Brem 7 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	-	1,550 ± 0,267	2n = 2x = ?	-	-	21,8 (19-24)
<i>S. villosa</i>	Pedersen 7095 (CTES)	Corrientes, Mburucuyá, Mburucuyá.						

durante cuatro horas a temperatura ambiente, fijados en una mezcla de 5:1 (etanol: ácido láctico) por 24 horas (Fernández, 1973) y luego teñidos mediante la técnica de Feulgen (Jong, 1997). Posteriormente los meristemas fueron aplastados en una gota de orceína lacto-propiónica; los preparados se hicieron permanentes con Euparal (Asco Laboratories, Manchester, UK). Las microfotografías fueron tomadas a través de un microscopio Zeiss Axioplan con una cámara Canon Powershot A640 de las cinco mejores metafases por individuo (Tabla 1) y se realizaron los conteos cromosómicos.

Tamaño cromosómico. –Debido al reducido tamaño de los cromosomas resultó imposible la confección de idiogramas, aunque se pudo obtener los parámetros: longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) y longitud cromosómica promedio (LCP). Para ello, fueron medidos los cromosomas de cinco metafases completas con un estado de condensación similar utilizando el software ImageJ (Rasband, 1997-2016).

Tamaño del polen

Se estudió el polen de 3 ejemplares de cada especie, los granos de polen se prepararon utilizando la técnica de acetólisis (Erdtman, 1960) y se montaron en gelatina glicerinada. Posteriormente los preparados palinológicos permanentes se depositaron en la Palinoteca de la Universidad Nacional del Nordeste (PAL-CTES). Las mediciones se llevaron a cabo sobre un total de 20 granos por muestra de flores en anthesis con microscopio óptico Leica DM LB2. Además, el estudio se complementó con microscopio electrónico de barrido (MEB) en un equipo JEOL 5800 LV de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste operando a 15 kV. Para este análisis los granos de polen fueron montados sobre un disco de aluminio de 5 cm de diámetro, luego se metalizaron con un delgado baño de oro-paladio y se obtuvieron fotomicrografías.

Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre el tamaño del genoma y las características cariotípicas se llevó a cabo un análisis de regresión lineal, utilizando el valor Cx como variable independiente y número cromosómico, valores de LCT y LCP como variables dependientes. Además, se realizó otro

análisis similar para conocer la correspondencia entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (longitud del eje polar), siguiendo el criterio propuesto por Knight *et al.* (2010), considerando al grano de polen como “unicelular”. El promedio de la longitud del eje polar fue utilizado en el análisis de regresión.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS

Tamaño del genoma

El valor Cx y el valor 2C con los errores estándar de las especies estudiadas se detallan en la Tabla 1. El tamaño del genoma varía muy poco entre las especies estudiadas (Fig. 1), correspondiendo el valor más pequeño a *Spergula salina* 4x (Cx= 0,458 pg) mientras que el valor más alto corresponde a *S. arvensis* (Cx= 0,856 pg).

Números cromosómicos

En la Tabla 1 se detallan los números cromosómicos obtenidos a partir del análisis mitótico. Entre los recuentos de las cuatro especies de *Spergula*, dos registran número cromosómico diploide de $2n=2x=18$ (*S. arvensis* y *S. platensis* var. *balansae*) mientras que las otras dos presentan una dotación tetraploide de $2n=4x=36$ (*S. ramosa* ssp. *ramosa* y *S. salina*), siendo el número básico $x=9$, ilustrándose las correspondientes metafases mitóticas en la Fig. 2.

Tamaño cromosómico

La longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) varió de 57,38 μm (*S. salina*) a 43,18 μm (*S. platensis* var. *balansae*) mientras que la longitud cromosómica promedio (LCP) varió de 2,49 μm (*S. arvensis*) a 1,57 μm (*S. ramosa* spp. *ramosa*) Tabla 1.

Relación tamaño del genoma (Cx) y número cromosómico

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y el número cromosómico (Fig. 3) mostró una relación lineal negativa y significativa ($R^2=0,79$; $p<0,05$), el diagrama de dispersión muestra que las variables son inversamente proporcionales.

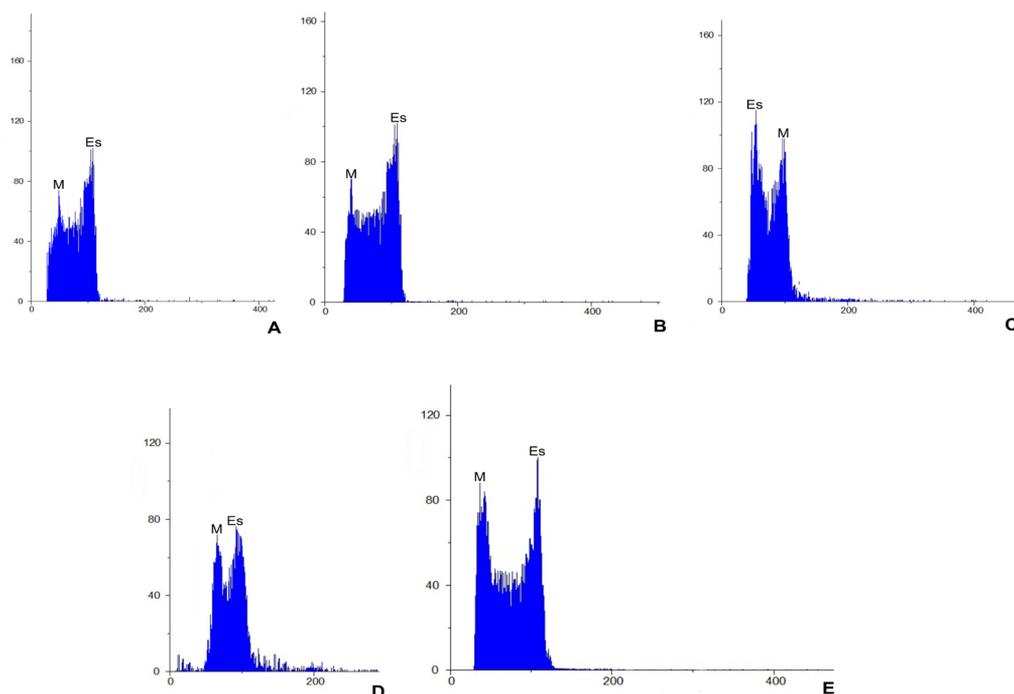


Fig. 1. Histogramas de ADN obtenidos con citometría de flujo: **A:** *S. platensis* var. *balansae*. **B:** *S. platensis* var. *platensis*. **C:** *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **D:** *S. salina*. **E:** *S. villosa*. El eje “x” representa la fluorescencia de yoduro de propidio (PI) (es decir, la cantidad relativa de ADN) y el eje “y” representa el número de núcleos medidos ($\times 100$). M, muestra medida en cada histograma; Es, estándar interno.

Casi el 80% de la variabilidad del número de cromosomas se explica a través del tamaño del genoma, a mayor número cromosómico menor tamaño del genoma y viceversa.

Relación tamaño del genoma (Cx) y longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT)

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y la longitud cromosómica total del genoma diploide (Fig. 4) mostró una relación lineal positiva significativa ($R^2= 0,13$; $p<0,050$) pero muy baja, la pendiente muestra que las variables guardan poca relación entre sí.

Relación tamaño del genoma y longitud cromosómica promedio (LCP)

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y la longitud cromosómica promedio (Fig. 5) mostró una relación lineal positiva y significativa ($R^2= 0,84$; $p<0,05$), el diagrama de dispersión muestra que las variables son directamente proporcionales. Los resultados indican que la longitud cromosómica

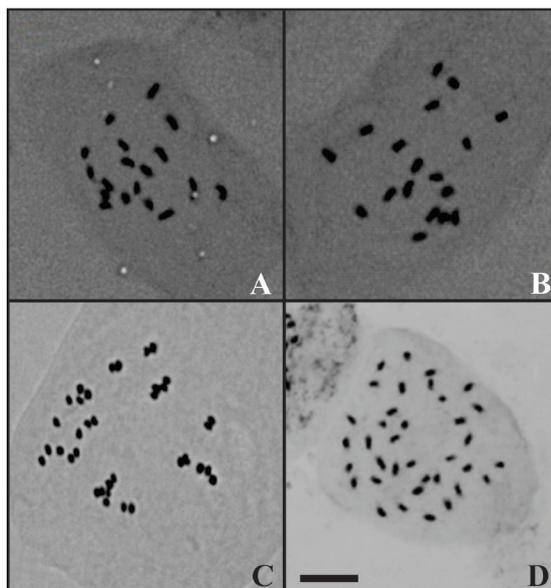


Fig. 2. Fotomicrografías de metafases mitóticas. **A:** *Spermula arvensis*. **B:** *S. platensis* var. *balansae*. **C:** *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **D:** *S. salina*. Escala: 10 μ m.

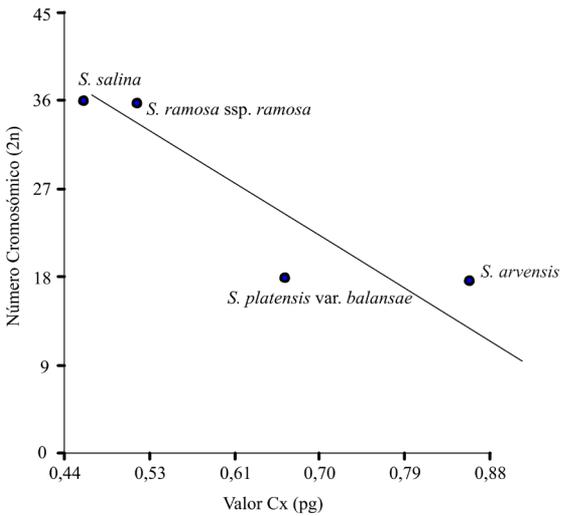


Fig. 3. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal negativa y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el número cromosómico en cuatro taxones de *Spergula*.

es dependiente del tamaño del genoma en las especies estudiadas. Las especies diploides (*S. arvensis* y *S. platensis var. balansae*) poseen cromosomas de mayor longitud y mayor contenido de ADN respecto de las especies poliploides (*S. ramosa ssp. ramosa* y *S. salina*) (Tabla 1).

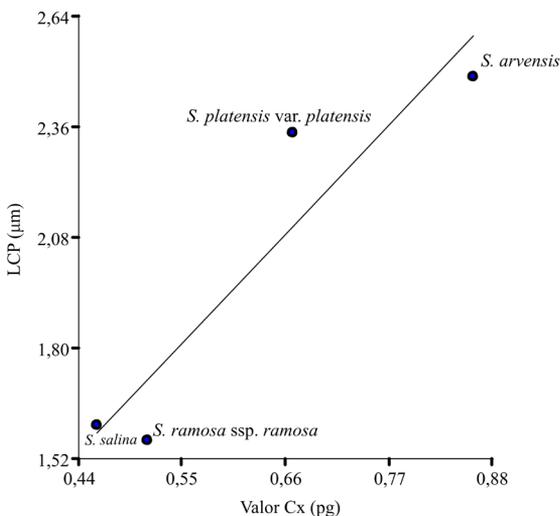


Fig. 5. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal positiva y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y la longitud cromosómica promedio (LCP) en cuatro taxones de *Spergula*.

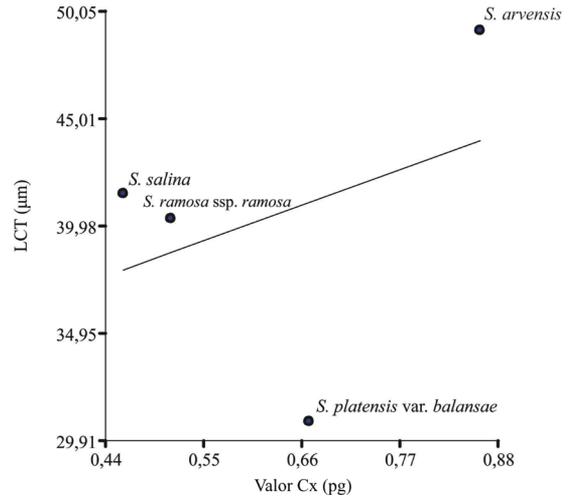


Fig. 4. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal muy baja positiva y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) en cuatro taxones de *Spergula*.

Relación tamaño del genoma y tamaño del polen

El tamaño del polen varía entre 17 a 36 micras (Tabla 1, Fig. 6), los granos medianos corresponden a *S. arvensis*, granos medianos a pequeños en *S. salina* mientras que las restantes especies poseen granos pequeños.

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (Fig. 7) mostró una relación lineal baja positiva, no significativa ($R^2 = 0,48$; $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En las Angiospermas, la variación del contenido nuclear de ADN ocurre en todos los niveles taxonómicos incluso en especies muy relacionadas entre sí (Price, 1988). Sobre la base de la información disponible acerca del tamaño del genoma, la familia Caryophyllaceae se caracteriza por presentar genomas muy pequeños a intermedios cuyo valor Cx oscila entre 0,42 - 4,33 pg (Bennett & Leitch, 2012).

Respecto a *Spergula*, existe un solo registro del tamaño del genoma y corresponde a *S. arvensis*, $1C = 1,05$ pg (Bennett *et al.*, 1998), el cual es muy similar al aquí obtenido. La totalidad de los genomas analizados en este trabajo presentan

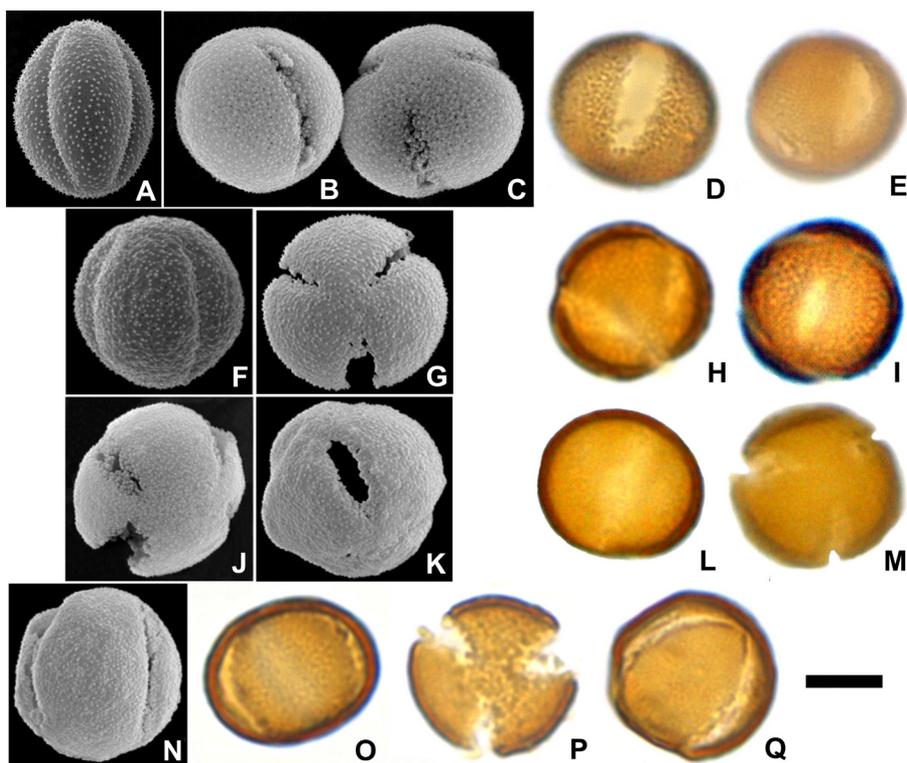


Fig. 6. Microfotografías obtenidas con microscopio electrónico de barrido (MEB) y microscopio óptico (MO). **MEB:** **A:** Vista ecuatorial de *S. arvensis*. **B:** Vista ecuatorial y **C:** Vista subpolar de *S. platensis* var. *balansae*. **F:** Vista ecuatorial de *S. platensis* var. *platensis*. **G:** Vista polar de *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **J:** Vista subpolar de *S. salina*. **K** y **N:** Vista ecuatorial de *S. villosa*. **MO:** **D:** Vista ecuatorial y **E:** Vista subecuatorial de *S. arvensis*. **H:** Vista subecuatorial e **I:** Vista ecuatorial de *S. platensis* var. *balansae*. **L:** Vista ecuatorial y **M:** Vista polar de *S. platensis* var. *platensis*. **O:** Vista ecuatorial de *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **P:** Vista polar de *S. salina*. **Q:** Vista ecuatorial de *S. villosa*: Escala= 12µm.

una tendencia muy conservadora a mantener su tamaño muy pequeño (i.e., $Cx < 1,4$ pg), tendencia que se condice con aquellas reconstruidas por Leitch *et al.* (1998) y Soltis *et al.* (2003) en las angiospermas ancestrales. Sin embargo, Coulleri *et al.* (2014) han enfatizado que la evolución del genoma más que ser conservadora presenta una naturaleza dinámica, en la cual algunos linajes que poseen grandes tamaños de genoma se caracterizan por tasas más lentas de diversificación y mayores tasas de extinción que los linajes con tamaño de genoma medio a muy pequeño. Por lo tanto, y de acuerdo Leitch *et al.* (1998) y Soltis *et al.* (2003), la selección natural podría favorecer la reducción del tamaño del genoma, hecho que se evidencia en que la mayoría de las angiospermas tienen

genomas pequeños o muy pequeños al igual que los presentados por las especies objeto de este estudio.

En poliploides, se espera que el valor $2C$ sea mayor al de sus progenitores diploides de manera proporcional a su nivel de ploidía, sin embargo el valor Cx se espera que sea similar (Leitch & Bennett, 2004). Esta expectativa se observa en algunas series poliploides, especialmente las recién formadas (Urdampilleta *et al.*, 2016), pero hay ejemplos que sugieren que los valores Cx en poliploides particulares son menores que lo esperado (Leitch & Bennett, 2004; Zenil-Ferguson *et al.*, 2016; Simonin & Roddy, 2018), dada la tendencia a la reducción del tamaño del genoma favorecida por la selección natural.

Evolución cromosómica

El aporte realizado en relación a los recuentos cromosómicos más lo conocido para el género constituye casi el 43% del total de las especies de *Spergula* que habitan la Argentina. La variabilidad en el número cromosómico registrado a partir de nuestros resultados detallan la existencia de algunos poliploides, característica frecuente en especies de Paronychioideae (Bittrich, 1993) que explica en parte la evolución del número cromosómico en el género *Spergula*. En la familia se registran cambios numéricos en relación a la evolución cariotípica, es decir variaciones en el número de cromosomas, ya sea por la presencia o ausencia de cromosomas (aneuploidía) tal como fue demostrado en *Silene* por Melzheimer (1974), o por aumento en el juego completo de cromosomas (poliploidía). Numerosos autores sugieren que los poliploides muestran un mejor rendimiento y más bajas tasas de extinción en ambientes nuevos, extremos o cambiantes (Hagerup, 1932; Stebbins, 1970; Brochmann *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2009; Soltis *et al.* 2014). De hecho, *S. salina* y *S. ramosa* ssp. *ramosa*, son ejemplos de poliploides eficientes con distribución amplia, capaces de conquistar ambientes muy variables (Brem, 2017).

En cuanto a los cambios estructurales, si bien no pudieron ser determinadas las características morfológicas de los cromosomas, nuestros resultados evidencian una ligera variación en la longitud cromosómica total (LCT). Autores como Flavell (1986) y Uozu *et al.* (1997) proponen que la presencia de variaciones en secuencias repetitivas dispersas o dispuestas en bloques se evidencia en los cambios en la LCT y en el tamaño del genoma. Esto pareciera indicar una compensación entre el número cromosómico *vs.* el tamaño del cromosoma y del genoma, ya que las especies tetraploides analizadas (*S. ramosa* ssp. *ramosa* y *S. salina*) muestran cromosomas y tamaño del genoma más pequeño comparativamente con las especies diploides (*S. arvensis* y *S. platensis* var. *balansae*). Dicha tendencia ésta en concordancia con la reducción del tamaño del genoma en poliploides señalado por Leitch & Bennett (2004), Zenil-Ferguson *et al.* (2016) y Simonin & Roddy (2018); los primeros autores sugieren que la selección natural opera en favor de: aquellos individuos eficientes en mecanismos de eliminación del ADN en relación a la idea del “nucleotipo” (Bennett,

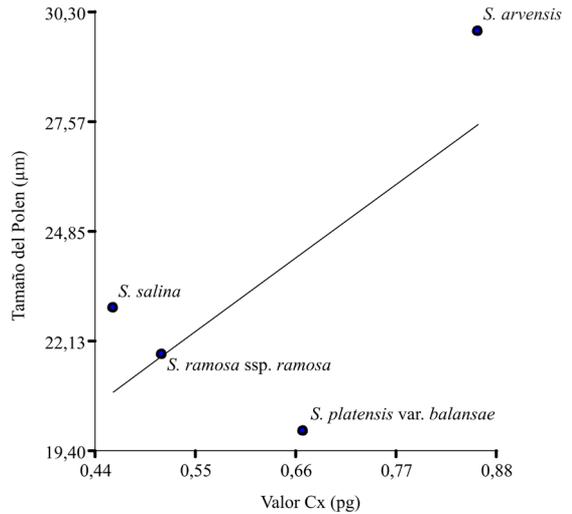


Fig. 7. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal baja positiva y no significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el tamaño del polen (P) en cuatro taxones de *Spergula*.

1987); la reducción de los costos bioquímicos inherentes a la síntesis, replicación y transcripción de ADN asociados al ADN extra; y a la mejora en el apareamiento entre homólogos y posterior estabilización del poliploide (Feldman *et al.*, 1997), dando lugar a la reducción del genoma a gran escala en poliploides.

Relación entre el tamaño del polen y el tamaño del genoma

El tamaño del polen de las especies analizadas son coincidentes, en su mayoría, con lo sugerido por Erdtman (1966) para la tribu Sperguleae (Paronychioideae) y por Punt & Hoen (1995), Perveen & Qaiser (2006) y Volponi (2013) para el género.

Dada la fuerte tendencia positiva entre el tamaño celular y el tamaño del genoma reportado por Beaulieu *et al.* (2008), especulamos que el tamaño del genoma podría estar correlacionado en parte con el tamaño del polen. En Caryophyllaceae, un grano de polen consiste en una célula vegetativa y dos células generativas; o sea el polen es tricelular (Saito *et al.*, 2002). Para este análisis, como se citó anteriormente seguimos a Knight *et al.* (2010), quienes se refirieron al polen como “unicelular”. Nuestros resultados

mostraron una relación débil entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (Fig. 6), esto podría deberse a que el polen no es metabólicamente activo después de la dehiscencia o liberación, sino más bien hasta su momento de imbibición y germinación, cuando alcanza el volumen máximo en la etapa de la formación del tubo polínico, tal como lo advirtió Knight *et al.* (2010) en varias familias de plantas con semillas. Entonces, es posible que esta correlación débil surgiera a partir del análisis en una etapa incorrecta del desarrollo del polen. Por otra parte, estudios similares realizados en Sapindaceae (Coulleri *et al.*, 2014) explican la débil relación entre ambos parámetros a través de la selección natural actuando a favor de granos pequeños en relación con estrategias de dispersión, teniendo un grano pequeño mayor probabilidad de transporte a un estigma receptivo tanto por el viento como por insectos, que granos grandes. Ésta fuerte selección natural puede oscurecer cualquier relación entre el tamaño del polen y el tamaño del genoma tal como lo propusieron Leitch *et al.* (2005).

El mecanismo de dispersión del polen en *Spergula* es principalmente entomófila mediada por sírfidos, que toman el néctar de las flores adoptando el aspecto de himenópteros (abejas y avispas) con las que fácilmente se confunden (New, 1961; Bittrich, 1993; Brem, 2017). Así entonces, teniendo en cuenta lo planteado por Leitch *et al.* (2005), la selección natural en *Spergula* podría estar favoreciendo en gran medida un pequeño tamaño del polen en relación a la estrategia de dispersión.

CONCLUSIONES

En este trabajo se reportan por primera vez dos recuentos cromosómicos (*S. platensis* var. *balansae* y *S. ramosa* ssp. *ramosa*), uno de los cuales resultó ser un poliploide. Además, se confirmó el número cromosómico en *S. arvensis* y se determinó que el citotipo tetraploide de *S. salina* habita en la República Argentina.

Por otro lado, se obtuvieron para *Spergula* las primeras estimaciones del contenido de ADN (2C) de cinco taxones y el tamaño del genoma (Cx) de cuatro, los cuales constituyen una novedad para la familia.

Se demostró la relación inversamente proporcional entre el número cromosómico y

el tamaño del genoma, lo cual indicaría una tendencia evolutiva a la reducción del tamaño del genoma en las especies poliploides.

El análisis de la relación entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen demostró que estas características varían de manera independiente entre sí en el género, probablemente debido a presiones de selección en contra de granos de polen grandes como estrategia de dispersión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dra. Myriam Carolina Peichoto, al Dr. Pablo Ortega-Baes y al Dr. Gabriel Bernardello, por la lectura crítica y las sugerencias realizadas sobre el manuscrito preliminar. Este trabajo ha sido subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO-UNNE, 2011-0202) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Nordeste (SGCyT PI15-P001).

BIBLIOGRAFIA

- AROHONKA, T. 1982. Chromosome counts of vascular plants of the island Seili in Nauvo, southwestern Finland. *Turun Yliopiston Biologian-Laitoksen Julkaisuja* 3: 1-12.
- BEAULIEU, J. M., I. J. LEITCH, S. PATEL, A. PENDHARKAR & C. A. KNIGHT. 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytol.* 179: 975-986.
- BENNETT, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol.* 106: 177-200.
- BENNETT, M. D., I. J. LEITCH & L. HANSON. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Ann. Bot.* 82: 121-134.
- BENNETT, M. D. & I. J. LEITCH. 2012. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>
- BITTRICH, V. 1993. Caryophyllaceae. En Kubitzki, K., Bittrich, V., Rohmer, J. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants* 2: 212-221.
- BREM, M. C. 2017. Estudios biodistemáticos en las especies argentinas del género *Spergula* L. (Caryophyllaceae). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes.

- BROCHMANN, C., A. K. BRYSTING, I. G. ALSOS, L. BORGES, H. H. GRUNDT, A. C. SCHEEN & R. ELVEN. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linnean Soc.* 82: 521-536.
- COULLERI, J. P., J. D. URDAMPILLETA & M. S. FERRUCCI. 2014. Genome size evolution in Sapindaceae at subfamily level: a case study of independence in relation to karyological and palynological traits. *Bot. J. Linn. Soc.* 174: 589-600.
- DALGAARD, V. 1985. Chromosome studies in flowering plants from Madeira. *Willdenowia* 137-156.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA & C. W. ROBLEDO. 2011. InfoStat, versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. *Svensk Bot. Tidskr.* 54: 561-564.
- ERDTMAN, G. 1966. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms.* Hafner Publ Co, New York & London.
- FELDMAN, M., B. LIU, G. SEGAL, S. ABBO, A. A. LEVY & J. M. VEGA. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381-1387.
- FERNANDES, A. & M. T. LEITÃO. 1971. Contribution a la connaissance cytotoxonomique des Spermatophyta du Portugal. III. Caryophyllaceae. *Bol. Soc. Brot.* 45: 167-176.
- FERNÁNDEZ, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15: 287-290.
- FLAVELL, R. B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 312: 227-242.
- GONZÁLEZ, G. L. 2010. Sobre el género *Spergula* L. [incl. *Spergularia* (Pers.) Pers. ex J. Presl & C. Presl, nom. cons.] (Caryophyllaceae) y sus especies en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Lagascalia* 30: 7-18.
- GOULD, F. W. 1957. Pollen size as related to polyploidy and speciation in the *Andropogon saccharoides* - *A. barbinodis* complex. *Brittonia* 9: 71-75.
- GREILHUBER, J., J. DOLEŽEL, M. A. LYSAK & M. D. BENNETT. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95: 255-260.
- HAGERUP, O. 1932. Über polyploidie in beziehung zu klima, ökologie und phylogenie. *Hereditas* 16: 19-40.
- HUMPHRIES, C. J., B. G. MURRAY, G. BOCQUET & K. N. VASUDEVAN. 1978. Chromosome numbers of phanerogams from Morocco and Algeria. *Bot. Not.* 131: 391-406.
- JOHANSEN, B. & R. VON BOTHMER. 1994. Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level, and breeding system. *Sex. Plant Reprod.* 7: 259-263.
- JONG, J. 1997. Laboratory manual of plant cytological techniques. Royal Bot. Garden, Edinburgh.
- KAUR, D. & V. K. SINGHAL. 2012. Phenomenon of cytomixis and intraspecific polyploidy (2x, 4x) in *Spergularia diandra* (Guss.) Heldr. & Sart. in the Cold Desert Regions of Kinnaur District (Himachal Pradesh). *Cytologia* 77: 163-171.
- KENYON, J. C. 1997. Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants. *Evolution* 51: 756-767.
- KNIGHT, C. A., R. B. CLANCY, L. GÖTZENBERGER, L. DANN & J. M. BEAULIEU. 2010. On the relationship between pollen size and genome size. *J. Bot.* 2010: 1-7.
- LEITCH, I. J. & M. D. BENNETT. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 651-663.
- LEITCH, I. J., M. W. CHASE & M. D. BENNETT. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann. Bot.* 82: 85-94.
- LEITCH, I. J., D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS & M. D. BENNETT. 2005. Evolution of DNA amount across land plants (Embryophyta). *Ann. Bot.* 95: 207-217.
- LIFANTE, Z. D., T. LUQUE & C. S. BÁRBARA. 1992. Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum II in Israel. *Bocconea* 3: 229-250.
- MELZHEIMER, V. 1974. Bemerkungen zur cytologie einiger arten der gattung *Silene* L. von der Balkan-Halbinsel. *Candollea* 29: 337-343.
- NEW, J. K. 1961. *Spergula arvensis* L. *Journal of Ecology* 49: 205-215.
- PEDERSEN, T. M. 1984. Caryophyllaceae. En Correa, M. N. (ed.), *Flora Patagónica*, Colec. Cient. I.N.T.A. 8: 253-267.
- PERVEEN A. & M. QAISER. 2006. Pollen flora of Pakistan-LI-Caryophyllaceae. *Pak. J. Bot.* 38: 901-915.
- PETROVA, A. 1995. Mediterranean chromosome number reports 5 (415-434). *Fl. Medit.* 5: 279-288.
- PRICE, H. J. 1988. Nuclear DNA content variation within angiosperm species. *Evol. Trend. Plant.* 2: 53-60.
- PROBATOVA, N. S. 2006. Chromosome numbers of plants of the Primorsky Territory, the Amur River basin and Magadan region. *Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad)* 91: 491-509.
- PUNT W. & P.P. HOEN. 1995. Caryophyllaceae. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 88: 83-272.

- RASBAND, W. S. 1997-2016. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>
- RATTER, J. A. 1976. Cytogenetic studies in *Spergularia*: IX. Summary and conclusions. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 34: 411-428.
- RUNEMARK, H. 1996. Mediterranean chromosome number reports 6 (590-678). *Fl. Medit.* 6: 223-243.
- SÁENZ, C. 1980. Polen de la flora de Doñana (Huelva, España). *Lazaroo* 2: 191-270.
- SAITO, C., N. NAGATA, A. SAKAI, K. MORI, H. KUROIWA & T. KUROIWA. 2002. Angiosperm species that produce sperm cell pairs or generative cells with polarized distribution of DNA-containing organelles. *Sex. Plant Reprod.* 15: 167-178.
- SIDHU, M. & S. S. BIR. 1983. Karyological studies on weeds on cultivable lands in Punjab, India. *Trop. Life Sci. Res.* 1: 1-13.
- SIMONIN, K. A. & A. B. RODDY. 2018. Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. *PLoS Biol.* 16: e2003706.
- SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS, M. D. BENNETT & I. J. LEITCH. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *Am. J. Bot.* 90: 1596-1603.
- SOLTIS, D. E., C. J. VISGER & P. S. SOLTIS. 2014. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins Revisited. *Am. J. Bot.* 101: 1057-1078.
- STEBBINS, G. L. 1970. 1970. Variation and evolution in plants: progress during the past twenty years. In: Hecht M. K. & W. C. Steere (Eds.), *Essays in Evolution and Genetics in Honor of Theodosius Dobzhansky. A Supplement to Evolutionary Biology*, pp. 173-208. Appleton-Century-Crofts, N.Y.
- TAIA, W. K. 1994. On the pollen morphology of some Egyptian Caryophyllaceae. *J. King Saud Univ.* 6: 149-165.
- UOZU, S., H. IKEHASHI, N. OHMIDO, H. OHTSUBO, E. OHTSUBO & K. FUKUI. 1997. Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Mol. Biol.* 35: 791-799.
- URDAMPILLETA, J. D., J. P. COULLERI & M. S. FERRUCCI. 2016. Insights into the Andean genera *Bridgesia* and *Guindilia* (Sapindaceae): an integrated approach. *Syst. Biodivers.* 14: 583-598.
- VAIO, M., C. MAZZELLA, V. PORRO, P. SPERANZA, B. LOPEZ-CARRO, E. ESTRAMIL & G. A. FOLLE. 2007. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Syst. Evol.* 265: 109-121.
- VOLPONI, C. R. 1994. Caryophyllaceae. En R. Kiesling. (ed.), *Flora de San Juan* 1: 175-178.
- VOLPONI, C. R. 2013. Caryophyllaceae. En PIRE, S. M., L. M. ANZÓTEGUI & G. A. CUADRADO (eds.) *Flora Polínica del Nordeste Argentino IV*: 51-58 EUDENE, Corrientes, Argentina.
- WOOD, T. E., N. TAKEBAYASHI, M. S. BARKER, I. MAYROSE, P. B. GREENSPOON & L. H. RIESEBERG. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 13875-13879.
- ZENIL-FERGUSON, R., J. M. PONCIANO & J. G. BURLEIGH. 2016. Evaluating the role of genome downsizing and size thresholds from genome size distributions in angiosperms. *Am. J. Bot.* 103: 1175-1186.
- ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO. 2008. Caryophyllaceae. En ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO (eds.), *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur Vol. 2. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107: 1894-1896.

Recibido el 1 de julio de 2017, aceptado el 6 de abril de 2018. Editora: Viviana Solís Neffa.