



Acta Botanica
Mexicana

Estudios cromosómicos, morfología y fertilidad polínica en *Dioscorea ayardei* (Dioscoreaceae)

Chromosomal studies, pollen morphology and fertility in *Dioscorea ayardei* (Dioscoreaceae)

Patricia N. Asesor^{1,3} , Aldo R. Andrada² , Valeria de los A. Páez² , Nora J. F. Reyes¹ , Eva Bulacio¹ 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: La gran variabilidad de caracteres en *Dioscorea* dificultan la delimitación de las especies, por lo que estudios complementarios son necesarios para lograr su identificación. *Dioscorea ayardei*, especie endémica descrita recientemente de las Sierras de Calilegua (Jujuy, Argentina), se diferencia por la particularidad del androceo en sus flores estaminadas, la cual consiste en una estructura navicular con una sola antera en el centro y tres apéndices dendriformes erectos. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio conjunto de sus caracteres cromosómicos y palinológicos, que sumados a los morfológicos aporten información complementaria para su correcta delimitación.

Métodos: El material estudiado fue identificado según los métodos clásicos en taxonomía y depositado en el Herbario LIL, de la Fundación Miguel Lillo. Para estudiar la meiosis se seleccionaron al azar botones florales jóvenes, que fueron fijados en Farmer durante 24 horas y conservados en alcohol etílico 70° a -4°C. La tinción de los cromosomas se realizó con hematoxilina propiónica al 2%. La fertilidad de los granos de polen se estimó mediante las técnicas de Mützing y DAPI. Para describir la morfología polínica, el material fue procesado según las técnicas convencionales de acetólisis y polen natural; se tomaron fotos con microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB).

Resultados clave: *Dioscorea ayardei* presentó un número gametofítico $n=20$. El comportamiento meiótico fue generalmente regular. Las técnicas para estimar viabilidad y fertilidad del grano de polen revelaron un valor de 90-93% respectivamente. La morfología muestra un grano disulcado de tamaño pequeño (16-24 μm) a mediano (25-30 μm) con tectum microreticulado.

Conclusiones: Se reafirma el número cromosómico básico para el género $x=10$. *Dioscorea ayardei* es un tetraploide con $n=20$, de comportamiento meiótico normal que concuerda con la viabilidad potencial del grano de polen. La ornamentación de la exina y el número cromosómico la relaciona con el clado Nuevo Mundo II.

Palabras clave: comportamiento meiótico, morfología polínica, número cromosómico gametofítico, viabilidad de polen.

Abstract:

Background and Aims: The great variability of characters in *Dioscorea* makes it difficult to define the species, therefore additional studies are necessary to identify them. *Dioscorea ayardei*, a recently described endemic species from the Sierras de Calilegua (Jujuy, Argentina), differs by the particularity of the androecium of its staminate flowers which consists of a navicular structure with a single anther in the center and three erect dendriform appendages. The aim of this paper was to carry out an ensemble study of its chromosomal and palynological characters that, added to the morphological ones, provide complementary information for its correct delimitation.

Methods: The studied material was identified according to the classic methods in taxonomy and deposited in the LIL Herbarium, of the Fundación Miguel Lillo. For study of meiosis, young flower buds were randomly selected, which were fixed in Farmer for 24 hours and preserved in 70° to -4°C ethyl alcohol. For chromosome staining, 2% propionic hematoxylin was used. Fertility of pollen grains was estimated using the Mützing and DAPI techniques. For the pollen morphology description the material was processed according to the conventional techniques of acetolysis and natural pollen; photographs were taken with light microscope (LM) and scanning electron microscope (SEM).

Key results: *Dioscorea ayardei* presented a gametophytic number $n=20$. Meiotic behavior was generally regular. The techniques to estimate viability and fertility of the pollen grain revealed a value of 90-93%, respectively. The morphology showed a small (16-24 μm) to medium (25-30 μm) sized disulcate grain with microreticulate tectum.

Conclusions: The basic chromosome number for the genus $x=10$ is reaffirmed. *Dioscorea ayardei* is a tetraploid with $n=20$, with normal meiotic behavior consistent with the potential viability of the pollen grain. The exine ornamentation and chromosome number relates with the New World II clade.

Key words: gametophytic chromosome number, meiotic behavior, pollen morphology, pollen viability.

¹Instituto de Taxonomía Fanerogámica y Palinología, Área Botánica, Fundación M. Lillo, Miguel Lillo 251, T4000JFE San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

²Instituto de Genética y Microbiología, Área Biología Integrativa, Fundación M. Lillo, Miguel Lillo 251, T4000JFE San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

³Autor para la correspondencia: pnasesor@lillo.org.ar


Recibido: 7 de julio de 2022.

Revisado: 27 de julio de 2022.

Aceptado por Rosario Redonda-Martínez: 12 de septiembre de 2022.

Publicado Primero en línea: 15 de septiembre de 2022.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 129(2022).

 Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Asesor, P. N., A. R. Andrada, V. de los A. Páez, N. J. F. Reyes y E. Bulacio. 2022. Estudios cromosómicos, morfología y fertilidad polínica en *Dioscorea ayardei* (Dioscoreaceae). Acta Botanica Mexicana 129: e2095. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2095>

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

Dioscorea L. es un género que incluye alrededor de 630 especies (Govaerts et al., 2018) distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, y solo algunos representantes se encuentran en zonas templadas de todo el mundo (Wilkin et al., 2005; Romero-Hernández et al., 2019). La mayor variedad y concentración ocurre en el Neotrópico, con al menos 55% de los taxones conocidos (Govaerts et al., 2007; Couto, 2015).

La gran diversidad morfológica, su naturaleza dioica, el tamaño pequeño de las flores, así como la plasticidad fenotípica en algunas especies de *Dioscorea*, dificultan su delimitación (Wilkin et al., 2005; Raz, 2016). Esto llevó a que se reportaran complejos taxonómicos sin límites específicos, tornándose en un desafío para su sistemática (Couto et al., 2014; Wilkin y Muasya, 2015; Fraga et al., 2019).

Las especies de *Dioscorea* se diferencian principalmente por las características del androceo de las flores estaminadas al presentar uno, tres o seis estambres, libres o unidos formando una columna estaminal cilíndrica, piramidal u ovoide que puede o no contener apéndices y estar inserta o no en un disco carnoso (Xifreda y Seo, 2009; Asesor y Bulacio, 2017; Romero-Hernández et al., 2019). Numerosos estudios taxonómicos, incluso la delimitación de especies neotropicales, se han centrado en caracteres morfoanatómicos y polínicos destacando su importancia para comprender las relaciones interespecíficas (Xifreda, 1990, 2000; Couto et al., 2014; Tenorio et al., 2017; Alzer et al., 2019; Da Luz et al., 2020).

Los análisis citogenéticos en *Dioscorea* de Argentina son escasos (Wulff et al., 2003), solo se registran recuentos cromosómicos para algunas especies del Nuevo y Viejo Mundo. Estos estudios mencionan números básicos $x=9$ y $x=10$ (Martin y Ortiz, 1963; Baquar, 1980; Essad, 1984; Bousalem et al., 2006; Viruel et al., 2008) con niveles de ploidía desde $2x$ hasta $10x$ para *D. althaeoides* R. Knuth y *D. benthamii* Prain & Burkill, respectivamente (Kiangsu Institute of Botany, 1976; Chin et al., 1985). Xifreda (2000) considera que estudios adicionales, como el número cromosómico en especies del Nuevo Mundo, sin duda mejorarían la sistemática infragenérica de *Dioscorea*.

Entre los caracteres palinológicos que definen al género, la ornamentación de la exina evidencia una variación

desde tipos perforados, rugulados, estriados hasta reticulados (Xifreda, 2000; Alzer et al., 2019; Da Luz et al., 2020). Diversos autores difieren al momento de describir mediante microscopía óptica (MO) la ornamentación de la exina en individuos de una misma especie de *Dioscorea* (Xifreda, 2000; Alzer et al., 2019; Da Luz et al., 2020). Esto demuestra la importancia del uso de la microscopía electrónica (ME) para tales estudios, además de una correcta identificación taxonómica. Por su parte, el tamaño del grano de polen puede variar respondiendo, entre otros factores, al amplio rango geográfico en el que habitan las especies y en donde están sometidas a diferentes condiciones ambientales (Da Luz et al., 2020).

Por último, en relación con el número de aberturas, se han reportado granos de polen mono y disulcados (Caddick et al., 1998; Schols et al., 2001, 2003, 2005; Wilkin et al., 2009; Viruel et al., 2010). Sadik y Okereke (1975) sostienen que los estudios polínicos son claves para definir la identidad de las especies y analizar su éxito germinativo.

Dioscorea ayardei Asesor es una especie recientemente descrita, endémica de las Sierras de Calilegua (Jujuy, Argentina), que se caracteriza por la particularidad del androceo de sus flores estaminadas, la cual consiste en una estructura navicular con una sola antera inserta en el centro y tres apéndices dendriformes erectos (Asesor y Bulacio, 2021). El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio conjunto de caracteres cromosómicos y palinológicos, que sumados a los morfológicos aporten información complementaria para su correcta delimitación.

Materiales y Métodos

Recolecta de *Dioscorea ayardei*

El material estudiado proviene de las Sierras de Calilegua, departamento Valle Grande, ubicado al sureste de la provincia Jujuy (Argentina) (Fig. 1). El mismo fue recolectado entre 1500 y 2800 m s.n.m., en el piso altitudinal del bosque montano superior de las yungas y en los pastizales de neblina y arbustales mesofíticos (Oyarzabal et al., 2018; Arana et al., 2021). Para identificar la especie se utilizaron técnicas tradicionales en taxonomía y se consultó bibliografía específica: Grisebach (1842, 1875), Hauman (1916), Knuth (1917, 1924), Castillón (1927), Xifreda (1982a, b,



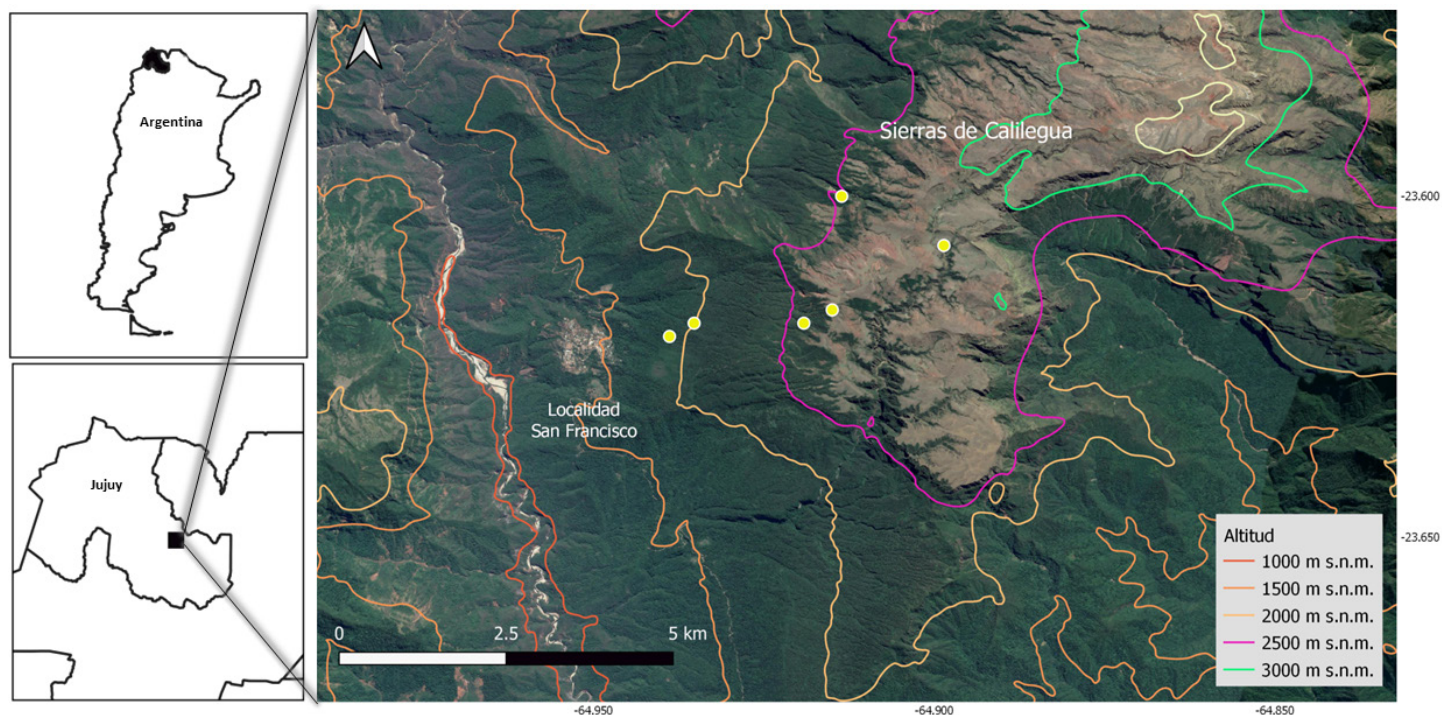


Figura 1: Sitios de colecta de *Dioscorea ayardei* Asesor, en las Sierras de Calilegua, Jujuy, Argentina.

1983, 1984, 1996), Huber (1998), Govaerts et al. (2007), Xifreda y Seo (2009), Couto (2010, 2015), Jørgensen et al. (2014), Asesor y Bulacio (2021). El material colectado se herborizó y otra parte fue fijada en líquido conservante FAA (1:2:7:10, ácido acético glacial, formaldehído, agua y alcohol) (D'Ambrogio de Argüeso, 1986), para su posterior análisis en el laboratorio. Finalmente, ejemplares de referencia se depositaron en el Herbario Fanerogámico de la Fundación Miguel Lillo (LIL) (Thiers, 2022).

Material estudiado

ARGENTINA. Provincia Jujuy, Valle Grande, Sierras de Calilegua, Puesto Duraznillo, 23°37'35.39"S, 64°53'46.67"O, 2600 m, arbustal mesofítico, 24.II.2015, *P. Asesor et al.* 115 (LIL); camino a Alto de Calilegua, pasando Quebrada Honda, 23°33'57.30"S, 64°53'46.67"O, 2610 m, quebrada húmeda en pastizal con *Alnus acuminata* y *Polylepis australis*, 25.II.2009, *E. Bulacio y H. Ayarde* 1055 (LIL); Quebrada por Paso Despensa, 23°38'13.89"S, 64°56'24.23"O, 1500 m, arbustal de ecotono, 29.III.2009, *E. Bulacio y H. Ayarde* 1288 (LIL); Quebrada de Cortaderas, 23°37'07.27"S, 64°54'30.91"O, 2600 m, quebrada húmeda con arbustales bajos, 26.II.2016, *E. Bulacio y H. Ayarde* 3029 (LIL); Puesto

Aguas Blancas, 23°36'01.33"S, 64°54'25.62"O, 2690 m, pastizal, 12.I.2017, *E. Bulacio y H. Ayarde* 3170 (LIL).

Recuento cromosómico y comportamiento meiótico

Meiosis: Se recolectaron al azar botones florales jóvenes. El material se fijó en Farmer (3:1 alcohol etílico 96° y ácido acético glacial) (Sharma y Sharma, 1965) durante 24 horas y luego se conservó en alcohol etílico 70° a -4 °C. Las anteras se hidrolizaron con ácido clorhídrico (HCl) 1N a 60 °C durante 20 minutos, posteriormente se lavaron en agua destilada. La coloración y el montaje se efectuaron con una gota de hematoxilina propiónica al 2% con cristales de citrato férrico. Se llevaron a cabo recuentos cromosómicos en microscopio (Nikon Eclipse E200, Tokio, Japón) con cámara Moticam (1000, 1.3 MP, Tokio, Japón), sobre diez diacinesis/placas metafásicas y para el análisis de la meiosis se observaron en cada estadio 100 células madre del polen (CMPs) como mínimo.

Fertilidad del polen

La estimación de la viabilidad de los granos de polen y el estado del núcleo se realizaron mediante una selección al

azar de diez flores inmediatamente antes de la antesis, que se fijaron en Farmer.

Se empleó la técnica de coloración de Müntzing (Sharma y Sharma, 1965) observándose como mínimo 1000 granos de polen, considerando viables aquellos que resultaron teñidos de color rojo intenso en 2/3 de su contenido.

Para determinar el estado de los núcleos se utilizó el fluorocromo 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de acuerdo con el protocolo de Dewitte et al. (2010). Los núcleos se observaron en 100 granos de polen como mínimo, en microscopio de epifluorescencia (Olympus BX43F, Tokio, Japón; cámara Olympus Q color-5 (5 MP), Tokio, Japón).

Morfología del polen

Se realizaron observaciones en microscopio óptico (MO) (Carl Zeiss Axio LAB A1, Göttingen, Alemania) con cámara Axiocam (ERc5s, Göttingen, Alemania), aplicándose la técnica de Wodehouse (1935), para polen no acetolizado y la de Erdtman (1960) en el acetolizado. A partir de un mínimo de 20 granos de polen, en cada tipo de material, se midieron los siguientes parámetros: diámetro ecuatorial mayor en vista polar (DM), diámetro ecuatorial menor en vista polar (Dme), diámetro polar en vista ecuatorial (DP) y longitud de la apertura (Lap). Para el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) los granos de polen acetolizados se metalizaron con oro (Dorador, Ion Spotter, JFC 1100 Joel, Japón), de acuerdo con la técnica de Karnovsky (1965). Se utilizó el microscopio electrónico de barrido Zeiss Supra 55VP (Oberkochen, Alemania).

La terminología empleada en la descripción polínica corresponde a Erdtman (1943), Sáenz Laín (2004), Punt et al. (2007), Hesse et al. (2009) y Alzer et al. (2019). Las muestras palinológicas se incorporaron a la Palinoteca del Laboratorio de Palinología de la Fundación Miguel Lillo (PAL-TUC), Tucumán, Argentina.

Resultados

Recuento cromosómico y comportamiento meiótico

Dioscorea ayardei (Fig. 2) presentó un número gametofítico de $n=20$ II (Fig. 2B). El comportamiento meiótico fue generalmente regular (Fig. 2C); sin embargo, se observa-

ron algunas aberraciones durante las diferentes etapas meióticas. El 4% de las células en metafase I (MI) mostraron 1-4 cromosomas fuera de la placa ecuatorial o un par de univalentes dispuestos al azar en el citoplasma (Fig. 2D), mientras que en metafase II (MII) 2.3% de CMPs presentaron cromosomas fuera de la placa ecuatorial (Fig. 2E).

Fertilidad del polen

Al estimar la viabilidad de los granos de polen, se observó que 90% de ellos se colorearon con solución de Müntzing, 10% restante corresponde a granos no viables; son translúcidos, presentaron forma alargada y aspecto plasmolizado (Fig. 2H).

La tinción con DAPI reveló dos núcleos bien definidos en 93% de los granos viables en *D. ayardei*; el núcleo de mayor tamaño corresponde al generativo (NG) y el menor, al núcleo vegetativo (NV), el resto de los granos solamente exhibieron el generativo (Fig. 2G).

Morfología polínica

Dioscorea ayardei presenta mónadas heteropolares, con simetría bilateral, disulcadas, elípticas en vista polar, donde se observan los sulcos. En material acetolizado el tamaño de los granos es pequeño a mediano, con DM de 20.6 (25.7) 29.7 μm y Dme de 14 (16.41) 17.8 μm , mientras que en el no acetolizado se encuentran granos pequeños con DM de 20 (22) 24 μm y Dme de 16.7 (18.3) 21.5 μm . En la exina tectada-columelada de 1-2.4 μm de espesor se puede diferenciar la sexina de 0.4-1.9 μm de la nexina de 0.2-0.8 μm . Con MEB se observa un tectum microreticulado con muros de 0.25-0.5 μm de ancho y lúmenes poligonales irregulares de 0.2-0.7 μm (Fig. 2I, J).

Discusión

Los números cromosómicos básicos de las especies de *Dioscorea* varían según la región que ocupan en su amplia distribución. Los antecedentes bibliográficos generales reportan números cromosómicos $2n=20-140$, con formas diploides, tetraploides, hexaploides, octoploides e híbridos inter e intraespecíficos (Martin y Ortiz, 1963; 1966; Paul y Debnath, 2019). Lewis (1980) propuso como número básico para las especies del Viejo Mundo $x=10$,

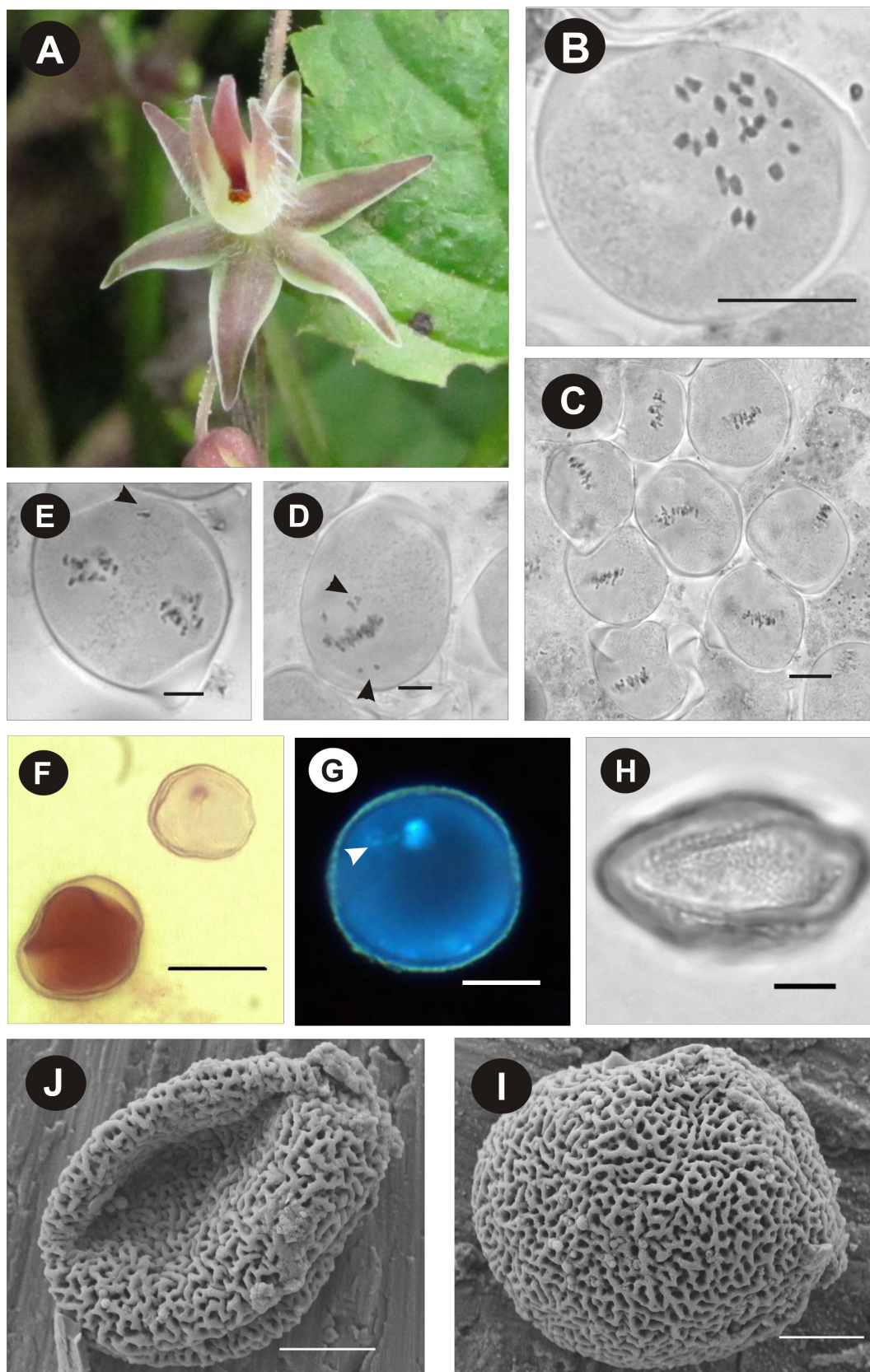


Figura 2: *Dioscorea ayardei* Asesor. A. flor masculina; B. diacinesis $n=20$; C. células madre de polen (CMPs) en Metafase I (MI) regulares; D. MI con cromosoma fuera de la placa ecuatorial (punta de flecha negra); E. Metafase II (MII) con cromosoma fuera de la placa ecuatorial (punta de flecha negra); F. grano de polen viable e inviable teñidos con Muntzing; G. núcleos en granos de polen teñidos con DAPI, la punta de flecha blanca indica núcleo vegetativo (NV); H. grano de polen acetolizado en vista polar distal; I-J. grano de polen observado en MEB. Escalas: A-G=10 μ m, H=20 μ m, I-J=5 μ m.

mientras que las del Nuevo Mundo son tratadas como poliploides derivados de un ancestro putativo aneuploide con $n=9$, aunque este número no ha sido registrado hasta el momento.

En la actualidad, se han realizado estudios citogenéticos en 66 especies (16 son sudamericanas), de las 650 que comprende *Dioscorea* (Goldblatt, 1979; Wulff et al., 2003). La escasa información citológica se debe a la dificultad de llevar a cabo recuentos cromosómicos dado su tamaño pequeño (1-2.5 μm), priorizando estudios en taxones de importancia económica (Martin y Ortiz, 1966). Wulff et al. (2003) y Xifreda y Seo (2009) sugieren $x=10$ como número básico para las secciones *Monadelpha* Uline, *Centrostemon* Griseb. y *Cycladenium* Uline, aportando los primeros datos para diez especies de Argentina. En este trabajo se reporta por primera vez el número cromosómico gametofítico en *D. ayardei*, $n=20$. Nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos por Wulff et al. (2003) para *D. cienegensis* R. Knuth y *D. monadelpha* (Kunth) Griseb., ambas pertenecientes a la sección *Monadelpha* y afines a *D. ayardei*, cuya ubicación dentro de una sección requiere de estudios complementarios, principalmente moleculares.

El comportamiento regular observado en ambas etapas de la meiosis de *D. ayardei* revelaría el nivel de estabilidad en el taxón. La ausencia o baja frecuencia de anomalías constituye uno de los factores que se relacionan con su adaptabilidad (Caetano, 2003), tal como lo reflejan los porcentajes de viabilidad potencial polínica. La predominancia de dos núcleos en los granos de polen de *D. ayardei* da lugar a una alta viabilidad ya que cuentan con las proteínas implicadas en la germinación del tubo polínico, en contraste con los granos mononucleados que carecen de ellas (Zhou y Meier, 2014).

Los análisis palinológicos mostraron que *D. ayardei* tiene exina microreticulada con sectores en donde los poros pierden continuidad y se produce la fusión de lúmenes dando una apariencia de superficie rugulada. Esta característica coincide con Xifreda (2000), quien mencionó la presencia de polen rugulado-reticulado en especies sudamericanas de las secciones *Monadelpha*, *Centrostemon* y *Dematostemon* Griseb. Mientras que Da Luz et al. (2020) manifestaron que este tipo de ornamentación se encuentra solo en las especies que pertenecen al clado Nuevo

Mundo II, propuesto a partir de análisis filogenéticos moleculares (Wilkin et al., 2005; Viruel et al., 2016), el cual agrupa taxones neotropicales de las secciones señaladas por Xifreda (2000).

La abertura disulcada (siguiendo la terminología de Alzer et al., 2019) que presenta *D. ayardei* coincide con lo reportado por Da Luz et al. (2020), en el análisis polínico de especies neotropicales. Sin embargo, el carácter es poco común en monocotiledóneas puesto que está restringido a familias como Amaryllidaceae y Arecaceae (Schols et al., 2003). En el género *Dioscorea* la predominancia del polen monosulcado ocurre en secciones basales como *Stenophora* Uline, mientras que en las derivadas existe una variación en el número de aberturas (Su, 1987; Schols et al., 2001, 2005). Dicho aumento ofrecería una ventaja selectiva, debido al incremento de los sitios de germinación posibles, facilitando así el contacto entre al menos una abertura y la superficie del estigma (Doyle, 2005).

Estudios micromorfológicos, anatómicos y polínicos demostraron ser útiles en revisiones taxonómicas de *Dioscorea* (Tenorio et al., 2017; Alzer et al., 2019). Por lo tanto, el aporte de tales datos, sumados a los cromosómicos, ayudarán a esclarecer los límites y relaciones entre especies neotropicales, debido a la amplia plasticidad fenotípica de *Dioscorea*.

Conclusiones

Se aportan datos que reafirman un número básico $x=10$ para *Dioscorea*. Los resultados citológicos obtenidos en este trabajo revelan que *Dioscorea ayardei* es un tetraploide con $n=20$. Su comportamiento meiótico concuerda directamente con la alta viabilidad potencial de los granos de polen. La ornamentación de la exina y el número cromosómico de *D. ayardei* la relacionan con especies del clado Nuevo Mundo II.

Contribución de autores

PNA y EB concibieron y diseñaron el estudio; ambas colectaron el material analizado y PNA escribió el manuscrito. VP y ARA realizaron los análisis citogenéticos y de fertilidad polínica, y NR caracterizó los granos de polen. Todos los autores contribuyeron en la redacción, discusión, revisión y aprobación del manuscrito final.

Financiamiento

El estudio fue apoyado por la Fundación Miguel Lillo, la cual financió los viajes de campo y el equipamiento necesario utilizados para concretar esta investigación, que se enmarca en los proyectos B-0013-1, B-0015-1 y B-0022-1 (Miguel Lillo 251, T4000JFE, Tucumán).

Agradecimientos

A los revisores anónimos por su importante contribución para mejorar el manuscrito.

Literatura citada

- Alzer, C. F., R. S. Couto, R. Conrado Lopes, V. Gonçalves-Esteves y C. B. Ferreira Mendonça. 2019. Palynotaxonomy of Neotropical species of *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae). *Palynology* 45(1): 73-86. DOI: <https://doi.org/10.1080/01916122.2019.1690067>
- Arana, M. D., E. Natale, N. Ferretti, G. Romano, A. Oggero, G. Martínez, P. Posadas y J. J. Morrone. 2021. Esquema Biogeográfico de la República Argentina. *Opera Lilloana* 56: 1-240.
- Asesor, P. N. y E. Bulacio. 2017. Consideraciones taxonómicas y distribución de *Dioscorea glandulosa* (Dioscoreaceae). *Lilloa* 54(1): 3-12.
- Asesor, P. N. y E. Bulacio. 2021. Una nueva especie de *Dioscorea* (Dioscoreaceae) para las Yungas del noroeste argentino. *Darwiniana*, Nueva serie 9(2): 393-400. DOI: <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2021.92.985>
- Baquar, S. R. 1980. Chromosome behaviour in Nigerian yams (*Dioscorea*). *Genetica* 54: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00122401>
- Bousalem, M., G. Arnau, I. Hochu, R. Arnolin, V. Viader, S. Santoni y J. David. 2006. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 439-451. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0309-z>
- Caddick, L. R., C. A. Furness, K. L. Stobart y P. J. Rudall. 1998. Microsporogenesis and pollen morphology in Dioscoreales and allied taxa. *Grana* 37(6): 321-336. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173139809362687>
- Caetano, C. M. 2003. La aplicabilidad de la citogenética en *Zea mays* L.: genes mutantes meióticos. *Revista de Ciencias Agrícolas* (Universidad de Nariño) 20: 27-49.
- Castillón, L. 1927. Las Dioscoreáceas argentinas. Publicación de la Universidad Nacional de Tucumán 11: 1-43.
- Chin, H., M. Chang, P. Ling, C. Ting y F. Dou. 1985. A cytological study on Chinese *Dioscorea* L. - The chromosome numbers and their relation to the origin and evolution of the genus. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 23: 11-18.
- Couto, R. S. 2010. Dioscoreaceae (R. Br.) Lindley do estado do Rio de Janeiro, Brasil. M. S. thesis. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 378 pp.
- Couto, R. S. 2015. Filogenia de *Dioscorea* subgénero *Helmia* (Dioscoreaceae) com ênfase no neotrópico e revisão de *Dioscorea* seção Monadelphina. Tese doutorado. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 442 pp.
- Couto, R. S., V. Tenorio, F. Alzer, R. C. Vieira, C. B. Mendonca, V. Esteves, R. C. López y J. M. A. Braga. 2014. Taxonomic revision of the *Dioscorea campestris* species assemblage. *Systematic Botany* 39(4): 1056-1069. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364414x683895>
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 83 pp.
- Da Luz, C. F. P., L. Barbuglio-Santiago, A. R. Simões, J. H. Da Silva, V. L. Dos Santos y M. Kirizawa. 2020. Pollen morphology of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) from the Atlantic Forest in southeast Brazil (São Paulo) with a contribution to the systematics of Neotropical species. *Grana* 59(4): 239-257. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1737730>
- Dewitte, A., T. Eeckhaut, J. Van Huylbroeck y E. Van Bockstaele. 2010. Meiotic aberrations during 2n pollen formation in *Begonia*. *Heredity* 104: 215-223. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.111>
- Doyle, J. A. 2005. Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. *Grana* 44(4): 227-251, DOI: <https://doi.org/10.1080/00173130500424557>
- Erdtman, G. 1943. An introduction to pollen analysis. Chronica Botanica Company. Massachusetts, USA. 239 pp.



- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561-564.
- Essad, S. 1984. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploidie dans le genre *Dioscorea*, à propos du dénombrement des espèces *transversa* Brown, *pilosiuscula* Bert. et *trifida* L. *Agronomie* 4(7): 611-617.
- Fraga, F. R. M., R. S. Couto y J. M. A. Braga. 2019. The threatened *Dioscorea galiiflora* and the identification of *Dioscorea triangularis* (Dioscoreaceae): Solving a secular imbroglio. *Phytotaxa* 391(2): 93-100. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.391.2.1>
- Goldblatt, P. 1979. Index to plant chromosome numbers (IPCN). <http://legacy.tropicos.org/Project/IPCN> (consultado junio de 2022).
- Govaerts, R., P. Wilkin y R. M. Saunders. 2007. World Checklist of Dioscoreales: Yams and their allies. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens. London, UK. 65 pp.
- Govaerts, R., P. Wilkin, L. Raz y O. Téllez-Valdés. 2018. World checklist of Dioscoreaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <https://wcsp.science.kew.org/> (consultado julio de 2022)
- Grisebach, A. 1842. Dioscoreaceae. *Flora Brasiliensis* 3(1): 25-48.
- Grisebach, A. 1875. Dioscoreae. In: Warming, E. (ed.). *Symbolae ad Floram brasiliae centralis cognoscendam* XXL. Videnskabelige meddelelser fra den Naturhistoriske forening i Kjöbenhavn 9(15): 153-164. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.162877>
- Hauman, L. 1916. Les Dioscoréacées de L'Argentine. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires* 27: 441-513.
- Hesse, M., H. Halbritter, R. Zetter, M. Weber, R. Buchner, A. Frosch-Radivo y S. Ulrich. 2009. Pollen terminology. An illustrated handbook. Springer Verlag. Vienna, Austria. 266 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6>
- Huber, H. 1998. Dioscoreaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). *The families and genera of vascular plants, Vol 3. Flowering Plants-Monocotyledons. Lilianae (except Orchidaceae)*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. Pp. 216-235. DOI: <https://doi.org/10.2307/4111190>
- Jørgensen, P. M., M. H. Nee y S. G. Beck. 2014. Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia. In: Jørgensen, P. M., M. H. Nee y S. G. Beck (eds.). *Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia*. Monographs in Systematic Botany. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, USA. 1744 pp.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Kiangsu Institute of Botany. 1976. Studies on Chinese *Dioscorea* Sect. *Stenophora* Pr. 6c Burk. and their chromosome numbers. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 14(1): 65-72.
- Knuth, R. 1917. Dioscoreaceae americanae novae. *Notizblatt des Königlichen Botanischen Gartens und Museums Berlin* 7: 185-222.
- Knuth, R. 1924. Dioscoreaceae. In: Engler, A. (ed.). *Pflanzenreich* IV. Cramer Verlag. Berlín, Germany. 387 pp.
- Lewis, W. H. 1980. Polyploidy in species populations. In: Lewis, W. H. (ed.). *Polyploidy-Biological relevance*. Plenum Press. London, UK. Pp. 103-144. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_6
- Martin, F. W. y S. Ortiz. 1963. Chromosome numbers and behavior in some species of *Dioscorea*. *Cytologia* 28(1): 96-101. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.28.96>
- Martin, F. W. y S. Ortiz. 1966. New chromosome numbers in some *Dioscorea* species. *Cytologia* 31(1): 105-107. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.31.105>
- Oyarzabal, M., J. Clavijo, L. Oakley, F. Biganzoli, P. Tognetti, I. Barberis, H. M. Maduro, R. Aragón, P. I. Campanello, D. Prado, M. Oesterheld y R. J. C. León. 2018. Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral* 28(1): 40-63.
- Paul, C. y B. Debnath. 2019. A report on new chromosome number of three *Dioscorea* species. *Plant Science Today* 6(2): 147-150. DOI: <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.2.490>
- Punt, W., S. Blackmore, S. Nilsson y A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 143(1-2): 1-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>
- Raz, L. 2016. Untangling the West Indian Dioscoreaceae: New combinations, lectotypification and synonymy. *Phytotaxa* 258(1): 26-48. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.258.1.2>
- Romero-Hernández, C., O. Téllez-Valdés y R. W. Bussman. 2019. *Dioscorea chusqueifolia* (Dioscoreaceae), a new species from northern Peru. *Brittonia* 71(4): 353-358. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12228-019-09587-8>



- Sadik, S. y O. U. Okereke. 1975. Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* 39(3): 597-604. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084971>
- Sáenz Laín, C. 2004. Glosario de Términos Palinológicos. *Lazaroa* 25: 93-112.
- Schols, P., C. A. Furness, P. Wilkin, S. Huysmans y E. Smets. 2001. Morphology of pollen and orbicules in some *Dioscorea* (Dioscoreaceae) species and its systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136(3): 295-311. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2001.tb00574.x>
- Schols, P., C. A. Furness, P. Wilkin, E. Smets, V. Cielen y S. Huysmans. 2003. Pollen morphology of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) and its relation to systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 143(4): 375-390. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2003.00227.x>
- Schols, P., P. Wilkin, C. A. Furness, S. Huysmans y E. Smets. 2005. Pollen Evolution in Yams (*Dioscorea*: Dioscoreaceae). *Systematic Botany* 30(4): 750-758. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364405775097743>
- Sharma, A. K. y A. Sharma. 1965. *Chromosome Techniques: Theory and Practice*. Butterworth & Co. London, UK. 474 pp.
- Su, P. 1987. Pollen morphology of *Dioscorea* in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 25: 257-365.
- Tenorio, V., R. S. Couto, E. S. B. Albuquerque, A. M. L. Medeiros, R. O. Ferreira, J. M. A. Braga y R. C. Vieira. 2017. Stem anatomy of neotropical *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae) and its importance to the systematics of the genus. *Plant Systematics and Evolution* 303: 775-786. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1408-9>
- Thiers, B. 2022. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. New York, USA. <http://sweetgum.nybg.org/ih> (consultado julio 2022).
- Viruel, J., J. G. Segarra-Moragues, E. Pérez-Collazos, L. Villar y P. Catalán. 2008. The diploid nature of the Chilean *Epipetrum* and a new base number in the Dioscoreaceae. *New Zealand Journal of Botany* 46(3): 327-339. DOI: <https://doi.org/10.1080/00288250809509771>
- Viruel, J., J. G. Segarra-Moragues, E. Pérez-Collazos, L. Villar y P. Catalán. 2010. Systematic revision of the *Epipetrum* group of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) endemic to Chile. *Systematic Botany* 35(1): 40-63. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364410790862579>
- Viruel, J., J. G. Segarra-Moragues, L. Raz, B. Félix, P. Wilkin, I. Sanmartín y P. Catalán. 2016. Late Cretaceous-early Eocene origin of yams (*Dioscorea*, Dioscoreaceae) in the Laurasian Palaeartic and their subsequent Oligocene-Miocene diversification. *Journal of Biogeography* 43(4): 750-762. DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.12678>
- Wilkin, P. y A. M. Muasya. 2015. Clarifying the *Dioscorea buchananii* Benth. species complex: a new potentially extinct subspecies for South Africa. *Phytokeys* 48: 51-72. DOI: <https://doi.org/10.3897/phytokeys.48.6806>
- Wilkin, P., A. Hladik, V. Jeannota y O. Weber. 2009. The threatened edible yams of the *Dioscorea sambiranensis* R. Knuth species complex (Dioscoreaceae): a new species and subspecies. *Adansonia* 31(2): 249-266. DOI: <https://doi.org/10.5252/a2009n2a2>
- Wilkin, P., P. Schols, M. W. Chase, K. Chayamarit, C. A. Furness, S. Huysmans, F. Rakotonasolo, E. Smets y C. Thapayai. 2005. A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: roots, fruits and Madagascar. *Systematic Botany* 30(4): 736-749. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364405775097879>
- Wodehouse, R. P. 1935. *Pollen grains: their structure, identification and significance in science and medicine*. Mc Graw-Hill. New York and London, USA and UK. 574 pp.
- Wulff, A. F., M. Kirizawa y C. C. Xifreda. 2003. Cytotaxonomical studies in species of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) from Argentina and Brazil. 54° Congreso Brasileiro de Botânica. Belem do Pará, Brasil. <https://dtihost.sfo2.digitaloceanspaces.com/sbotanicab/54CNBot/R0432-2.pdf> (consultado julio 2022).
- Xifreda, C. C. 1982a. Estudios en Dioscoreaceae I. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 20: 317-327.
- Xifreda, C. C. 1982b. Estudios en Dioscoreaceae II. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 21: 273-298.
- Xifreda, C. C. 1983. Estudios en Dioscoreaceae III. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 22: 337-344.
- Xifreda, C. C. 1984. Estudios en Dioscoreaceae IV. *Kurtziana* 17: 119-123.
- Xifreda, C. C. 1990. Sobre la presencia de una "vaina cristalífera" en el tallo de algunas especies de *Dioscorea* (Dioscoreaceae). *Darwiniana* 30: 137-142.



- Xifreda, C. C. 1996. Dioscoreaceae. In: Zuloaga, F. O. y O. Morrone (eds.). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. St. Louis, USA. Pp. 197-202.
- Xifreda, C. C. 2000. Evaluation of pollen and vegetative characters in the systematics of South American species of *Dioscorea* (Dioscoreaceae). In: Wilson, K. L. y D. Morrison. Systematics and Evolution. Monocots. Csiro Publishing. Sydney, Australia. Pp. 488-496.
- Xifreda, C. C. y M. Seo. 2009. Dioscoreaceae. In: Novara, L. J. (ed.). Aportes Botánicos de Salta, Flora del Valle de Lerma, Salta. Herbario MCNS, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina. 22 pp.
- Zhou, X. y I. Meier. 2014. Efficient plant male fertility depends on vegetative nuclear movement mediated by two families of plant outer nuclear membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 111(32): 11900-11905. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1323104111>

