

LA IDENTIDAD DE *VERNONIA SETOSOSQUAMOSA* (ASTERACEAE, VERNONIEAE): EVIDENCIAS CROMOSÓMICAS Y PALINOLÓGICAS

María Betiana Angulo & Massimiliano Dematteis

Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Casilla de Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina; mde-matteis@agr.unne.edu.ar (autor corresponsal).

Abstract. Angulo, M. B. & M. Dematteis. 2010. The identity of *Vernonia setososquamosa* (Asteraceae, Vernonieae): chromosomal and palynological evidence. *Darwiniana* 48(1): 17-24.

Vernonia setososquamosa (Asteraceae, Vernonieae) has been considered by several authors as a synonym of *V. remotiflora*, as a variety of this taxon or a quite different, independent species. We analyzed chromosome and pollen morphology of both entities looking for information to clarify the status of *V. setososquamosa*. The latter taxon showed a somatic chromosome number of $2n=2x=30$ with the karyotype composed of $22m + 6sm + 2st$, while on the other hand *V. remotiflora* presented $2n=2x=28$ and a karyotype formula having $22m + 4sm + 2st$. The pollen of both entities was tricolporate, echinolophate, with lacunae disposed in a regular pattern; however, *V. setososquamosa* presented polar lacunae, whereas *V. remotiflora* did not. The results support the treatment of *V. setososquamosa* and *V. remotiflora* as different species.

Keywords. Chromosomes, Compositae, karyotype, pollen morphology.

Resumen. Angulo, M. B. & M. Dematteis. 2010. La identidad de *Vernonia setososquamosa* (Asteraceae, Vernonieae): evidencias cromosómicas y palinológicas. *Darwiniana* 48(1): 17-24.

Vernonia setososquamosa (Asteraceae, Vernonieae) ha sido considerada por diferentes autores como un sinónimo de *V. remotiflora*, como una variedad de este taxón o como una especie diferente. En este trabajo se analizó la morfología de los cromosomas y el polen de ambas entidades en busca de datos que permitan determinar el estatus de *V. setososquamosa*. Este último taxón mostró un número de cromosomas somáticos de $2n=2x=30$, con el cariotipo compuesto por $22m + 6sm + 2st$, mientras que *V. remotiflora* presentó $2n=2x=28$ y una fórmula cariotípica con $22m + 4sm + 2st$. El polen de estas entidades es tricolporado, equinolofado, con lagunas dispuestas en un patrón regular, pero los granos de *V. setososquamosa* presentaron lagunas polares, que resultaron ausentes en *V. remotiflora*. Los resultados apoyan el tratamiento de *V. setososquamosa* y *V. remotiflora* como especies diferentes.

Palabras clave. Cariotipo, Compositae, cromosomas, morfología polínica.

INTRODUCCIÓN

La tribu Vernonieae Cass. constituye uno de los grupos más grandes de las Asteraceae, con alrededor de 1.700 especies distribuidas en las regiones tropicales de Asia, África y América. La mayoría de las especies pertenecen al extenso género *Vernonia* Schreb., que comprende alrededor de 1000 especies, de las cuales 350 crecen en Sudamérica (Cristóbal & Dematteis, 2003).

Las especies de este género presentan una gran variación en el hábito y la morfología, lo cual llevó a diferentes autores a adoptar distintos criterios en la delimitación taxonómica a nivel genérico o infragenérico. En una serie de publicaciones compiladas recientemente, Robinson (1999) circunscribe *Vernonia* a Norteamérica y segrega todas las especies sudamericanas a 16 nuevos géneros. A pesar de ello, en la mayoría de los trabajos actuales se acepta el género *Vernonia* en sentido amplio.

Varios autores consideran que la elevación de las distintas secciones a nivel genérico es prematura y no resuelven totalmente el problema, ya que se conoce poco sobre algunos aspectos de la biología de numerosas especies (Hind, 1993; Keeley & Jansen, 1994).

Una de las especies poco conocidas es *Vernonia setososquamosa* Hieron., descrita originariamente para la zona de Orán en la provincia de Salta (Argentina). Esta entidad fue incluida en varios tratamientos taxonómicos posteriores a su descripción, pero la mayoría de ellos le han asignado un estatus diferente. En la revisión de las Vernonieae argentinas, Cabrera (1944) la consideró una variedad de *V. remotiflora* L.C.Rich. sobre la base de las semejanzas morfológicas, criterio que fue seguido por estudios posteriores (Cabrera, 1974; Cabrera & Freire, 1999). Por su parte, Robinson (1999), en un listado de las Vernonieae del continente Americano, incluyó a *V. setososquamosa* como la sinonimia de *V. remotiflora*. En la revisión de la tribu Vernonieae para la Flora Fanerogámica Argentina, Cristóbal & Dematteis (2003) consideraron a éstas como especies diferentes, sobre la base de algunos caracteres morfológicos como la presencia de pelos en la corola, el tamaño de los capítulos y el hábito de las plantas.

Sobre la base de las diferencias encontradas, se decidió realizar un análisis más amplio que incluya características cromosómicas y palinológicas, que no fueron consideradas anteriormente, con el propósito de constatar el estatus de ambas entidades. Ambos tipos de estudios han resultado de utilidad en la taxonomía de las Vernonieae, tanto para diferenciar especies relacionadas (Dematteis, 1998, 2004; Dematteis & Pire, 2008), como para distinguir grupos o secciones de los distintos géneros de la tribu (Robinson, 1999; Dematteis & Salgado, 2001; Skvarla et al., 2005; Dematteis et al., 2007; Keeley & Robinson, 2009; Angulo & Dematteis, 2010). Desde el punto de vista cromosómico, *Vernonia* muestra una gran variación en números básicos, los cuales oscilan entre $x=9$ y $x=19$ (Dematteis, 2002; Angulo & Dematteis, 2009). En cuanto a la morfología del polen, para el género se han descrito 10 tipos diferentes de granos en base a las aberturas y escultura de la exina (Dematteis & Pire, 2008). Por lo tanto, el objetivo del este estudio fue analizar material de *V. remotiflora* y *V. setososquamosa* para aportar datos que

permitan determinar si constituyen dos especies diferentes o si, por el contrario, son taxones coespecíficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material de herbario de los individuos examinados se encuentra depositado principalmente en el Instituto de Botánica del Nordeste (CTES). Los ejemplares utilizados para los estudios cromosómicos (*) y para morfología polínica (+) se detallan a continuación:

V. setososquamosa: ARGENTINA. **Salta**. Depto. Orán. Ruta 50, 2 km al W de San Ramón de la Nueva Orán, 4-XII-2005, M. M. Arbo et al. 8993 (+). BOLIVIA. Santa Cruz. Prov. Ibáñez. 1/2 km del Río Pejí, entre Mora y Santa Cruz de la Sierra, 30-III-2006, M. Dematteis et al. 1994 (*).

V. remotiflora: ARGENTINA. **Misiones**. Depto. Leandro N. Alem. 7 km al E de L. N. Alem, 11-II-2003, V. Maruñak 1003 (+). Depto. San Pedro. Paraje Paraíso, 4-III-2003, H. Keller 2070 (*).

Para el análisis cromosómico se obtuvieron placas metafásicas de cromosomas mitóticos a partir de semillas germinadas recientemente en cajas de petri. Las raicillas fueron pretratadas durante 3-4 h en 8-hidroxiquinoleína 0,002 M a temperatura ambiente y en algunos casos en solución saturada de Bromonaftaleno. Posteriormente, éstas fueron fijadas en una mezcla de alcohol absoluto y ácido acético (solución de Carnoy I) en proporción 3-1 (v/v), y conservadas en alcohol 70° hasta su posterior análisis. La tinción se efectuó mediante la técnica de Feulgen, previa hidrólisis durante 8 minutos en ácido clorhídrico 1N a 60 °C.

Para la confección de los cariotipos se dibujaron cromosomas metafásicos con microscopio binocular convencional provisto de tubo de dibujo ($\times 3400$). La posición del centrómero se determinó mediante el índice centromérico: $IC = \text{brazo corto} \times 100 / \text{largo total del cromosoma}$, de acuerdo a la metodología sugerida por Levan et al. (1964). La longitud total del cariotipo (LTC) se calculó sumando el promedio de la longitud de cada par de cromosomas. La longitud cromosómica media (LM) se estimó dividiendo la LTC por el número

de pares cromosómicos de cada especie. El rango de variación de la longitud (R) indica el largo promedio del cromosoma de menor y mayor longitud del cariotipo. La asimetría del cariotipo se estimó empleando los índices intra (A1) e intercromosómicos (A2) sugeridos por Romero Zarco (1986). El cálculo de estos índices se realizó siguiendo las siguientes fórmulas:

Índice intracromosómico:

$$A_1 = \frac{I - \sum b_1/B_1}{n}$$

donde b_1 y B_1 son las longitudes de los promedios de los brazos cortos y largos respectivamente, y “n” el número de pares de cromosomas.

Índice intercromosómico:

$$A_2 = S / X$$

donde “S” es la desviación típica y “X” la media de la longitud de los cromosomas.

Tanto para los recuentos cromosómicos como para la determinación de los cariotipos, se analizaron 10 individuos diferentes para cada especie. Los diferentes parámetros cromosómicos se obtuvieron a partir de la medición de 15 placas metafásicas en cada especie.

Para realizar el análisis estadístico se comprobó que los datos tengan distribución normal mediante el Test de Shapiro Wilk ($W = 0,855$; $p = 0,10$). Se compararon las medias de las longitudes cromosómicas entre las especies analizadas mediante la prueba T de Student con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$. El análisis fue realizado con el software Infostat (versión 2008).

Las preparaciones de granos de polen se obtuvieron a través de la extracción de una o dos flores jóvenes de ejemplares de herbario de cada especie, luego de lo cual fueron acetolizados siguiendo el procedimiento sugerido por Erdtman (1966). Para microscopía óptica (MO), los granos de polen fueron montados en un portaobjetos usando gelatina glicerina y posteriormente examinados en un microscopio Zeiss Axioplan. Los preparados permanentes se hallan depositados en la Palinoteca de la Universidad Nacional del Nordeste (PAL-CTES).

Las diferentes medidas de los granos, tales como eje polar (P), diámetro ecuatorial (E) y espesor de la exina, se estimaron a partir de un mínimo de 30 granos por cada muestra. Para microscopía electrónica de barrido (MEB), los granos acetolizados fueron lavados primero en alcohol 96° y alcohol absoluto, luego metalizados con oro-paladio y posteriormente examinados con un microscopio JEOL 5800 LV. La terminología empleada para la descripción de los granos de polen es la sugerida por Keeley & Jones (1979) y Punt et al. (1994).

Las fotografías de microscopio óptico se obtuvieron mediante una cámara digital Canon Power Shot A640.

RESULTADOS

Número cromosómico y cariotipo (Tabla 1)

Vernonia remotiflora presentó un número de cromosomas somáticos de $2n=28$ (Fig. 1A), con un cariotipo constituido por 22 cromosomas metacéntricos, 4 submetacéntricos y 2 subtelocéntricos (Fig. 1C). El tamaño cromosómico promedio fue de $1,65 \mu\text{m}$, oscilando entre $1,27$ y $2,12 \mu\text{m}$. La longitud total del cariotipo resultó de $46,20 \mu\text{m}$ y el índice centromérico medio $43,43$.

Vernonia setososquamosa presentó un número de cromosomas de $2n=30$ (Fig. 1B), con el cariotipo formado por 22 cromosomas metacéntricos, 6 submetacéntricos y 2 subtelocéntricos (Fig. 1D). La longitud cromosómica media fue de $1,92 \mu\text{m}$ y los cromosomas oscilaron de tamaño entre $1,47$ y $2,36 \mu\text{m}$. La longitud total del cariotipo fue de $57,60 \mu\text{m}$, en tanto que el índice centromérico medio resultó $43,19$.

Los resultados del análisis estadístico indican que existen diferencias significativas entre las longitudes cromosómicas medias de ambas especies ($t=3,23$; $p=0,012$).

Morfología del polen

Vernonia remotiflora mostró granos oblato-esferoidales a esferoidales ($P/E = 0,99-1,00$), tricolporados, equinolofados. Colpos muy largos, poros subcirculares. $P = 28,56$ ($31,37$) $32,64 \mu\text{m}$,

Tabla 1. Número cromosómico somático (**2n**), fórmula cariotípica, longitud cromosómica media (**LM**), rango (**R**), longitud total de cariotipo (**LTC**), índice centromérico promedio (**IC**) e índices de asimetría inter (**A1**) e intracromosómicas (**A2**) de *Vernonia remotiflora* y *V. setososquamosa*.

Especie	2n	Fórmula Cariotípica	LM (μm)	R (μm)	LTC (μm)	IC	A ₁	A ₂
<i>V. remotiflora</i>	2n=28	22m+4sm+2st	1,65	1,27-2,12	46,20 $\pm$ 0,07	43,43 $\pm$ 0,23	0,192	0,199
<i>V. setososquamosa</i>	2n=30	22m+6sm+2st	1,92	1,47-2,36	57,60 $\pm$ 0,10	43,19 $\pm$ 0,31	0,225	0,151

E = 28,50 (30,50) 32,70 μm . Exina de 4,08-5,44 μm de espesor. Tectum discontinuo, microperforado, lagunas con contorno y disposición regular, sin laguna polar (Fig. 2A-C). Espinas de 1,30 (1,56) 2,00 μm long., agudas en el ápice (Fig. 3A-B).

Vernonia setososquamosa presentó granos de polen oblato-esferoidales a esferoidales (P/E = 0,96-1,00), tricolporados, equinolofados. Colpos largos, poros alargados a subcirculares. P = 36,73 (37,89) 39,44 μm , E = 36,72 (38,08) 40,80 μm . Exina de 4,5-5,5 μm de espesor. Tectum discontinuo, densamente microperforado, lagunas de contorno más o menos regular, laguna polar presente (Fig. 2D-F). Espinas de 1,36 (1,58) 2,04 μm long., agudas en el ápice (Fig. 3C-D).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

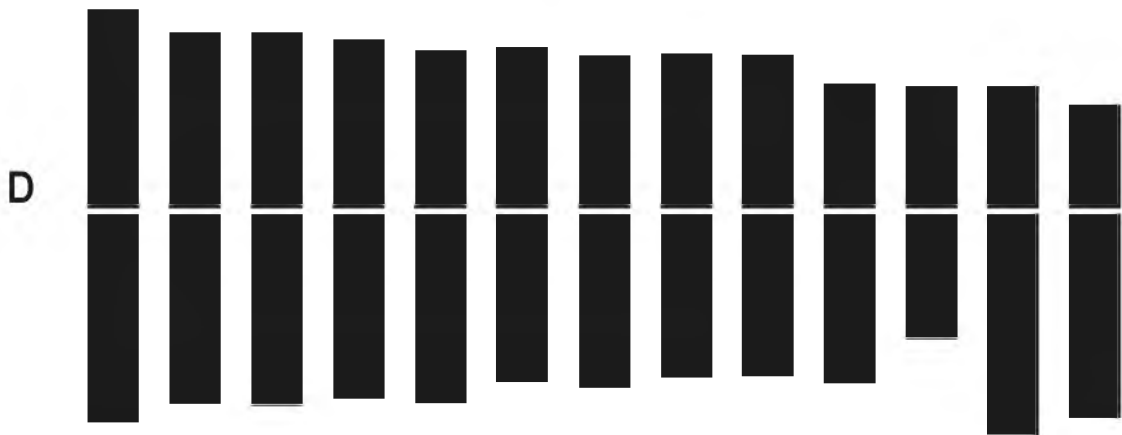
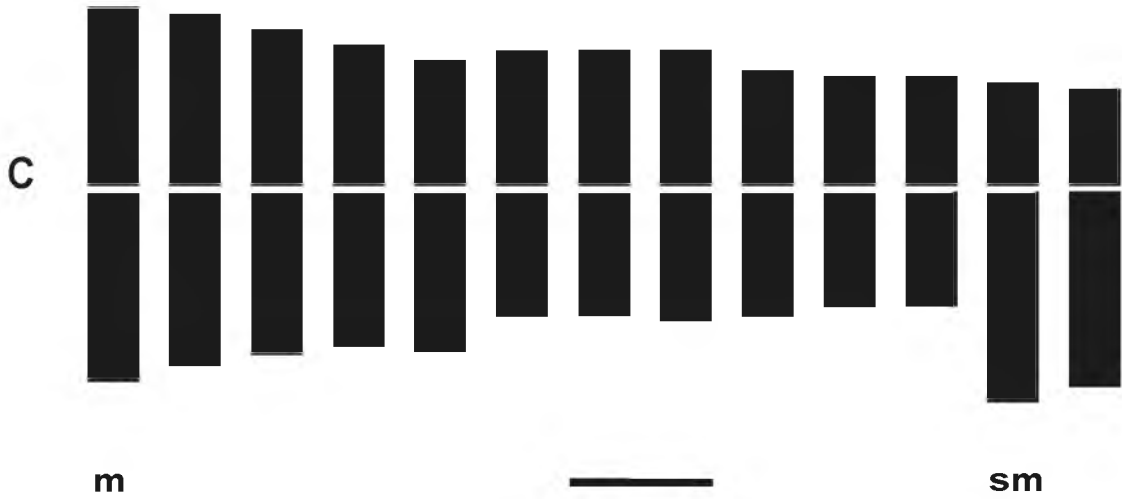
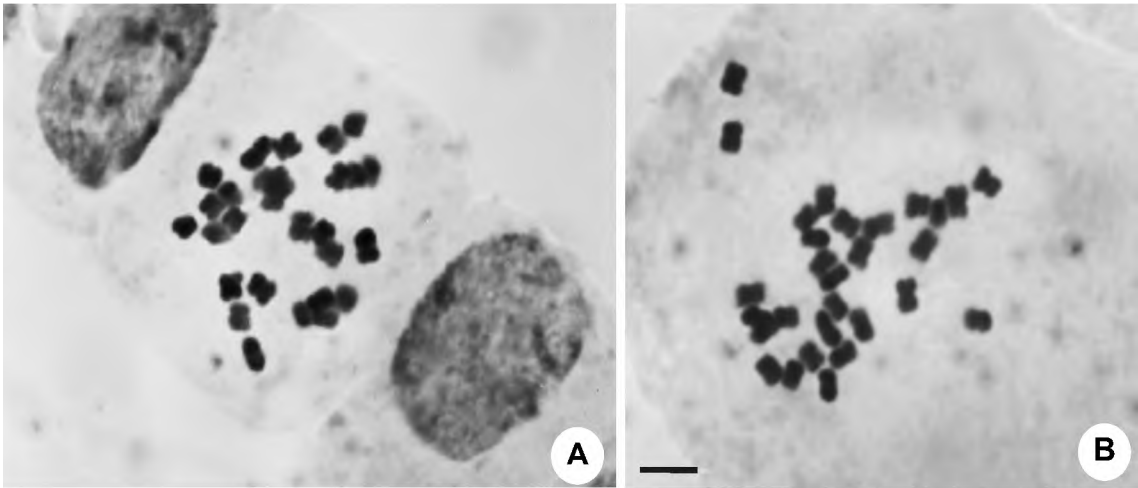
Los resultados obtenidos muestran que *Vernonia remotiflora* (2n=2x=28) es diploide con número básico x=14, mientras que *V. setososquamosa* también es diploide (2n=2x=30) pero con x=15. Ambos números básicos se han informado antes para otras especies sudamericanas del género *Vernonia*, principalmente de la subsect. Lepidaploa Cass., en donde se conocen taxones con x=14, x=15 y x=16 (Dematteis, 2002). *Vernonia remotiflora* ya había sido estudiada previamente y todos los recuentos efectuados concuerdan con el guarismo observado en el presente trabajo (Dematteis, 1996; Dematteis et al., 2007). Sin

embargo, un estudio cariotípico previo menciona 16m + 12sm como fórmula cariotípica para esta especie (Dematteis, 1996), que difiere de la encontrada aquí (22m + 4sm + 2st). Tales diferencias sugieren la posible ocurrencia de variaciones cromosómicas estructurales en *V. remotiflora*. Por su parte, en *V. setososquamosa* no existían estudios previos, debido a lo cual el número de cromosomas y el cariotipo son presentados aquí por primera vez.

Debido a la diferencia en el número de cromosomas, las dos entidades se pueden distinguir también por la fórmula cariotípica, ya que *V. setososquamosa* (22m + 6sm + 2st) presenta un par más de cromosomas submetacéntricos que *V. remotiflora* (22m + 4sm + 2st). Además de la fórmula cariotípica, se pueden diferenciar por el tamaño promedio de los cromosomas, valor que resulta mucho mayor en *V. setososquamosa*., mostrando ambas especies diferencias significativas en las longitudes cromosómicas medias.

En cuanto a la morfología del polen las dos entidades analizadas presentan las mismas características generales, pero defieren principalmente en la ornamentación de la exina. El polen de *V. setososquamosa* presenta una laguna en cada polo, mientras que los granos de *V. remotiflora* carecen de ella. Ambos tipos de polen se han descrito previamente para *Vernonia* y otros géneros afines de la tribu. El tipo de polen presente en *V. setososquamosa* fue denominado "tipo C" por Keeley & Jones (1979), mientras que la forma polínica pre-

Fig. 1. Cromosomas somáticos (A-B) e idiogramas de las dos especies estudiadas (C-D). A, *Vernonia remotiflora*, 2n=28. B, *V. setososquamosa*, 2n=30. C, *Vernonia remotiflora*, 22m + 4sm + 2st. D, *V. setososquamosa*, 22m + 6sm + 2st. Escalas: A-B = 2.5 μm , C-D = 1 μm .



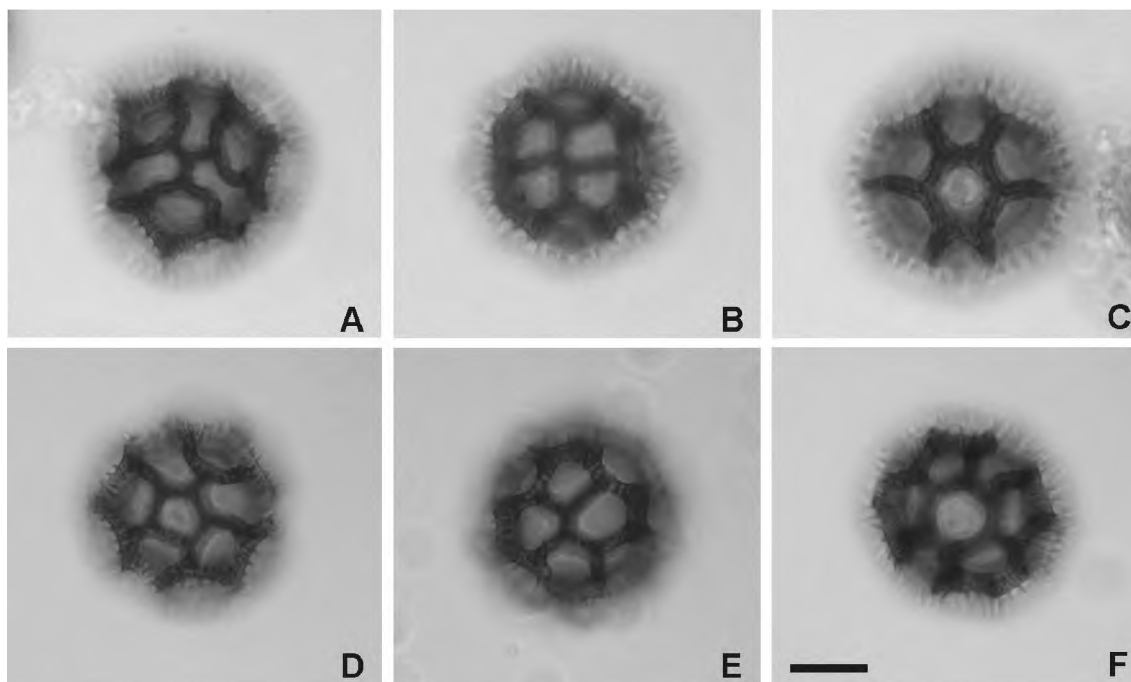


Fig. 2. Granos de polen (microscopio óptico, luz blanca) de *Vernonia remotiflora* (A-C) y *V. setososquamosa* (D-F). A, D, vista polar. B, E, vista ecuatorial, mesocolpo. C, F, vista ecuatorial, colporo. Escala = 10µm.

sente en *V. remotiflora* ha sido designada tipo “G” por Robinson (1990).

Los estudios sobre morfología polínica son muy abundantes en la tribu Vernonieae debido a la importancia taxonómica de esta característica (Skvarla et al., 2005; Dematteis & Pire, 2008). Sin embargo, generalmente el tipo de polen ha sido empleado en las Vernonieae para diferenciar géneros o secciones de algún género (Jones, 1979), debido a que, por lo común, las especies relacionadas tienden a presentar la misma morfología polínica (Robinson, 1999). El hallazgo de diferentes tipos de polen en especies relacionadas no es común en el género *Vernonia*, pero se observa con frecuencia en la sect. *Lepidaploa*, para la cual se han descrito cuatro formas distintas de granos (Robinson, 1990).

Tal como lo señalan Cristóbal & Dematteis (2003), las mayores diferencias exomorfológicas entre *V. setososquamosa* y *V. remotiflora* se presentan en el hábito, el ápice de las hojas, el tamaño del involucre, la forma de los filarios y los pelos de la corola. *Vernonia setososquamosa* es una hierba

perenne y tiene hojas aristadas en el ápice, involucre de 12-14 mm de altura, filarios largamente aristados y lóbulos de la corola con pelos y papilas diminutas en el extremo. Por su parte, *V. remotiflora* es una hierba anual, con hojas agudas, involucre de 6-8 mm de altura, filarios acuminados en el ápice y lóbulos de la corola glabros.

En cuanto a los cromosomas y a la morfología polínica, los resultados muestran que las diferencias entre los taxones analizados son aun más conspicuas. Ambas entidades tienen distinto número de cromosomas y cariotipo, y además muestran diferente tipo de polen. Los datos anteriores indican que *V. remotiflora* y *V. setososquamosa* constituyen dos especies diferentes y no pueden ser tratadas como variedades de una misma especie.

AGRADECIMIENTOS

A Valeria Mambrin y a Carolina Peichoto del Instituto de Botánica del Nordeste por la colaboración en la preparación de las muestras de polen y en la toma de

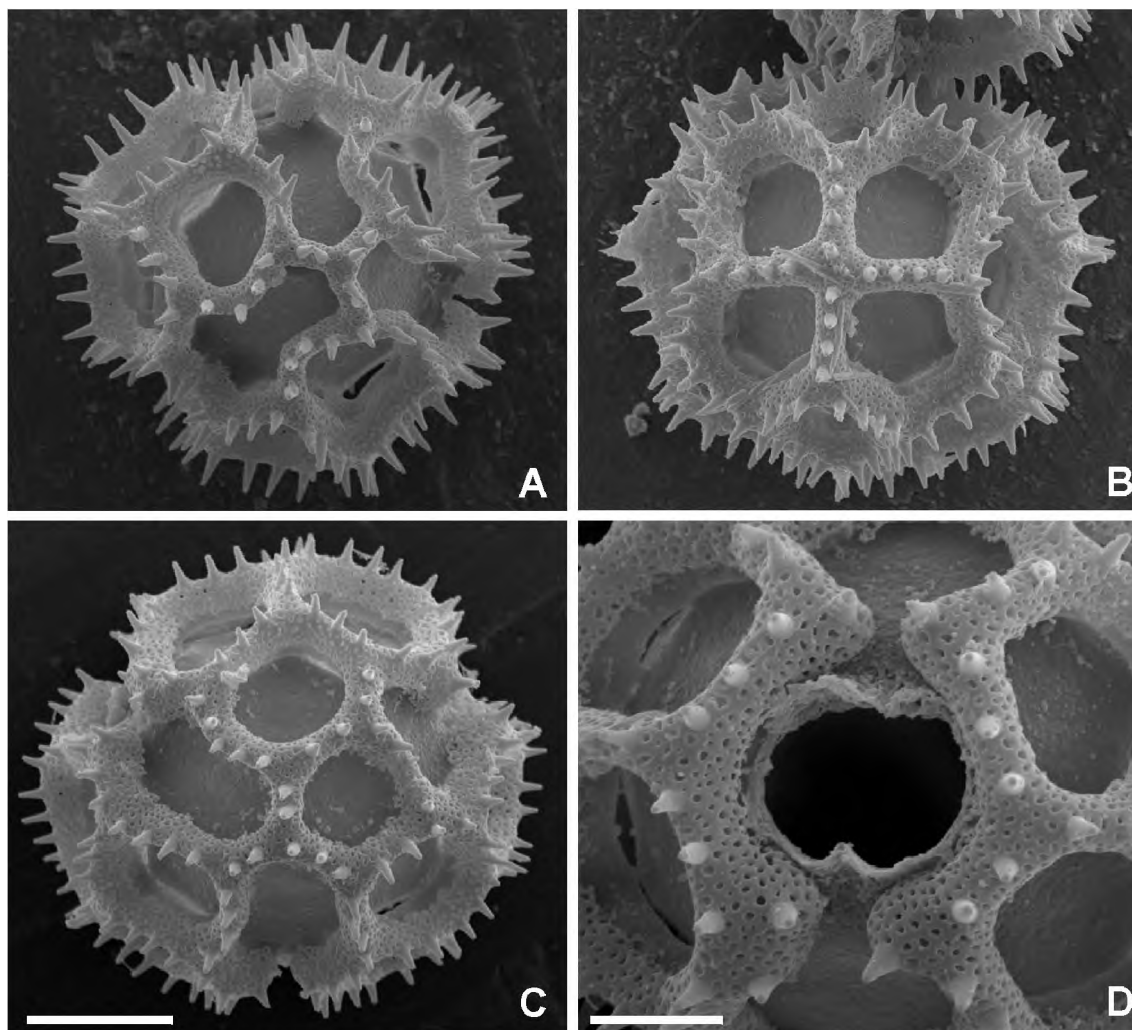


Fig. 3. Granos de polen (microscopio electrónico de barrido) de *Vernonia remotiflora* (A-B) y *V. setososquamosa* (C-D). A, vista polar. B, vista ecuatorial, mesocolpio. C, vista polar. D, vista ecuatorial, detalle del colporo. Escalas: A-C = 10µm, D = 5µm.

fotografías con MEB respectivamente. Este trabajo se realizó mediante el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

BIBLIOGRAFÍA

- Angulo, M. B. & M. Dematteis. 2009. Caryological analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae, Asteraceae). *Plant Biosystems* 142(1): 20-24.
- Angulo, M. B. & M. Dematteis. 2010. Pollen morphology of the South American genus *Lessingianthus* (Vernonieae, Asteraceae) and its taxonomic implications. *Grana* 49 (1): 12-25.
- Cabrera, A. L. 1944. Vernoneias Argentinas (Compositae). *Darwiniana* 6: 265-379.
- Cabrera, A. L. & S. E. Freire. 1999. Asteraceae, *Vernonia*, en F. O. Zuloaga & O. Morrone (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 74: 339-347.
- Cristóbal, C. L. & M. Dematteis. 2003. Asteraceae. XVIII. Tribu I. Vernonieae. *Flora Fanerogámica Argentina* 83: 3-53. Córdoba.
- Dematteis, M. 1996. Estudios cromosómicos en especies argentinas de *Vernonia* (Asteraceae). *Bonplandia* 9 (1-2): 103-110.
- Dematteis, M. 1998. Chromosome studies on *Vernonia flexuosa* and *V. lithospermifolia*. *Compositae Newsletter* 32: 10-16.

- Dematteis, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139(4): 401-408.
- Dematteis, M. 2004. Taxonomía del complejo *Vernonia rubri-caulis* (Vernonieae, Asteraceae). *Bonplandia* 13: 5-13.
- Dematteis, M. & S. M. Pire. 2008. Pollen morphology of some species of *Vernonia* sensu lato (Vernonieae, Asteraceae) from Argentina and Paraguay. *Grana* 47 (2): 117-129.
- Dematteis, M. & C. R. Salgado. 2001. Pollen morphology and chromosome number of *Vernonia rojasii* (Vernonieae, Asteraceae). *Compositae Newsletter* 36: 69-76.
- Dematteis, M.; J. Molero, M. B. Angulo & A. M. Rovira. 2007. Chromosome studies on some Asteraceae from South America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153 (2): 221-230.
- Erdtman, G. 1966. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms*. New York: Hafner.
- Hind, D. J. N. 1993. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil: I. *Kew Bulletin* 48(2): 245-277.
- Jones, S. B. 1979. Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernonieae) in the New World. *Rhodora* 81: 425-447.
- Keeley, S. C. & S. B. Jones. 1979. Distribution of the pollen types in *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). *Systematic Botany* 4: 195-202.
- Keeley, S. C. & R. K. Jansen. 1994. Chloroplast DNA restriction site variation in the Vernonieae (Asteraceae), an initial appraisal of the relationships of New and Old World taxa and the morphology of *Vernonia*. *Plant Systematics And Evolution* 193: 249-265.
- Keeley, S. C. & H. Robinson. 2009. Vernonieae, en V. A. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy & R. J. Bayer (eds.), *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*, pp. 439-469. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- Levan, A.; K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Punt, W.; S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas. 1994. *Glossary of Pollen and Spore terminology*. Utrecht: LPP Foundation, LPP Contributions series N° 1, University of Utrecht, The Netherlands.
- Robinson, H. 1990. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae). VII. The genus *Lepidaploa*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 103 (2): 464-498.
- Robinson, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. *Smithsonian Contributions to Botany* 89: 1-116.
- Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Skvarla, J. J., M. L. DeVoreb & W. F. Chissoe. 2005. Lophate sculpturing of Vernonieae (Compositae) pollen. *Review of Palaeobotany and Palynology* 133: 51-68.