



*Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana*  
(Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización  
cromosómica y cariotípica en poblaciones  
silvestres y genotipos seleccionados en  
programas nacionales de mejoramiento

Sandra N. Vázquez Medina

2014



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

*Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana*  
(Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización  
cromosómica y cariotípica en poblaciones  
silvestres y genotipos seleccionados en programas  
nacionales de mejoramiento

**Sandra N. Vázquez Medina**

**Orientadora:**

**Dra. Cristina Mazzella**  
Profesora Agregada de Genética DT

Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas  
Departamento de Biología Vegetal  
Facultad de Agronomía – Universidad de la República

Abril de 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

- Agradezco en primer lugar a mi orientadora, la Dra. Cristina Mazzella, por darme la oportunidad de incorporarme al equipo de trabajo de su laboratorio y de participar en este proyecto, así como por sus valiosas enseñanzas y por impulsarme en todo momento.
- A las Drs. Gabriela Speroni y Magdalena Vaio, integrantes del tribunal evaluador, por sus valiosos comentarios y sugerencias al corregir este trabajo.
- A Beatriz Vignale por ser promotora de los estudios en Mirtáceas nativas, y junto con Clara Pritsch entusiastas impulsoras del tema.
- A Paola Gaiero, por los valiosos aportes desde su conocimiento académico que me permitieron realizar este trabajo y por la generosa ayuda que en todo momento me brindó.
- A todos los compañeros del Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas y del Laboratorio de Biotecnología por sus actitudes de compañerismo y por el buen clima de trabajo que todos contribuyen a crear.
- A todos los docentes y demás compañeros del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía que de alguna manera han contribuido a mi formación.
- Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a mi familia, especialmente a mis hijos por comprender mis ausencias y a mi padre, con quien compartimos el gusto de andar curioseando entre las plantas y de quien seguramente heredé esta vocación. A ellos dedico este trabajo.

## RESUMEN

Las Mirtáceas *Psidium cattleianum* Sabine (arazá) y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (guayabo del país) nativas de Uruguay, son especies cuyos frutos se caracterizan por su alto valor nutritivo y su gran potencial nutracéutico, y constituyen además una importante fuente de materia prima para diversos usos en la agroindustria. La distribución natural de arazá comprende desde el norte de Brasil hasta Uruguay. Ambos países son a su vez centro de diversidad primario de *A. sellowiana*. En Uruguay, desde el año 2000 se desarrolla un Programa de Selección de Frutas Nativas (Facultad de Agronomía e INIA) conducente a la producción comercial de fruta, a partir de materiales prospectados a nivel nacional, tanto silvestres como cultivados en parques y jardines de establecimientos rurales de diversas regiones del país. Para que estos materiales puedan ser incluidos exitosamente en los sistemas de producción, así como para asegurar la conservación y utilización sustentable de estos recursos, es necesario realizar estudios que permitan caracterizarlos, ya que es muy poca la información disponible sobre las características de sus genomas y sistema reproductivo. Para aportar a esos conocimientos, así como al de la diversidad genética presente, este trabajo tiene como principales objetivos caracterizar citogenéticamente algunos materiales silvestres y varios genotipos ya incluidos en el programa de mejoramiento. Para ello se realizó el análisis cariotípico en relación a número cromosómico, niveles de ploidía y bandeos cromosómicos determinados por la tinción diferencial con los fluorocromos 4',6-diamidino-fenilindol (DAPI) y cromomicina A<sub>3</sub> (CMA).

En *Acca sellowiana* se realizó por primera vez un idiograma de la especie. Se confirmó el carácter diploide de la misma con  $2n = 22$  cromosomas, y se determinó que es un cariotipo simétrico de cromosomas metacéntricos y pequeños. Se aplicó por primera vez en especies de la familia Myrtaceae el bandeo diferencial CMA/DAPI. En *A. sellowiana* se identificó una banda  $CMA^+/DAPI^-$  localizada en un brazo del par cromosómico tres, en su región proximal. En *P. cattleianum*, se trabajó con genotipos provenientes del programa de mejoramiento tanto de la forma que presenta frutos rojos (*P. cattleianum* var. *cattleianum*) y que son heptaploides,  $2n = 7x = 77$ , como de la

forma que presenta frutos amarillos (*P. cattleyanum* f. *cattleyanum*) que resultaron ser octoploides,  $2n = 8x = 88$ . El análisis de plantas silvestres de esta última forma de arazá evidenció, a diferencia del genotipo encontrado en las cultivadas, que eran heptaploides  $2n = 77$ . Este registro es además el primer reporte del citotipo  $2n = 77$  para la forma de frutos amarillos en esta especie. En los tres casos de arazá se trata de cariotipos simétricos, con cromosomas pequeños y metacéntricos. Se lograron identificar bandas  $CMA^+/DAPI^-$  de localización pericentromérica (en el cromosoma tres para la forma de fruto amarillo). También se identificaron bandas  $DAPI^+/CMA^-$  de localización telomérica en uno solo de los brazos de 32 cromosomas en la forma de frutos rojos, y en 40 cromosomas en la forma de frutos amarillos. En el caso de *P. cattleyanum* f. *lucidum*  $2n = 8x = 88$  se aporta el idiograma correspondiente que incluye el bandeo mencionado, primer reporte para esta especie.

Los análisis cariotípicos en ambas especies confirman el número cromosómico básico  $x = 11$  determinado previamente para la familia Myrtaceae, así como el tamaño pequeño de sus genomas. Los datos aquí presentados sobre la organización genómica estructural de ambas especies, son los primeros registros para las plantas presentes en Uruguay, y constituyen en su mayoría contribuciones originales al conocimiento citológico de las Mirtáceas. Siendo las especies sudamericanas de Myrtaceae consideradas como taxones complejos, los aportes aquí realizados podrían también ser contribuciones útiles para la delimitación taxonómica de las mismas.

## TABLA DE CONTENIDOS

---

AGRADECIMIENTOS .....	I
RESUMEN .....	II
TABLA DE CONTENIDOS .....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Taxonomía .....	2
1.2 <i>Acca sellowiana</i> (Berg.) Burret., “guayabo” o “guayabo del país” .....	7
1.3 <i>Psidium cattleianum</i> Sabine, “arazá” o “arazá de arbusto” .....	9
1.3.1 Biología reproductiva y estudios cromosómicos .....	11
1.4 OBJETIVO GENERAL .....	18
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
2.1 Materiales .....	20
2.1.1 Mantenimiento de las planta .....	22
2.2. Metodología para los análisis citogenéticos .....	23
2.2.1. Procesamiento de raíces y obtención de preparaciones citológicas .....	23
2.2.2. Tinción secuencial CMA/DAPI .....	25
2.2.3. Análisis de los preparados .....	26
<b>3. RESULTADOS</b> .....	28
3.1. Metodología de análisis citogenético .....	29
3.2. <i>Acca sellowiana</i> (Berg.) Burret .....	30
3.3. <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>cattleianum</i> (de fruto rojo)cultivadas .....	35
3.4. <i>Psidium cattleianum</i> f. <i>lucidum</i> (fruto amarillo) cultivadas .....	40
3.5. <i>Psidium cattleianum</i> f. <i>lucidum</i> de poblaciones silvestres .....	47
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	49
4.1 Metodologías citogenéticas para el estudio de las dos especies de Mirtáceas. 51	
4.2. Análisis cromosómicos .....	53
4.2.1 Análisis cromosómicos en <i>Acca sellowiana</i> (Berg.) Burret .....	54
4.2.2 Análisis cromosómicos en <i>Psidium cattleianum</i> Sabine .....	57
4.2.2.1 Tamaño y morfología cromosómica de <i>P. cattleianum</i> .....	58
4.2.2.2 Doble tinción diferencial con fluorocromos CMA y DAPI .....	60
4.2.2.3 Contenido en picogramos de ADN .....	64
4.2.2.4 Poliploidía en <i>Psidium cattleianum</i> Sabine .....	68
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	74
<b>7. ANEXOS</b> .....	82

# 1.INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

La flora nativa del Uruguay cuenta con varias especies productoras de frutos comestibles, entre ellas varias de la familia Myrtaceae, muchas de las cuales son de consumo familiar tradicional. Representan un campo a ser explorado con la finalidad de realizar su explotación comercial. Estas especies constituyen un valioso recurso genético que puede adquirir importancia económica, ya que brindan al mercado la posibilidad de ofrecer al consumidor nuevos productos que permitan el enriquecimiento de la dieta con productos beneficiosos para la salud, a la vez que ofrecen a los productores una alternativa para diversificar la producción. Para que estos frutos puedan ser integrados a los sistemas productivos es necesario evaluar sus características agronómicas relacionadas con la adaptación de las especies a los medios de cultivo, y optimizar las técnicas de propagación y cultivo para garantizar a los productores la rentabilidad económica. Por otra parte, para que puedan ser comercializados con éxito en el mercado, es necesario el mejoramiento de algunas de sus características, como por ejemplo su tamaño, sabor y aspecto, para que resulten atractivos al consumidor. Para esto, es imprescindible un mayor conocimiento de las especies de nuestra flora, ya que en general son escasos los estudios relativos a la biología reproductiva y a la diversidad genética presente en las especies nativas, que pueden aportar información para el diseño e implementación de estrategias de mejoramiento genético (Vignale y Bisio, 2005; Cabrera et al., 2008).

### 1.1. Taxonomía

La familia Myrtaceae Juss. es una de las mayores familias botánicas con 5671 especies reconocidas, agrupadas en 132 géneros (Govaertset al., 2014) con amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales (**Fig. 1**). De acuerdo con el tipo de frutos, ha sido tradicionalmente subdividida en dos subfamilias: Leptospermoideae (especies con frutos secos) con centro de distribución en Australia y sudeste de Asia, y Myrtoideae (frutos carnosos), con centro de diversidad en la región tropical y subtropical de Sudamérica; la familia se encuentra poco representada en el continente africano (Wilson, 2001). En

base al análisis reciente de secuencias de ADN *matK* en 81 especies de Myrtaceae, se ha propuesto una nueva clasificación, reagrupando los géneros de la familia en las subfamilias Myrtoideae (con 15 tribus) y Psiloxylloideae (con sólo dos tribus monogénicas) (Wilson et al., 2005).

Todas las especies neotropicales de Mirtáceas pertenecen a la tribu Myrteae de la subfamilia Myrtoideae, con distribución en toda América tropical y subtropical (Berg, 1855-1856; Berg, 1857-1859); McVaugh, 1968; Wilson, 2005). La tribu Myrteae, considerada la más diversificada dentro de la familia, comprende 49 géneros y unas 2500 especies, caracterizadas por sus frutos carnosos indehiscentes (Lucas, 2007). Los taxa de frutos carnosos tienen en América del Sur su principal centro de radiación (Sobral, 2003).

**Figura 1.** Distribución natural de la familia Myrtaceae (Jolochin, 2008)



Se han realizado estudios filogenéticos en base al análisis de secuencias de ADN nuclear (ITS, ETS) y plastidial (*psbA-trnH, matK*) de 75 especies la tribu Myrteae, comprendiendo 31 géneros, y se ha propuesto la subdivisión en seis grupos subtribales informales; de éstos, el grupo Pimenta es el que incluye a los géneros *Psidium* y *Acca*, que junto a los géneros *Campomanesia* y *Pimenta* constituyen un grupo monofilético (Lucas et al., 2007; Costa, 2009). El género *Psidium* L. se distribuye desde México y el Caribe hasta Uruguay y norte de Argentina (Landrum 1997). Dentro de este género se distinguen 92 especies según los más recientes registros (Govaerts et al., 2008), 4 de las cuales se distribuyen en nuestro país, ellas son: *P. luridum* (“arazá rastrero”), *P. incanum* (“guaycurú”, “arazá rastrero”), *P. pubifolium*, *P. cattleyanum* (“arazá”, “arazá de arbusto”); las tres primeras sufruticosas, muy comunes en todo el país, y la última arbustiva, presente sólo en los departamentos de Cerro Largo, Rocha y

Treinta y Tres (Legrand, 1968). Según Costa (2009), las especies del género *Psidium* L. se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes biomas y sometidas a diferentes presiones ambientales que ocasionan una gran plasticidad fenotípica, y dificultan la delimitación e identificación de especies; razón por la cual es necesario realizar estudios más profundos de caracterización en estas especies.

El género *Acca* está compuesto por tres especies: *Acca macrostema* y *Acca lanuginosa* que se distribuyen en la región andina de Perú, y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret de distribución en la región este de Sudamérica (Landrum, 1997). *Acca sellowiana* (Berg.) Burret es entonces la única especie nativa representante de este género en nuestro país (Legrand, 1968; Brussa y Grella, 2007).

Entre las especies nativas de Uruguay con mayor potencial para ser incluidas en programas de domesticación, selección y mejoramiento genético conducente a la producción comercial de fruta se destacan algunas Mirtáceas de frutos carnosos (tribu Myrteae), como el guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret), el arazá (*Psidium cattleianum* Sabine), la pitanga (*Eugenia uniflora* L.), el guaviyú (*Myrcianthes pungens* (Berg.) Legr.) y el ubajay (*Hexachlamis edulis* (Berg.) Legr. et Kaus). Las dos que han sido identificadas por Vignale y Bisio (2005) como más promisorias para ser incorporadas a los sistemas de producción son el guayabo del país y el arazá. De esta última se conocen dos formas: *Psidium cattleianum* f. *lucidum* descrita por Degener (1939) con frutos amarillos y la forma típica *Psidium cattleianum* var. *cattleianum* de frutos rojos. Tanto el guayabo como el arazá, han sido incorporadas al Programa de Selección de Frutas Nativas con potencial comercial que lleva adelante la Facultad de Agronomía desde el año 1998, y al cual un par de años después se incorporaron el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Dicho programa tiene por objetivos estudiar la diversidad genética, el valor agronómico y el potencial comercial, tendiente a la selección, conservación y utilización sustentable de las especies identificadas como más promisorias. Con dicha finalidad se realizó una prospección en parques, jardines, quintas frutales y áreas silvestres en todo el país, que tuvo como

principal criterio de selección la detección de fruta de buen nivel de calidad para consumo fresco e industrialización. Las plantas seleccionadas se encuentran instaladas en los jardines de introducción de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía en Salto (EEFAS) y en INIA en la Estación Experimental Las Brujas en Canelones. Allí se estudian las características de adaptación al cultivo sistematizado, la fenología vegetativa y reproductiva, así como la producción y calidad de fruta (calibre, color, firmeza, porcentaje de pulpa, características de la pulpa, número de semillas, sólidos solubles, acidez). Los ejemplares introducidos han tenido buen desarrollo y buena sanidad, tanto en planta como en fruto. Se ha observado gran diversidad genética en guayabo, a nivel vegetativo, de producción y calidad de fruta; en cambio ha sido escasa la variabilidad en la descendencia obtenida por semilla en arazá (Vignale y Bisio, 2005). Dentro del Programa de Selección de Frutos Nativos, el guayabo es la especie en la que se han realizado mayores avances en cuanto a su estudio. Complementariamente a las evaluaciones realizadas en EEFAS e INIA, se han realizado prospecciones de la especie en estado silvestre y en variedades locales.

En el mercado es creciente el interés por estas especies, debido a la variedad de destinos a la que se ajustan en la agroindustria, su valor nutritivo, junto con la necesidad de diversificar y diferenciar la oferta de frutas en el mercado (Vignale y Bisio, 2005). Estos frutos nativos representan una fuente de propiedades antioxidantes y nutraceuticas muy importantes, comparables o superiores a otros frutos (Feippe, 2010). Los primeros estudios realizados por INIA en los frutos de plantas seleccionadas de arazá han mostrado que los mismos, además de su valor nutritivo, son una importante fuente natural de antioxidantes, que inciden en la disminución del riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estas cualidades nutritivas y benéficas para la salud son muy apreciadas actualmente por los consumidores (Cabrera et al., 2008).

Los frutos de arazá, en su madurez desarrollan un alto nivel de aroma característico que los diferencia claramente de otros frutos silvestres, y presentan un alto contenido de azúcares y baja acidez. Estas características hacen que sean frutos muy apetecibles en estado fresco, y a la vez constituyen

una excelente materia prima para la preparación de mermeladas, licores y aromatizantes; se industrializan muy bien, siendo la jalea y la pasta que se obtiene de muy buena calidad. Según Raseira y Raseira (1996), el arazá presenta óptimas perspectivas de cultivo, debido al sabor agradable de sus frutos, su alto contenido de vitamina C, con índices 3 o 4 veces mayores que los encontrados en naranja, además de su bajo costo de producción y alta productividad. El arazá puede ser usado por la agroindustria para la fabricación de jugos, helados jaleas, dulces y licores (Benevenga et al., 2012).

Los frutos de guayabo tiene un valor nutricional muy importante por su alto contenido en vitamina C y en yodo (Cabrera et al., 2008). Pueden ser consumidos en estado fresco o utilizados para la elaboración de dulces, jaleas, licores, yogurt, helados. Según Martínez et al. (2010), también son ricos en metales de importancia a nivel nutricional (Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Co, Se, P), cuyos valores superan ampliamente los encontrados en otras frutas consumidas en nuestro país como es el caso de ananá, banana, ciruela blanca, durazno, frutilla, higo, limón, mandarina, melón, membrillo, naranja, pera, pomelo y sandía. También se ha detectado que poseen actividad antibacterial, antioxidante y antialérgica (Vidal, 2011). Sus flores también pueden ser consumidas por humanos, poseen agradable sabor y son utilizadas como decoración en ensaladas y repostería.

Tanto el guayabo como el arazá son utilizados como plantas ornamentales. El guayabo se destaca como excelente planta ornamental por su porte, follaje y floración (Brussa y Grela, 2007), y el arazá por el hermoso aspecto de su follaje espeso y brillante (Legrand, 1968). Ambas especies son estudiadas y explotadas en la región, principalmente en Brasil desde hace décadas, dentro de los programas de investigación de frutos nativos. Dentro de las especies nativas del sur del Brasil, el arazá fue seleccionado por productores como una especie que presenta alto potencial para el aprovechamiento a corto plazo (Franzon et al., 2009). La empresa Embrapa Clima Temperado, situada en Pelotas – RS inició una colección de especies frutales nativas de Rio Grande do Sul y otros estados del sur, con el objetivo de seleccionar germoplasma más promisorio para un futuro aprovechamiento a escala comercial. Entre ellas se colectaron semillas de arazá en distintos puntos de Rio Grande do Sul y en el

sur de Paraná. A partir de las colectas realizadas se constató la presencia de gran diversidad intraespecífica según la distribución geográfica de las plantas, en relación a caracteres morfológicos, fenológicos y de calidad de frutos. Los trabajos de selección de genotipos resultaron en el lanzamiento de dos cultivares de *P. cattleyanum*: “Ya-cy” (productora de frutos amarillos) y a “Irapuã” (productora de frutos rojos). Esos cultivares son plantados en huertos comerciales en Rio Grande do Sul, pero en pequeña escala (Raseira y Raseira, 1996).

Un estudio comparativo entre las propiedades químicas y actividad antioxidante en ambos cultivares de arazá (“Irapuã” de fruto rojo y “Ya-cy” de fruto amarillo) reveló que el fenotipo de frutos rojos presenta mayor contenido de compuestos fenólicos, altamente correlacionados con la actividad antioxidante (Biegelmeier et al., 2011).

## **1.2. *Acca sellowiana* (Berg) Burret., “guayabo” o “guayabo del país”**

Es un árbol pequeño de 2 a 4 metros de altura, de corteza escamosa rojiza, con follaje perenne y vistosas flores; un tomento corto blanquecino recubre los botones florales, pedúnculos, ramas jóvenes y hojas en la cara abaxial; posee hojas simples, opuestas, subcoriáceas, obovadas, ovoides o elípticas; sus flores se encuentran sobre pedúnculos unifloros axilares; el cáliz tiene 4 sépalos y la corola 4 pétalos carnosos, redondeados, color blanco-ceroso por fuera y rojizo por dentro, de sabor dulzón. Presenta estambres de filamentos rojos y anteras amarillas. Sus frutos son de tipo baya, ovoides, de color verde al madurar, pulposos y de agradable sabor. Las aves se alimentan de sus flores y de sus frutos (Legrand, 1968; Brussa y Grela, 2007). Según Brussa y Grela (2007) se han usado como sinónimos de esta especie los siguientes nombres: *Orthostemon sellowianus* O. Berg; *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg; *Feijoa obovata* (O. Berg) O. Berg.

Su distribución geográfica natural abarca los estados de Paraná, el altiplano de Santa Catalina y Río Grande do Sul en Brasil (Landrum, 1997), en el norte de Argentina y en Uruguay se encuentra en la región norte y más común aún en el

noreste (Brussa y Grela, 2007). Habita terrenos quebrados o pedregosos y montes ribereños (Legrand, 1968), en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo, este de Artigas y Salto, y el norte de Treinta y Tres, y debido a que su cultivo está muy extendido es común que se lo encuentre en otras partes del país, a veces en forma espontánea como en los departamentos de Maldonado y Canelones (Brussa y Grela, 2007). La distribución natural en Uruguay de esta especie se puede observar en el mapa de la **Figura 2 a**, donde las regiones de tono más oscuro indican mayor abundancia de plantas.

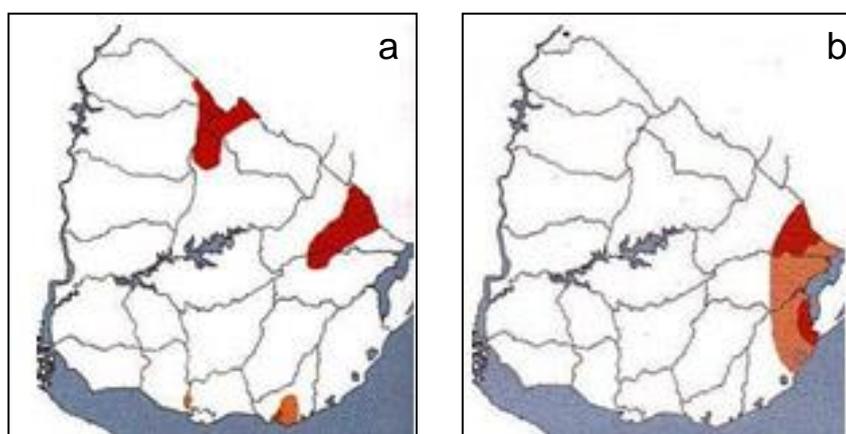
En Uruguay, el período de floración es prolongado, se extiende desde el mes de octubre y hasta mediados de noviembre (primavera hasta comienzos del verano) y, dependiendo de la zona del país, la época de cosecha abarca desde fines de febrero en el norte del país hasta mayo en plantas cultivadas en el sur (Cabrera et al., 2008; Vignale, 2005; Brussa y Grela, 2007).

Es una especie predominantemente alógama (Ducroquet et al., 2000), por lo cual es esperada una alta variabilidad genética en la descendencia por semillas que dificulta la conservación de características de interés agronómico (Vignale y Bisio, 2005; Mara, 2012). Por esta razón se vienen desarrollando diversas investigaciones relacionadas con la exploración de distintas técnicas de propagación vegetativa de esta especie que permita obtener uniformidad en la descendencia para la conservación y multiplicación de genotipos seleccionados (Salvarrey, 2008).

También se han realizado avances en estudios para caracterizar la diversidad genética de materiales nacionales, tanto cultivados como silvestres, mediante análisis de caracteres morfológicos y moleculares (Puppo, 2008; Quezada, 2008; Baccino, 2010). Los estudios realizados indicaron altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, como era de esperar para una especie con tipo de reproducción alógama, y siendo Uruguay centro de diversidad primario de la especie. Esta diversidad representa un importante recurso para los programas de mejoramiento. A su vez, recientemente se ha publicado el primer mapa genético integrado para la especie empleando para su construcción marcadores moleculares (27 ISSR y 192 AFLP), el cual constituye una valiosa herramienta para ser utilizada en el desarrollo de

programas de mejoramiento tanto de *Acca sellowiana* como de especies emparentadas, así como también para facilitar la comprensión de la organización genómica de este grupo de Mirtáceas (Quezada et al., 2014).

*Acca sellowiana* es una especie diploide de número cromosómico  $2n = 22$  (Bowden, 1945; Atchison, 1947; Costa, 2008). El tamaño del genoma nuclear de esta especie fue determinado por primera vez, utilizando citometría de flujo, por Costa (2008) en plantas cultivadas en Campinas, Brasil, encontrando un valor de  $2C = 0,503$  pg. En plantas cultivadas en la EEFAS de Uruguay el valor obtenido fue de  $2C = 0,74$  pg (Pritsch et al., 2010).



**Figura 2.** Distribución natural en Uruguay **a.** *Acca sellowiana* (Berg.) Burret; **b.** *Psidium cattleianum* Sabine. (Brussa y Grela, 2007).

### 1.3 *Psidium cattleianum* Sabine, “arazá” o “arazá de arbusto”

Esta especie se compone de arbustos de 1,5 a 3 metros de altura, de follaje denso y brillante, con tronco y ramas de corteza lisa algo dehiscente y de color canela; tiene hojas, obovadas u obovado-oblongas, coriáceas o subcoriáceas; sus flores son de color blanco, con numerosos estambres, y se presentan sobre pedúnculos unifloros cortos o nulos, frecuentemente en nudos áfilos de ramas jóvenes. El cáliz es concrecente obtusamente dentado 4-5 –dentado en el ápice. El fruto es una baya globosa, que puede ser de color rojo o purpúreo-violácea, o de color amarillo de 2,5 cm de diámetro y de sabor agridulce. Las formas de frutos amarillos presentan hojas de mayor tamaño que la variedad de frutos rojos, con semillas más pequeñas, óseas y numerosas (Legrand,

1968; Sobral, 2003). Es interesante indicar que Sobral (2003) sólo menciona para Uruguay presencia silvestre de plantas de frutos amarillos; mientras que Legrand (1968) expresa que ignora la existencia de esta variedad en territorio uruguayo. Brussa y Grela (2007) indican que existen de ejemplares de fruto amarillo y de fruto rojo violáceo. Según estos últimos autores se han usado como sinónimos de la especie los siguientes: *Psidium coriaceum* O. Berg; *Psidium littorale* Raddi; *Psidium variabile* O. Berg.

La distribución geográfica natural de la especie *P. cattleyanum* comprende el litoral del Brasil, desde Espíritu Santo hasta Río Grande, llegando escasamente a la zona serrana del Uruguay entre Cerro Largo y el norte de Treinta y Tres, aunque un ejemplar fue hallado más al sur, en la Sierra de San Miguel (Legrand, 1968). Según este autor, las especies de fruto comestible tienen un hábitat parcialmente condicionado por el factor humano, y a veces es posible ver algún ejemplar completamente fuera de sus regiones naturales como planta subespontánea. Estudios recientes de Grela (2004), establecen que esta especie se encuentra distribuida en zonas disyuntas: en la Sierra de Ríos y al sur de la Laguna Merín, en las Sierras de San Miguel y alrededores de la Laguna Negra. Según Brussa y Grela (2007) su hábitat típico son los bosques de quebradas en serranías, tanto de Cerro Largo, Treinta y Tres como Rocha (**Fig. 2 b**).

Son escasas las colectas realizadas en condiciones naturales en territorio uruguayo, ejemplares con ambos tipos de frutos han sido colectados por diversos investigadores desde 1904 hasta 1999. Se trata de ejemplares distribuidos en parte de la región este del territorio nacional, que incluyen bosques nativos de los Departamentos de Cerro Largo y Rocha. El resto del material depositado en el Herbario Bernardo Rosengurt de la Facultad de Agronomía, Montevideo (MVFA), proviene de jardines y parques. Prospecciones realizadas recientemente por los Drs. Gabriela Speroni y Mauricio Bonifacino (Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República) en la primavera del 2011 y cubriendo buena parte del territorio de Uruguay, permitieron confirmar la presencia de poblaciones silvestres en las regiones de distribución antes citadas. Hoy hay un total identificado de 10 poblaciones de entre 12 y 30 individuos cada una distribuida en bosques nativos de los

departamentos de Rocha, Treinta y Tres y Cerro Largo, todas de frutos amarillos. Se ha iniciado así un exhaustivo ingreso de ejemplares herborizados con muestras de ramas, frutos, semillas, botones florales de las 10 poblaciones de arazá identificadas y georreferenciadas (M Bonifacino, com. pers.).

### **1.3.1. Biología reproductiva y estudios cromosómicos**

Son escasos los estudios sobre biología reproductiva de especies de la familia Myrtaceae, especialmente del género *Psidium* L. (Franzon, 2009) y en particular en la especie *Psidium cattleianum* existen pocos datos y muchas veces resultan contradictorios entre sí.

Los estudios de *P. cattleianum* se han realizado hasta ahora fundamentalmente en Brasil, debido quizá a su importancia económica en dicho país. De acuerdo con esos estudios, en condiciones naturales en el sur de Brasil florece en primavera, de octubre a noviembre. Pero, en cultivo fueron observadas dos épocas principales de floración, y a veces una tercera. La primera ocurre entre fines de setiembre y octubre, la segunda en diciembre y la tercera en marzo, aunque con la llegada del invierno no se produce la maduración de los frutos en esa tercera floración (Raseira y Raseira, 1996).

En Uruguay, la floración de *P. cattleianum* se observa durante el mes de octubre hasta principios de noviembre, pudiendo existir una segunda floración en diciembre. La cosecha del arazá se realiza en el mes de febrero y marzo dependiendo de la fecha de floración, pudiéndose cosechar en varias pasadas a medida que van madurando (Cabrera, 2008). En los frutos fueron encontrados entre 16 y 100 semillas (Sanchoyene, 1989). Actualmente y en el marco de los avances de una tesis que se lleva adelante con el objetivo de determinar el sistema reproductivo de esta especie con plantas cultivadas de Uruguay, se identificaron 21 taxa de insectos visitando flores de materiales de frutos rojos y amarillos, correspondientes a Himenópteros, Dípteros y Coleópteros. (M Souza, com. pers.)

*P. cattleianum* se propaga fácilmente por semillas. Raseira y Raseira (1995) obtuvieron tasas de germinación encima del 95 %, y las semillas mantuvieron

la viabilidad por hasta un año de almacenamiento. Se ha observado escasa variabilidad en la descendencia proveniente de semillas tanto en materiales nacionales como en los analizados en Brasil (Raseira y Raseira, 1995; Vignale y Bisio, 2005), probablemente por el hecho de que buena parte de las semillas es producida por apomixis (Franzon, 2009). Por otra parte, se ha identificado una gran variabilidad en relación a características morfológicas de plantas de distintas poblaciones de esta especie según su distribución geográfica (Raseira y Raseira, 1995). En una prueba o test de polinización realizado en cuatro tipos de arazá brasileros en Embrapa Clima Temperado (Raseira y Raseira, 1996), el porcentaje de fructificación obtenido por autopolinización siempre fue menor que aquella obtenida por polinización libre. También ocurrió fructificación cuando las flores fueron emasculadas y no fueron polinizadas, lo que indicaría que ocurre formación de frutos sin fertilización; eso puede ser explicado por la ocurrencia de apomixis.

En Uruguay, estudios realizados sobre materiales cultivados en la EEFAS durante la primavera de 2011 evidenciaron una muy baja viabilidad de polen tanto en materiales de frutos rojos como amarillos. En los materiales de frutos amarillos alcanzó un 42 % y en materiales de frutos rojos resultó nula en varias flores (Speroni et al., 2012).

Los estudios cromosómicos en la familia Myrtaceae se han realizado principalmente en especies de la antigua subfamilia Leptospermoideae, siendo escasos todavía en las especies de distribución en Sudamérica (Atchison, 1947; Rye, 1979; Matsumoto, 2000; Costa, 2004); dentro de la tribu Myrteae sólo se han analizado apenas el 4,1 % de las especies, que representan a la mitad de los géneros de esta tribu (Costa, 2009). Los análisis cariotípicos realizados frecuentemente se limitan a conteos cromosómicos, aportando poca información sobre la morfología de los mismos u otras características distintivas (Costa, 2009). Los escasos análisis han revelado que las especies estudiadas poseen cromosomas pequeños con predominancia de metacéntricos. La falta de información cariológica en este grupo es posiblemente debido a que los cromosomas son muy pequeños, dificultando la identificación de los diferentes pares, así como la localización de constricciones primarias y secundarias (Matsumoto, 2000; Costa, 2004).

La gran uniformidad cariotípica encontrada entre las especies australianas (Eucalypteae) (todas con cariotipos simétricos con todos los cromosomas metacéntricos) (Atchison, 1947; Rye, 1979; Matsumoto, 2000; Mora, 2005), contrasta con los cariotipos moderadamente simétricos, en comparación, determinados en la tribu Myrteae, donde se han detectado cariotipos con cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (Viajayakumar & Subramanian, 1985; Costa & Forni-Martins, 2007b; Coser, 2012). La variabilidad cromosómica encontrada sugiere que el análisis cariotípico de las especies de la tribu Myrteae puede ser útil para la caracterización de otras especies dentro de la misma familia (Costa & Forni-Martins, 2007b).

A partir de estos estudios, se ha determinado un número cromosómico básico para la familia de  $x = 11$ . En general, las Mirtáceas muestran poca variación en el número cromosómico, observándose la constancia de  $2n = 22$  en la mayoría de los géneros (Atchison, 1947; Rye, 1979; Matsumoto, 2000; Costa, 2004; Costa y Forni-Martins, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b; Costa, 2009). Rye (1979) destaca que el número cromosómico de la familia se ha mantenido constante en contraste con la gran diversidad ecológica y morfológica que presenta. Los estudios realizados en Mirtáceas neotropicales confirman el predominio de  $2n = 22$  (Forni-Martins, 2000; Costa, 2004; Costa y Forni-Martins, 2006a, 2006b, 2007a), aunque en la tribu Myrteae es frecuente la poliploidía (Rye, 1979), especialmente en los géneros *Eugenia* y *Psidium* donde el 21 % y 75 % respectivamente de las especies analizadas, son poliploides (Costa y Forni-Martins, 2007a). En el género *Psidium* se han identificado especies con  $2n = 22, 33, 44, 55, 66, 77, 88$  (Andrade y Forni-Martins, 1998; Costa y Forni-Martins, 2006a; 2006b; 2007a), y recientemente Costa et al. (2013) identificaron un material perteneciente al género *Psidium* pero sin determinación específica que posee  $2n = 99$ .

También se han encontrado en Myrteae varias especies donde es frecuente la existencia de citotipos diferenciados por el nivel de ploidía (Costa y Forni-Martins, 2006b); es el caso de la especie *Psidium cattleyanum* donde se han determinado los citotipos  $2n = 44, 66, 77$  y  $88$  (Singhal, 1985; Atchison, 1947; Costa y Forni-Martins, 2006a; Costa, 2009). En esta especie no ha sido identificado hasta ahora el citotipo diploide  $2n = 22$ . En la **Tabla 1** se presentan

los citotipos reportados para la especie *Psidium cattleianum*, así como el color de fruto y el origen cuando es especificado por los investigadores.

Dentro de los cultivos frutales de especies nativas en Brasil, el de *P. guajava* es uno de los más importante económicamente, por lo que en esta especie es donde se han realizado la mayor cantidad de estudios, y de la que se dispone de una descripción cariotípica más detallada (Vijayakumar & Subramanian, 1985). Estos autores analizaron el cariotipo de tres cultivares de *P. guajava* y encontraron que uno de ellos considerado normal, produce semillas y siempre tiene 22 cromosomas, un segundo cultivar, que suponen de origen híbrido, presenta 22 o 44 cromosomas y no produce semillas, y un tercer cultivar caracterizado por poseer hojas muy pequeñas tiene individuos con 22 y otros con 33 cromosomas que también es considerado de posible origen híbrido.

La poliploidía es reconocida como una de las principales fuerzas evolutivas en las Angiospermas; es frecuentemente asociada con hibridación interespecífica seguida de duplicación cromosómica para restaurar la fertilidad del híbrido (Soltis, 2009). Según Costa (2009) la ocurrencia de especies híbridas y de poliploides es común en varios géneros de Myrteae; este mismo autor propone un posible origen híbrido para el citotipo hexaploide de la especie *Psidium cattleianum* basado en análisis realizados con las técnicas de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de citometría de flujo.

La taxonomía de la familia Myrtaceae aún continúa siendo estudiada ya que es muy compleja. Sus especies son de difícil identificación y delimitación, aún en las determinaciones de género, y sus relaciones filogenéticas varían considerablemente con las diferentes clasificaciones (Jolochín, 2008). Costa y Forni-Martins (2006b) atribuyen parte de la complejidad y dificultad en la delimitación taxonómica de algunas Mirtáceas presentes en Brasil a la existencia de eventos de hibridación natural, conduciendo a la presencia de caracteres intermedios entre especies cercanas que dificultan su clasificación.

En nuestro país, *Psidium cattleianum* es una especie nativa poco estudiada aún, no existen estudios cromosómicos previos, por lo cual este trabajo constituye el primer abordaje para conocer las características genómicas de nuestros materiales en relación a conteos cromosómicos, análisis cariotípicos y

contenido de ADN. A su vez, este análisis se enmarca dentro del proyecto “Estudios biológicos y taxonómicos en la especie frutal nativa *Psidium cattleianum*” (responsable G. Speroni), en el cual se plantean estudios básicos de biología floral y modo de reproducción en materiales cultivados, empleando el análisis de caracteres morfológicos, funcionales y moleculares, así como también estudios taxonómicos que permitan describir y registrar la variabilidad en las poblaciones nativas. Este proyecto incluye también los estudios biogeográficos realizados que permitieron confirmar la presencia de la especie en el país (Speroni *et al.*, 2012). La información generada permitirá obtener un mayor conocimiento sobre el modo de reproducción de la especie que pueda ser empleado en programas de manejo y mejoramiento. En este sentido, los estudios citogenéticos que se plantean realizar en el presente trabajo tienen como finalidad realizar aportes que contribuyan a la interpretación de la biología reproductiva de la especie e identificar marcadores que puedan ser utilizados para caracterizar la diversidad presente, mediante técnicas de citogenética clásica y molecular.

En relación al tamaño del genoma nuclear, existen registros del contenido de ADN de esta especie para plantas cultivadas en UNICAMP, Campinas, Brasil, de citotipo  $2n = 44$  de frutos amarillos y en un citotipo  $2n = 66$  de frutos rojos de plantas cultivadas en Rio de Janeiro, Brasil, siendo los valores encontrados de  $2C = 1,053 \pm 0,04$  pg y  $2C = 2,91$  pg, respectivamente (Costa, 2008). En análisis recientes realizados en plantas cultivadas en la EEFAS de Uruguay, tanto de frutos rojos como de frutos amarillos, se encontraron diferencias en el contenido de ADN, siendo de  $2C = 3,7$  pg y  $2C = 4,25$  pg, respectivamente (Speroni *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** *P. cattleyanum* Sabine: (\*) Nombre de la especie como fue citado originalmente; números cromosómicos; Fruto: color de fruto; orígenes (BR: Brasil)

<i>P. cattleyanum</i>	<b>88</b>	rojo	-	Atchison, 1947	Bailey Hortorium, BEF 9968-42 EA1
<i>P. cattleyanum</i> var. <i>lucidum</i>	<b>88</b>	amarillo	-	Atchison, 1947	Bailey Hortorium, BEF 9969-42 EA2
<i>P. variabile</i>	<b>88</b>	-	-	Atchison, 1947	Bailey Hortorium, BEF 6821-39 EA3
<i>P. cattleyanum</i>	<b>77</b>	rojo	Hawaii	Hirano & Nakasone, 1969	
<i>P. cattleyanum</i> f <i>lucidum</i>	<b>66</b>	amarillo	Hawaii	ídem	
<i>P. coriaceum</i>	<b>77</b>	-	Cultivada, India	Singhal, 1985	
<i>P. cattleyanum</i>	<b>66-77</b>	rojo	Zona Sur de RS BR	Raseira & Raseira, 1995	“Roxo sudeste”
<i>P. cattleyanum</i>	<b>88</b>	rojo	Planalto Central, RS (Ijuí, Passo Fundo), BR	Raseira & Raseira, 1995	“Roxo planalto”
<i>P. cattleyanum</i> Afzel ex. Sabine	<b>66</b>	rojo	Itatiaia RJ, BR	Costa, 2009	IRC 606
<i>P. cattleyanum</i>	<b>66</b>	amarillo	Planalto Central, RS (Ijuí, Passo Fundo), BR	Raseira & Raseira, 1995	“Amarelo planalto”
<i>P. cattleyanum</i>	<b>66</b>	amarillo	Zona litoral, Pelotas, BR	Raseira & Raseira, 1995	“Amarelo litoral”
<i>P. cattleyanum</i>	-	amarillo	Sur de Paraná, BR	Raseira & Raseira, 1995	“Amarelo Paraná”
<i>P. cattleyanum</i>	<b>44</b>	amarillo	cultivada, SP Campinas, BR	Costa, 2006	IRC 486
<i>P. cattleyanum</i>	<b>44</b>	amarillo	Cananeia SP, BR	Costa, 2006	C. Urbanetz 153
<i>P. cattleyanum</i>	<b>44</b>	-	Sete Barras SP, BR	Costa, 2006	IRC 523
<i>P. cattleyanum</i> Afzel ex. Sabine	<b>44</b>	amarillo	cultivada, SP Campinas, BR	Costa, 2008, 2009	IRC 489, IRC 477

Como hemos dicho previamente, en Uruguay son escasos los estudios de las especies de nuestra flora nativa. Con la finalidad de conocer los recursos fitogenéticos que presenta nuestro país, se requiere de estudios específicos que ayuden a comprender la taxonomía de las plantas nativas, los aspectos relacionados con su biología reproductiva y la variabilidad genética presente. Estos conocimientos son fundamentales para el diseño de programas de mejoramiento, conservación y la utilización sustentable de los recursos. La domesticación y desarrollo de las especies en su centro de diversidad utilizando la amplia base genética disponible, permite importantes avances en el mejoramiento genético y en la selección de materiales con potencial uso en programas de mejoramiento de cultivos comerciales (Vignale y Bisio, 2005).

En el caso de especies frutales nativas, es muy poca la información disponible sobre las características de sus genomas por lo que es necesario desarrollar líneas de trabajo de estudios genómicos que acompañen los esfuerzos en mejoramiento genético convencional (Pritsch et al., 2010). Conocer la organización genómica estructural y la variabilidad determinada por marcadores cromosómicos, así como otros datos que puedan aportar al conocimiento de su biología reproductiva, son importantes para la inclusión de genotipos de estas especies en programas de mejoramiento. En este sentido, la información sobre el número y estructura del juego de cromosomas, el nivel de ploidía, el tamaño del genoma, la localización de determinadas secuencias en los cromosomas y el comportamiento de los cromosomas durante la formación de los gametos contribuye a la caracterización citogenética de las especies, facilitando la identificación y utilización de genes de interés en los procesos de mejoramiento (Pritsch et al., 2012). Estos conocimientos pueden ser útiles además para contribuir a la definición taxonómica y la comprensión de relaciones filogenéticas en la familia Myrtaceae, así como para el diseño de estrategias de uso sustentable y conservación de los recursos genéticos presentes en nuestras especies nativas.

#### 1.4. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la diversidad y biología de la reproducción de las Mirtáceas *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (guayabo del país) y *Psidium cattleianum* Sabine (arazá), con el fin de aportar conocimientos útiles a los programas de selección y mejoramiento de estas especies frutales nativas con potencial comercial en el mercado nacional y regional.

#### 1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir en *Acca sellowiana* (Berg.) Burret y *Psidium cattleianum* Sabine las características cromosómicas relacionadas con el número cromosómico somático, análisis de los cariotipos.
- Identificar regiones útiles como marcadores cromosómicos en tres genotipos de la especie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret seleccionados de programas de mejoramiento nacionales, mediante la identificación de regiones heterocromáticas (ricas en GC) con tinción secuencial CMA (cromomicina A<sub>3</sub>) y DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).
- Identificar en *Psidium cattleianum* Sabine posibles variaciones que ayuden a definir entidades taxonómicas subespecíficas para los materiales de frutos rojos y amarillos. Para ello se analizará en materiales cultivados y silvestres de bosques nativos de nuestro país, la localización genómica de marcadores cromosómicos, mediante la identificación de regiones CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

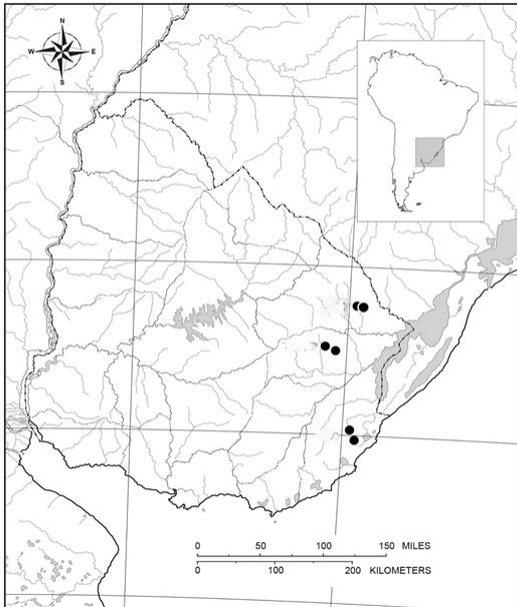
## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

El presente estudio se realizó con plantas de dos especies de mirtáceas nativas, *Psidium cattleianum* Sabine (arazá) y de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (guayabo del país). Las plantas de guayabo provienen del programa de mejoramiento de Mirtáceas que se lleva adelante en la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de Salto (EEFAS, localizada en 31°19' S, 57°41' W). Las plantas de arazá utilizadas son de dos fuentes distintas; la mayoría es progenie de plantas cultivadas de dicho programa y un grupo fueron semillas germinadas a partir de cosecha de frutos de plantas silvestres de montes nativos del departamento de Rocha (**Tabla 2 y Fig. 3**).

Todas las plantas estudiadas en este trabajo y provenientes de la EEFAS se originaron de semillas cosechadas sobre plantas (plantas madre) que están en el Jardín de Introducción a campo abierto y coordina la Ing. Agr. Beatriz Vignale (Producción vegetal, Facultad de Agronomía) (**Fig. 4 a**). Posteriormente la colección de plantas jóvenes provenientes de EEFAS se mantuvieron en invernáculo de Facultad de Agronomía en Sayago, Montevideo (**Fig. 4 b y c**).

Las materiales de arazá de bosque nativo fueron colectadas en prospecciones efectuadas por los Drs. Gabriela Speroni y Mauricio Bonifacino (Botánica, Facultad de Agronomía) en el Este del país, departamentos de Rocha (Sierra de los Amarales y Cerro de los Rocha), Treinta y Tres y Cerro Largo (**Fig. 3**). De estas colectas se analizaron tres plantas de poblaciones de Rocha numeradas R-3, R-4 y R-5. A partir de los frutos colectados, y luego de germinar semillas, las plántulas fueron pasadas a tierra en invernadero en el 2012 (**Fig. 4 d**).



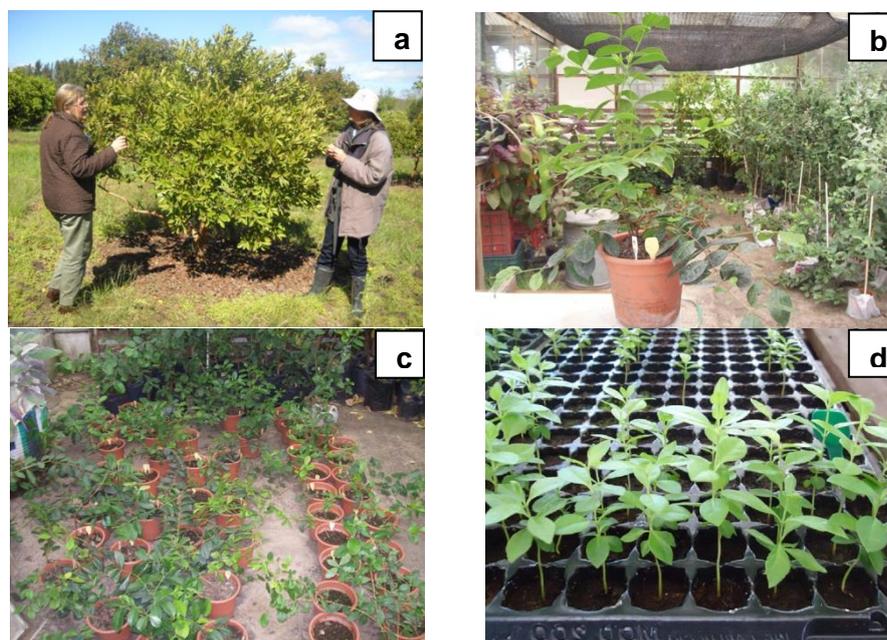
**Figura 3.** Mapa con los lugares marcados con círculos negros donde se colectaron frutos de plantas silvestres de arazá, *Psidium cattleianum* Sabine, todas de frutos amarillos, en los departamentos de Rocha, Treinta y Tres y Cerro Largo en Uruguay. Gentileza de M. Bonifacino y G. Speroni.

**Tabla 2.** Plantas de *Psidium cattleianum* Sabine y de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret con las cuales se trabajó. Todas las plantas cultivadas estudiadas son progenie de plantas madres instaladas en Jardín de Introducción de EEFAS (Ing. Agr. B. Vignale). (\*) Los datos de las plantas cultivadas son de B. Vignale (com. pers.) y de M. Salvarrey (2008).

Especie	Plantas estudiadas. Código (*)	Color de fruto	Origen de las plantas	Observaciones (*)
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	IV-1.pl 1 IV-1.pl 2 IV-1.pl 5	rojo	IV-1, EEFAS	Planta de origen, en el Parque Solari, Salto
	IV-3.pl 8	rojo	IV-3, EEFAS	Planta de origen, en el Parque Solari, Salto
	III-7.pl 12	rojo	III-7, EEFAS	Planta de origen, en El Naranjal, Salto
	Solari.pl 7	rojo	Solari, EEFAS	Planta de origen, en el Parque Solari
	III-5.pl 5	amarillo	III-5, EEFAS	Planta de origen, en el Parque Solari
	R-3 R-4 R-5	amarillo	<b>Silvestres, se colectaron frutos</b>	Poblaciones de bosque nativo en Rocha
<i>Acca sellowiana</i> (Berg.) Burret	RN3-VIII-14.pl 5		RN3-VIII-14, EEFAS	Planta de origen de Isla Naranjo, Soriano (progenie de otra de Cerro Chato, Florida)
	LL3-VIII-16.pl 8		LL3-VIII-16, EEFAS	Estancia en Florida
	JP-IX-16.pl 3		JP-IX- 16, EEFAS	Planta madre en Isla Naranjo, Soriano

### 2.1.1. Mantenimiento de las plantas

Para obtener preparados citológicos de células en fase mitótica se trabajó con meristemas apicales de raíces en crecimiento de plantas jóvenes. Para ello y con el fin de determinar las mejores condiciones de crecimiento de las plantas traídas de la EEFAS, Salto, se seleccionaron cinco plantas de cada genotipo y se trasladaron a la Cámara de crecimiento vegetal del Laboratorio de Biotecnología, donde se mantuvieron durante 60 días en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16:8 horas (luz: oscuridad), a 25° C y con tres riegos semanales. Se observó que no desarrollaron una buena adaptación a esas condiciones, siendo escaso su crecimiento y desarrollo de raíces, derivando incluso en la muerte de algunas plantas. Por esta razón, se las mantuvo desde entonces en el Invernáculo del Departamento de Biología Vegetal en Sayago donde, con abundante régimen de riego, recuperaron una buena condición general resultando en la obtención de raíces adecuadas para los objetivos de este trabajo.



**Figura 4.** **a.** Planta madre de arazá amarillo planta III-5 instalada a campo en EEFAS, Salto; **b. y c.** plantas de arazá y guayabo (progenie de plantas cultivadas en EEFAS) en invernáculo de Facultad de Agronomía; **d.** plántulas de arazá (progenie de plantas silvestres de Rocha) en invernáculo de Facultad de Agronomía, Montevideo.

Todas las plántulas germinadas a partir de frutos colectados en bosque nativo, se mantuvieron en este mismo invernáculo. Se contó para el mantenimiento de las plantas en invernáculo con la asistencia técnica del funcionario Sr. Julio Sburlatti (**Fig. 4 d**).

## **2.2. Metodología para los análisis citogenéticos**

Para el pretratamiento y fijación de las raíces, éstas fueron extraídas en la mañana, entre las 10 y 12 horas, preferentemente en días soleados. Los trabajos citológicos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas del Departamento de Biología Vegetal. Las raíces extraídas fueron inmediatamente lavadas con agua corriente, y bajo una lupa estereoscópica Olympus SZ, se eliminaron impurezas y cofia, cortándolas de modo de conservar sólo los primeros 5 mm, que contienen la región meristemática. A continuación se realizó el pretratamiento con 8-hidroxiquinolina 2 mM con el fin de aumentar el número de células con cromosomas condensados, por destrucción del huso mitótico. El antimitótico se dejó actuar durante 5 horas a temperatura ambiente y posteriormente se las almacenó en heladera a 10° C por un máximo de 20 horas. Para realizar la fijación de las raíces pretratadas se retiraron del antimitótico y se colocaron momentáneamente sobre papel absorbente para extraer la mayor cantidad de líquido posible. Inmediatamente se sumergieron en un volumen de 15 mL de solución 3:1 de etanol absoluto: ácido acético a temperatura ambiente y con agitación durante 1 hora. Finalmente se transfieren a tubos eppendorf con nueva solución 3:1 y debidamente etiquetados para ser almacenados en freezer a - 20° C hasta su utilización. La puesta a punto para el procesamiento de las raíces de *Acca sellowiana* las inició la Lic. Irene Da Cruz.

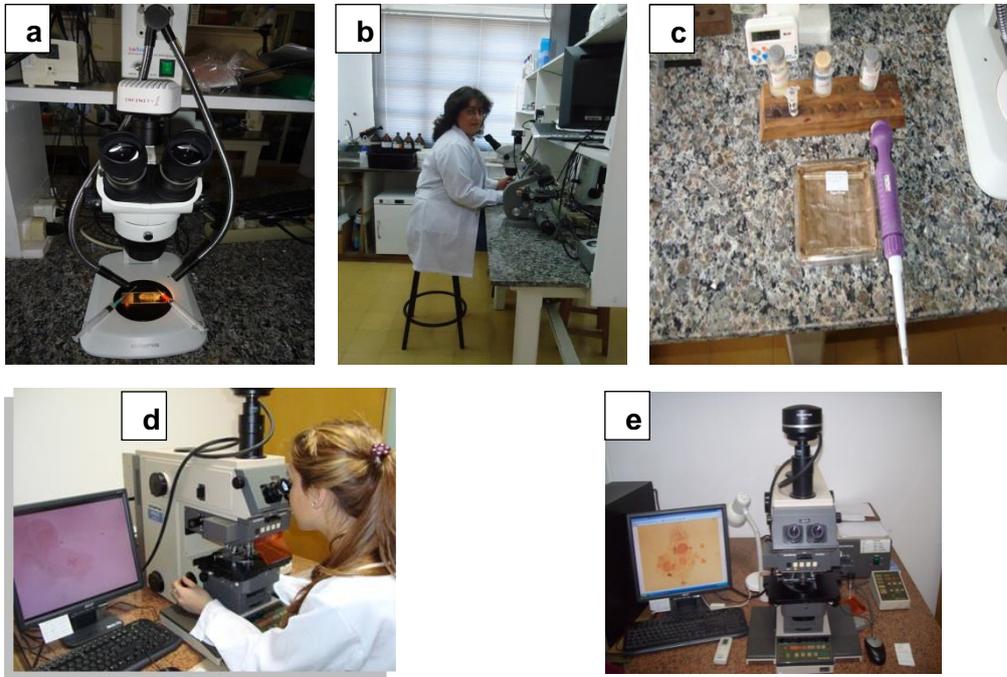
### **2.2.1 Procesamiento de raíces y obtención de preparaciones citológicas**

Para el logro de buenas preparaciones citológicas se siguió los protocolos de Speranza et al. (2003) con algunas modificaciones. Se utilizaron raíces almacenadas en fijador (3:1). Para quitar esta solución se lavan en agua destilada dos veces durante 10 minutos, y en buffer citrato durante unos

segundos. Luego se sometieron a digestión enzimática adicionando 50 µl de solución de pectinasa: celulasa (Pectinasa Sigma P4716-25KU al 30 %, Celulasa Calbiochem® al 3 %) en tubos eppendorf, y se mantuvieron a 39° C durante al menos 5 horas. Cuando se considera que están suficientemente blandas, se retiró la solución enzimática utilizando una micropipeta y teniendo cuidado de no dañar las raíces, y se agregó agua destilada para lavar restos de enzimas. Una vez extraída el agua de la misma manera, se adicionaron 20 µl de ácido acético 60 % dejándolo actuar sobre las raíces entre 20 y 30 minutos. Luego se procede a retirar el ácido acético 60 % y se adicionan 20 µl de ácido acético 45 %. Por último se retiran las raíces utilizando una pipeta y se trasladan a un portaobjetos. Se procede a fragmentar el material mediante el uso de agujas histológicas, removiendo los fragmentos que pudieran dificultar el posterior aplastado del preparado, y se trata de disgregar lo más posible el material restante hasta obtener una solución homogénea de núcleos en suspensión; durante este proceso debe evitarse que el material se seque, para lo cual deberá ir adicionándose solución de ácido acético en la medida necesaria.

El proceso siguiente tuvo dos variantes que se contrastaron: a) una metodología consistió en que luego de obtener la dispersión adecuada de células, se colocó el preparado sobre placa caliente, y se procedió a deslizar la gota de ácido acético con las células en suspensión a lo largo del portaobjetos, utilizando una aguja e intentando que ésta no toque el vidrio, manteniéndola en movimiento durante aproximadamente 2 min. Finalmente se procede a fijar el material sumergiendo el preparado en solución fijadora 3:1 de 30 min a 1 hora. Se dejan secar al aire; b) otra metodología probada de puesta a punto, que es la que dio mejores resultados, consistió en que luego de obtener la dispersión adecuada de células, se cubrió el preparado con cubreobjetos de 18 x 18 mm y se sometió a la llama de mechero para calentar el ácido acético en el preparado y favorecer así la remoción del citoplasma. Para aumentar la dispersión de las células se golpea reiteradamente con aguja el cubreobjetos. Si es necesario se repite el procedimiento, verificando en cada paso el avance en la calidad del preparado utilizando para esto un microscopio de contraste de fases. Se conservan los preparados que contengan buenas metafases para

los fines buscados y se descarta el resto. Se procede al aplastado final de los preparados seleccionados presionando firmemente con el pulgar. Inmediatamente se sumergen en nitrógeno líquido y se retira el cubreobjetos con una hoja de afeitar. Se dejan secar al aire.



**Figura 5.** a, b. Lupa estereoscópica Olympus SZ; c. materiales utilizados para tratamiento de raíces; d, e. Microscopio Olympus (modelo New Vanox AH-3) con epifluorescencia y Cámara Digital Olympus DP71. Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía. Fotos c y d gentileza de la Lic. I. Da Cruz.

### 2.2.2. Tinción secuencial CMA/DAPI

Para la tinción diferencial se siguió el protocolo de Cabral et al. (2006) con algunas modificaciones. Se utilizaron los fluorocromos CMA (Cromomicina A<sub>3</sub>) con afinidad por ADN rico en bases G-C, y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) con afinidad por ADN rico en bases A-T. Los preparados utilizados se dejaron envejecer previamente a temperatura ambiente durante por lo menos tres días.

Se obtuvieron mejores resultados cuando la tinción se realizó exactamente al tercer día de envejecimiento. Se aplican 8 µl de CMA a una concentración de 0.5 mg/mL por preparado y se cubren con cubreobjetos de 22 x 22 cm,

incubándolos en cámara húmeda y oscuridad durante 1 hora. Se retiran cubreobjetos por arrastre lavando los preparados con agua destilada y se secan con pera de goma. Para la contratinción se aplican 8  $\mu$ l de DAPI a una concentración de 1 mg/mL y se sigue el mismo procedimiento que para el CMA pero en este caso a incubación es de 30 minutos. Se vuelven a lavar y secar los preparados y finalmente se montan en tampón McIlvaine (pH 7)/ glicerol (v/v 1:1). Durante todo el proceso de tinción secuencial debe evitarse la exposición directa de luz de los preparados y fluorocromos. Las preparaciones obtenidas deben mantenerse en oscuridad durante al menos 3 días antes de ser observadas y fotografiadas, ya que el CMA presenta inestabilidad si se expone a la luz antes de ese período de tiempo. Con preparados seleccionados para su uso posterior aplicando otras técnicas, se procede a su desteñido antes de ser almacenados en freezer (- 20° C). Para ello se sumergen los preparados en un coplin que contiene solución 3:1 (alcohol: ácido acético) y se dejan durante 30 minutos, luego se transfieren a alcohol absoluto durante al menos 2 horas para su deshidratación. Se dejan secar al aire y se almacenan en freezer a - 20° C hasta su utilización. En algunos pocos casos fue así que se procedió con preparados seleccionados que fueron sometidos posteriormente a la técnica de FISH, aplicando sondas con ADNr 45S (datos no incluidos en esta tesis).

### **2.2.3. Análisis de los preparados**

La selección de las preparaciones realizadas se hizo en una primera instancia por observación en microscopio de contraste de fases Olympus CX41. Posteriormente fueron analizadas en microscopio con epifluorescencia Olympus New Vanox AH-3), seleccionando para ser fotografiadas aquellas metafases que mostraran menor superposición de cromosomas, menor presencia de citoplasma y mejor tinción. Posteriormente se tomaron fotografías digitales levantadas con Cámara Digital Olympus DP71 (programa DP Manager), y procesadas utilizando los programas Corel Draw y Photoshop. Para la medición del largo de brazos y largo total de los cromosomas se utilizó el programa Image J. Para el análisis morfológico de los mismos se siguió el criterio de Levan (1964), que clasifica los cromosomas según la relación entre la longitud del brazo largo (l) y la longitud del brazo corto (s), llamando valor r a

dicha relación ( $r = l/s$ ); este índice permite clasificar los cromosomas en metacéntricos ( $r$  entre 1.0 y 1.7), submetacéntricos ( $r$  entre 1.7 y 3.0) o acrocéntricos ( $r$  mayor a 3.0). Se realizó entonces la medida de los brazos cromosómicos en las mejores metafases seleccionadas, se calculó el largo promedio en cada caso y el valor  $r$  correspondiente.

## **3. RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

### 3.1. Metodología de análisis citogenético

La obtención de preparados de calidad para realizar el análisis citogenético tanto de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (guayabo del país) como de *Psidium cattleyanum* Sabine (arazá) requirió de un intenso trabajo de puesta a punto de técnicas tanto para el manejo de planta como en el trabajo de laboratorio. En este sentido, para lograr coleccionar las mejores raíces, se realizaron pruebas para determinar si había diferencia entre las de plantas mantenidas en invernadero y aquellas mantenidas en la cámara de crecimiento. Al menos en las condiciones (temperatura, humedad) que se usó en este caso, la cámara no mantuvo a las plantas en buena condición general y se desecharon. Se trabajó entonces con plantas mantenidas en invernáculo. En ellas se determinó que luego de la extracción de sus raíces, las plantas requieren de un período no menor a 10 días para recuperar un buen estado de crecimiento de las mismas. Por esta razón se tuvo la precaución de no cortar las raíces principales de la planta. Se determinó que el mejor período de colecta de raíces adecuadas para la elaboración de preparados citológicos fue entre los meses de setiembre a febrero, coincidiendo con el período de mayor crecimiento de las plantas.

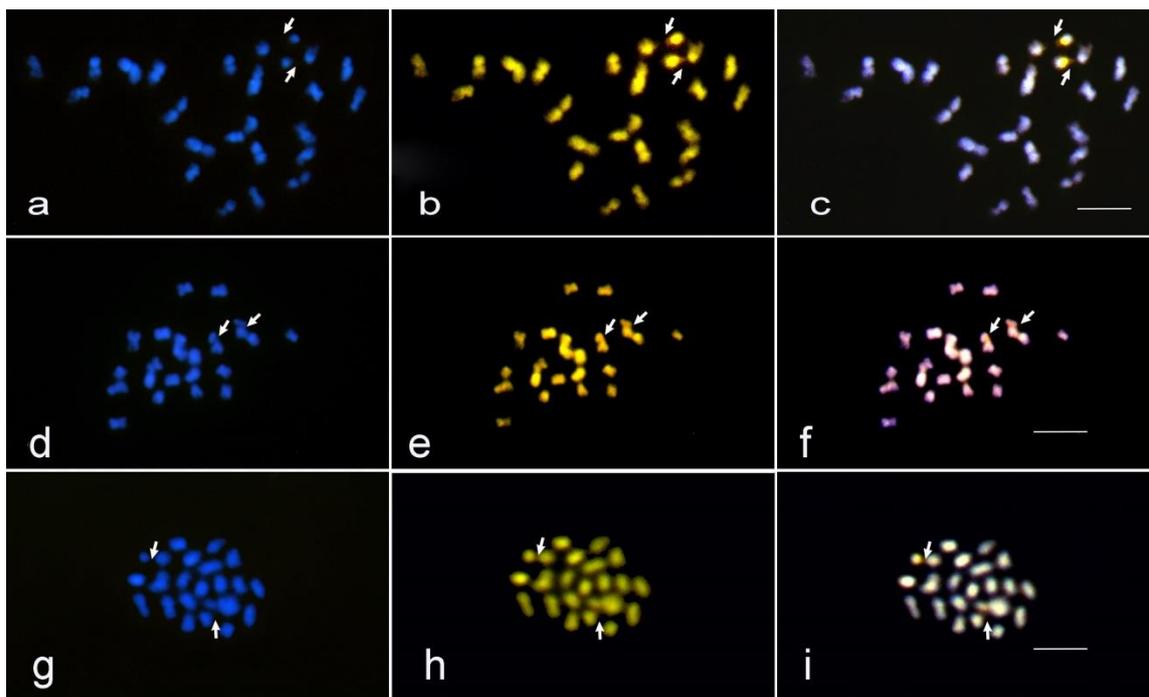
Además y como característica general del ciclo reproductivo, en las plantas de *P. cattleyanum* se observó que en condiciones de invernáculo se produjo un retraso en la floración respecto a lo que se describe generalmente (esta especie comienza su floración a los dos años), en nuestro caso en su segundo año de vida sólo una planta escasamente floreció; en el tercer año, 10 florecieron aunque el número de flores por planta en ningún caso fue superior a 10 y no se produjo el cuajado de ninguna de las flores, esto podría explicarse por la ausencia de polinizadores en el ambiente donde las plantas son mantenidas.

Luego de llevar las raíces al laboratorio, se probaron distintas metodologías y puesta a punto de las técnicas citogenéticas para la obtención de las preparaciones citológicas, realizando este trabajo con aquellas especificadas en la sección de Materiales y Métodos. Las mayores dificultades encontradas en general fueron la persistencia de citoplasma en las preparaciones y, en el caso de *P. cattleyanum*, el solapamiento de los cromosomas, dado su elevado número. También se realizaron varios ensayos para lograr una adecuada tinción de la cromatina, y debido a que con las técnicas clásicas no se obtuvieron buenos resultados, se recurrió a la técnica de bandeo con fluorocromos DAPI y CMA. En cuanto a la eliminación de citoplasma, los mejores resultados se lograron cuando las raíces, previamente sometidas a digestión enzimática, se trataron con 100 µl de HCl 5N a 60 ° C durante 10 minutos y luego con 20 µl de ácido acético 60 % durante 30 minutos. Sin embargo, como es sabido esta combinación de técnicas no permite buena tinción con el fluorocromo DAPI, por lo que se abandonó.

### **3.2. *Acca sellowiana* (Berg.) Burret**

En todas las plantas analizadas (**Tabla 2:** RN3 VIII-14, LL3 VIII-16, JP IX-16), el número de cromosomas somáticos fue  $2n = 22$  (**Fig. 6**). En la **Figura 7** se presentan los cariogramas donde se observa el ordenamiento en 11 pares de cromosomas, lo cual indica la conformación diploide de esta especie. Los mismos fueron construidos a partir de las metafases mitóticas que presentaban menor superposición de cromosomas y que se encontraban preferentemente en un mismo plano. Los pares de cromosomas homólogos se determinaron en base a su tamaño relativo, morfología y localización del centrómero. Se realizaron medidas de la longitud de los brazos cromosómicos en seis metafases distintas y se determinó que el largo de cada par cromosómico varía, entre 1,36 a 2,72 µm, con poca diferencia de tamaño entre ellos, aunque claramente el par 1 es el mayor y otro par, el 11 es más pequeño que el resto (**Fig. 9**). El tamaño total del complemento cromosómico diploide es de 43,3 µm por lo que el tamaño de un solo genomio (haploide) es de 21,65 µm. Según la clasificación de Guerra (2000), todos los cromosomas son de tipo pequeños, ya

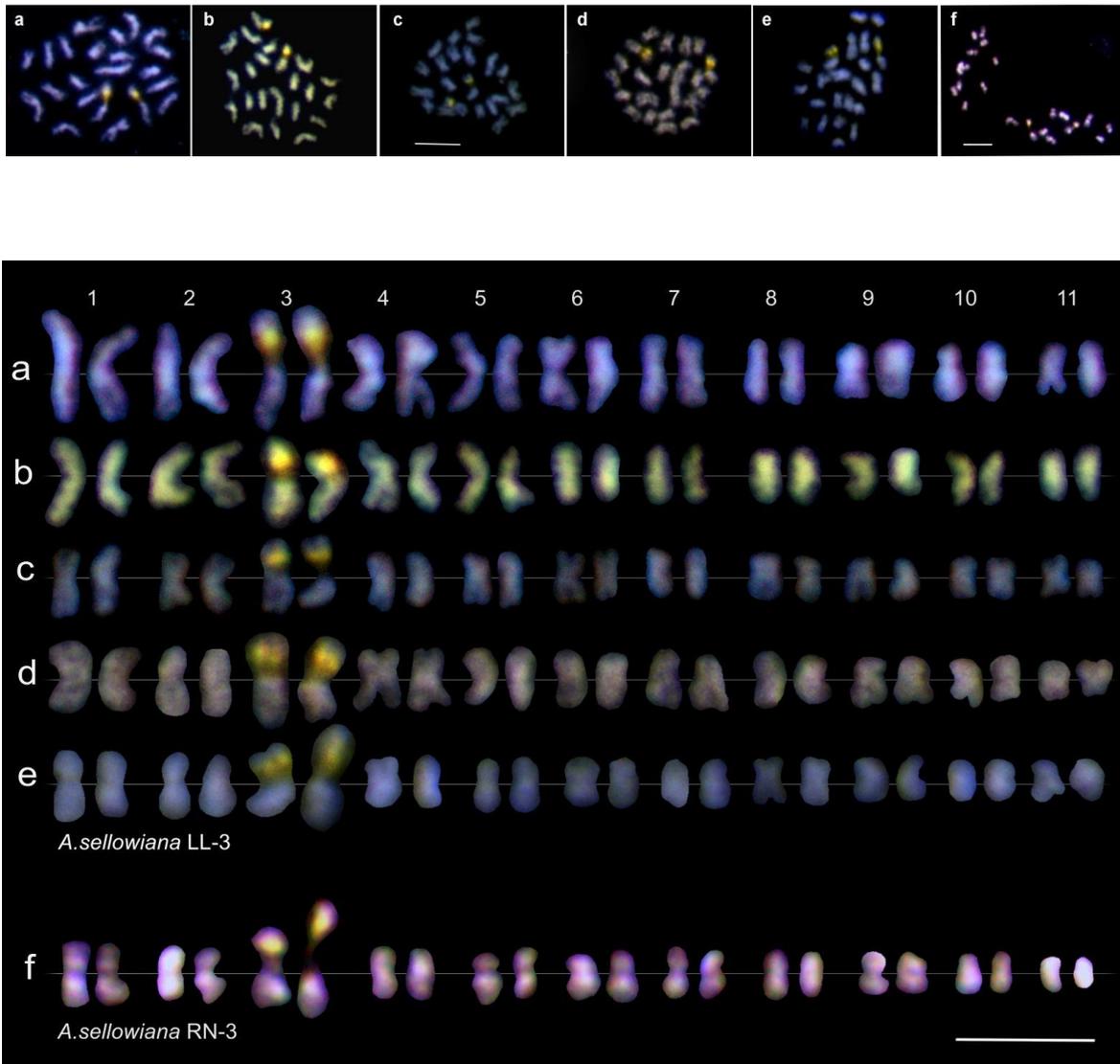
que son menores a 3  $\mu\text{m}$  en promedio. En cuanto a su morfología, todos los pares son metacéntricos, siguiendo la clasificación de Levan et al. (1964) ya que en todos los cromosomas la relación es:  $1,0 < r < 1,7$  (**Fig. 9**). Se observó que el par cromosómico 3 presenta la particularidad que con las técnicas utilizadas su región centromérica tiende a elongarse separando claramente los dos brazos en muchas de las metafases observadas (**Figs. 6 a y 7**).



**Figura 6.** *Acca sellowiana* (Berg.) Burret. Metafases mitóticas  $2n = 22$ . **a, b, c.** de la planta LL3 VIII-16 pl 8; **d, e, f.** planta RN3 VIII-14 pl 5; **g, h, i.** planta JP IX-16 pl 3. Todas con tinción con los fluorocromos DAPI, CMA y superposición de imágenes con tinción CMA y DAPI, respectivamente. Las flechas indican sitios  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ . Las barras corresponden a 5  $\mu\text{m}$ .

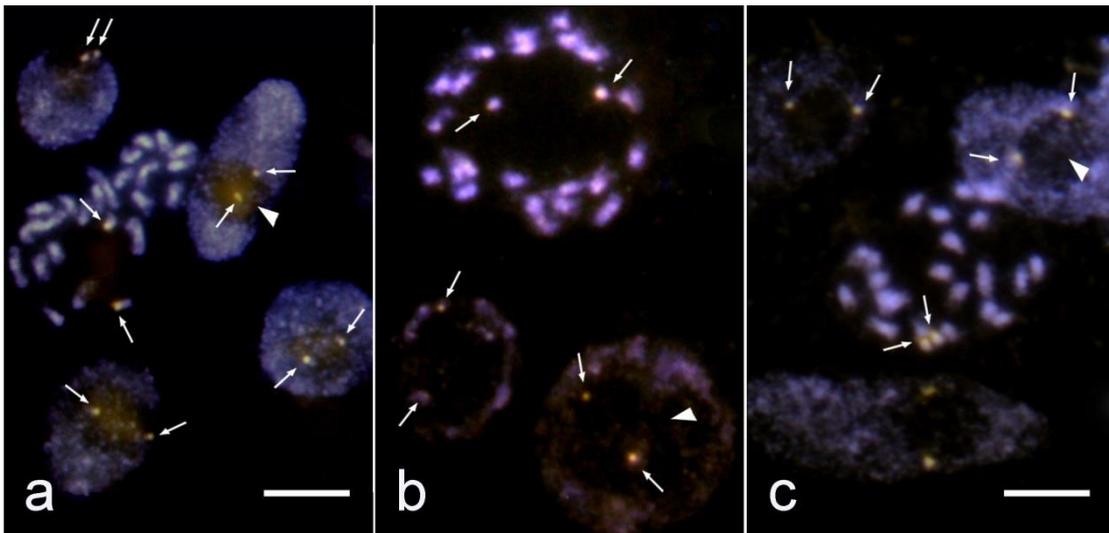
Luego de realizar la doble tinción diferencial con los fluorocromos CMA y DAPI en preparados de *A. sellowiana*, se evidenciaron dos bandas positivas para CMA que coinciden con bandas negativas para DAPI ( $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ ) (**Figs. 6 y 7**). Dichas bandas se localizan en ambos integrantes del par cromosómico 3, específicamente en el menor de los brazos, en la región próxima al centrómero

y ocupando aproximadamente un 42 % del largo del brazo, lo que corresponde aproximadamente al 20 % del largo total del cromosoma. Este patrón de tinción se repite en todos los individuos analizados de esta especie.



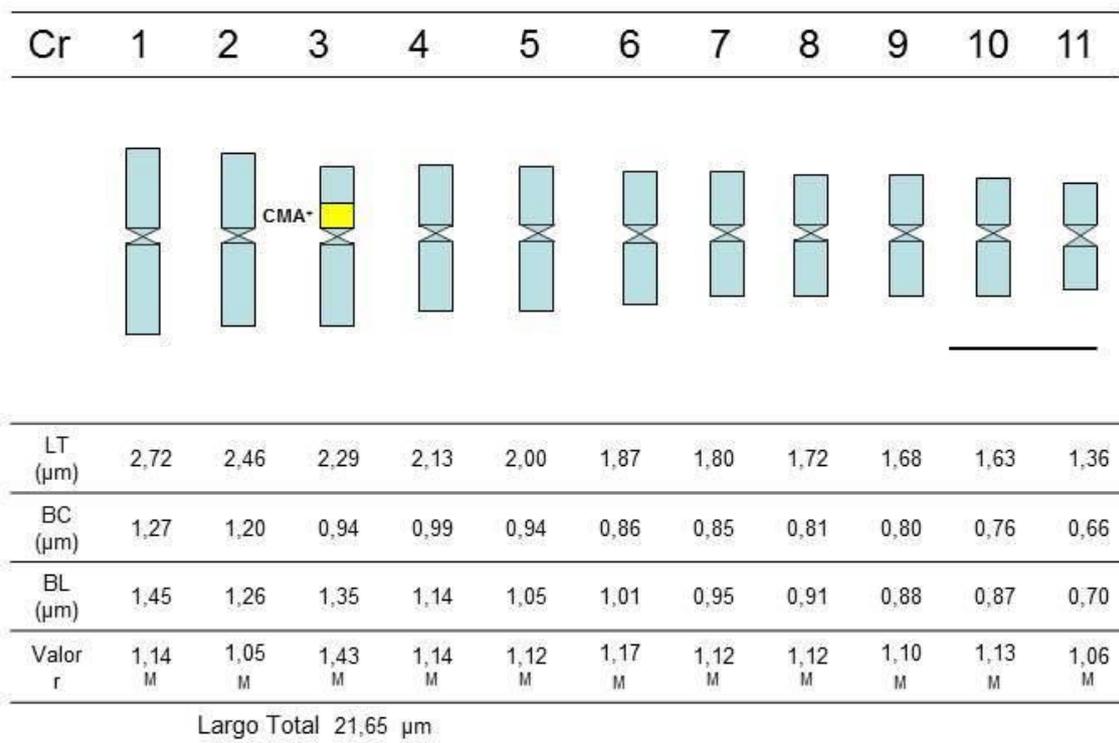
**Figura 7.** *Acca sellowiana* (Berg.) Burret. Cariogramas de metafases mitóticas  $2n = 22$  construidos a partir de las fotografías que se muestran en la parte superior. **a – e.** planta LL-3; **f.** planta RN-3. Fotografías superpuestas de tinciones CMA y DAPI. El cromosoma 3 presenta los sitios CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>. Las barras corresponden a 5  $\mu$ m.

Al analizar células que transitaban tanto en interfase como en prometafase mitóticas, se observó que la señal CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> en ambos cromosomas del par 3, aparece asociada al nucléolo cuyo contorno aún se identifica en dichas fases. Los tres genotipos analizados presentaron siempre un solo nucléolo en los núcleos interfásicos, con dos señales (flechas) CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> asociadas al mismo (Fig. 8).



**Figura 8.** *Acca sellowiana* (Berg.) Burret ( $2n = 22$ ). Núcleos en interfase y prometafases con tinción secuencial CMA/DAPI (imágenes superpuestas) **a.** planta LL3 VIII-16 pl 8; **b.** planta RN3 VIII-14 pl 5; **c.** planta JP3 IX-16 pl 3. Se observan en cada núcleo dos señales (flechas) CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> asociadas al nucléolo (punta de flecha). Las barras corresponden a 5  $\mu$ m.

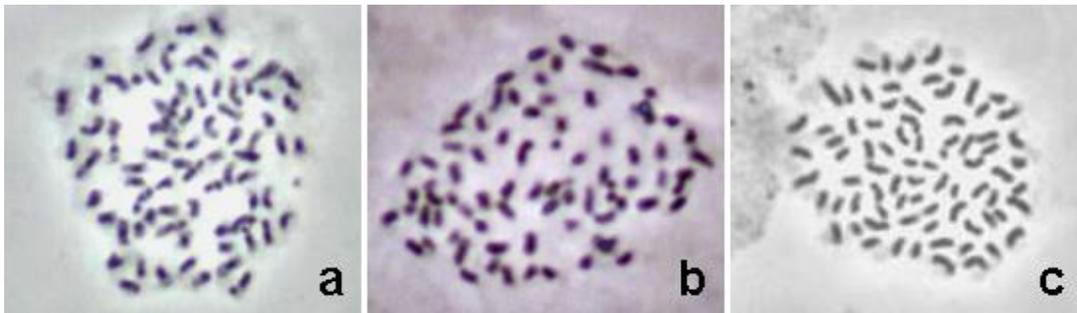
Con toda la información precedente fue posible elaborar el idiograma correspondiente al cariotipo de *Acca sellowiana* que se muestra en la **Figura 9**, donde se representan los 11 cromosomas básicos de la especie con sus tamaños relativos estimados en base a los promedios de las medidas realizadas; en el par 3 se representa la banda CMA<sup>+</sup>.



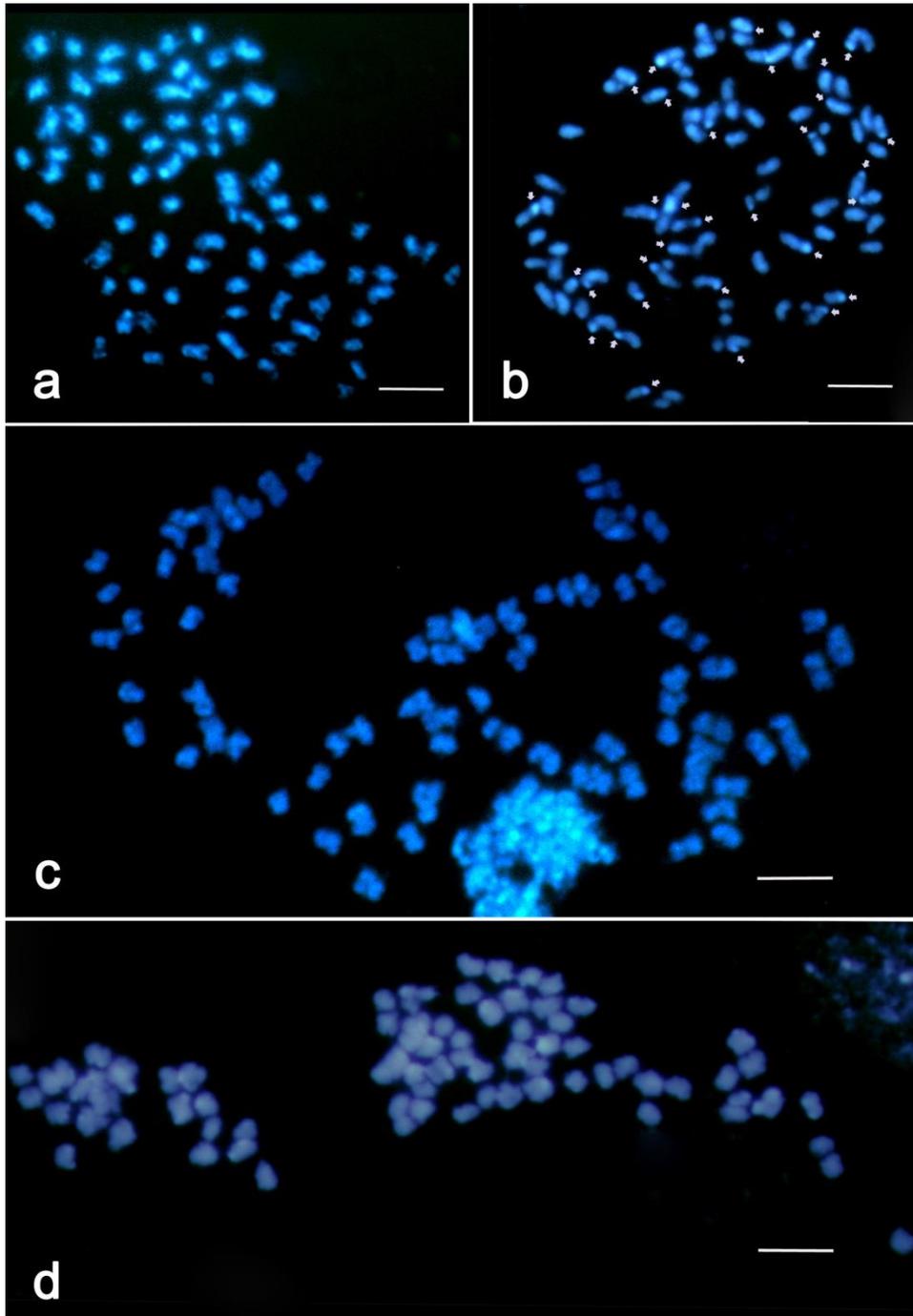
**Figura 9.** Idiograma de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, n = 11, en la parte superior. Debajo, se muestran las longitudes promedio en µm, estimadas para Longitud Total de los cromosomas (LT), Brazo Corto (BC), Brazo Largo (BL) y relación entre longitud de ambos brazos (Valor r). La barra representa 2µm.

### 3.3. *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*(de fruto rojo)cultivadas

El número cromosómico de la forma de frutos rojos resultó de 77 cromosomas en todas las plantas cultivadas analizadas, que corresponden a algunas plantas de progenies de plantas madre instaladas en el Jardín de Introducción de la EEFAS (**Tabla 2.** III-7, IV-1, IV-3, Solari). Para este conteo se usó primero la técnica de observación con microscopio de contraste de fases de preparaciones sin teñir. En la **Figura 10** se muestran fotos obtenidas utilizando esta técnica. Asimismo fue posible determinar el número cromosómico en preparaciones teñidas con el fluorocromo DAPI y observadas con el microscopio de fluorescencia (**Fig. 11**).

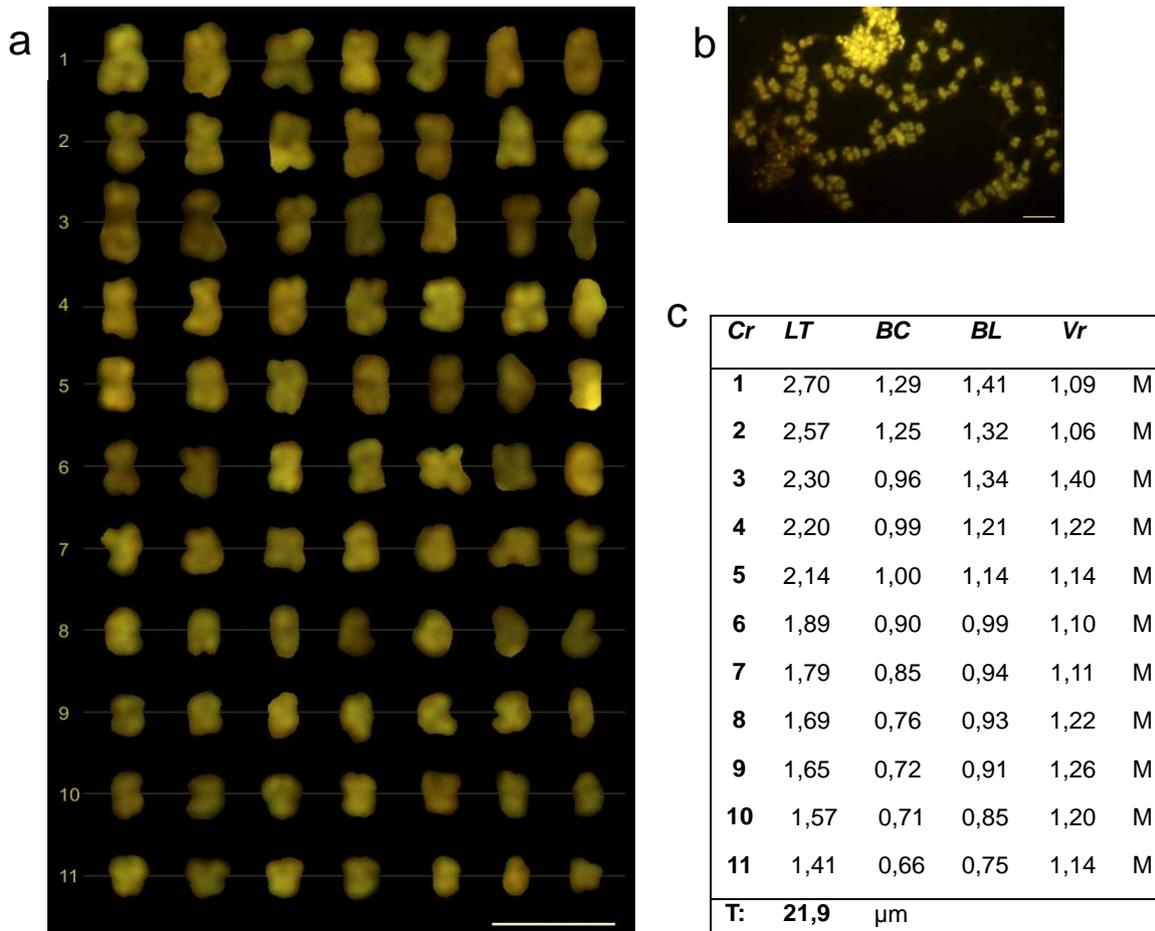


**Figura 10.** *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*(fruto rojo)  $2n = 77$ . Metafases somáticas tomadas en microscopio de contraste de fases. **a.** planta III-7 pl 12; **b.** planta IV-1 pl 1; **c.** planta Solari pl 7 (aumento x60).



**Figura 11.** *Psidium cattleianum* var. *cattleianum* (fruto rojo),  $2n = 77$ . Metafases somáticas teñidas con el fluorocromo DAPI en distintas plantas o accesiones que presentan  $2n = 77$ ; **a.** planta III-7 pl 12; **b.** planta IV-1, las flechas indican 32 bandas terminales DAPI<sup>+</sup>; **c.** planta IV-3 pl 8; **d.** planta Solari. Las barras corresponden a 5  $\mu$ m.

El cariograma (**Fig. 12 a**) de la forma de arazá de fruto rojo se realizó a partir de la metafase que se muestra en la **Figura 12 b** con tinción CMA (en la **Figura 11 c**, se observa la misma metafase con tinción DAPI), para ello se utilizó el largo de los cromosomas, posición del centrómero y su morfología.

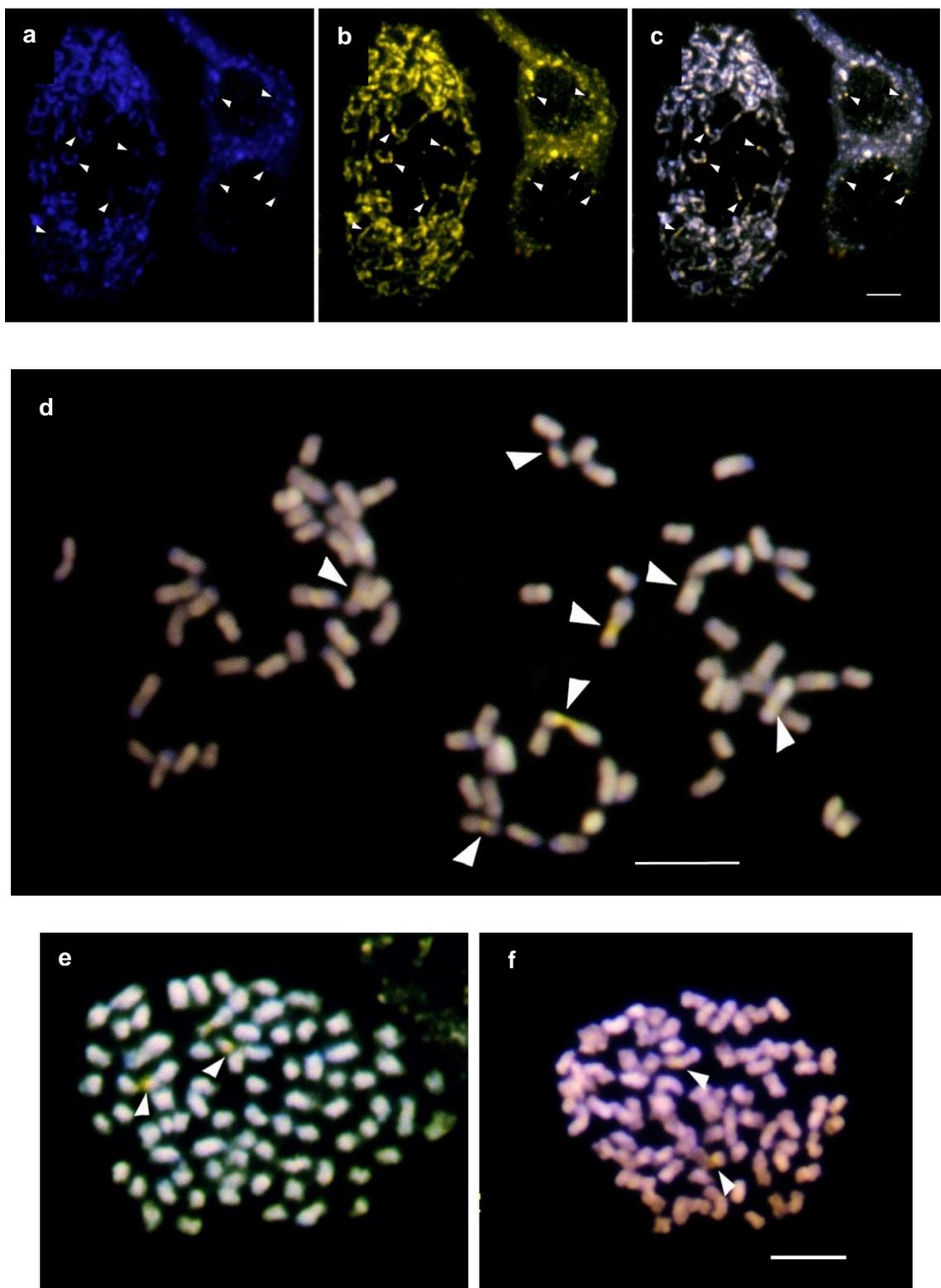


**Figura 12.** *Psidium cattleianum* var. *cattleianum* (fruto rojo). **a.** Cariograma  $2n = 77$  construido a partir de una metafase mitótica de la planta IV-3 pl 8; **b.** Metafase mitótica con tinción CMA a partir de la cual se construyó el cariograma; **c.** Medidas de la longitud promedio en micras de los 11 cromosomas. Las barras representan  $5 \mu\text{m}$ .

La construcción evidenció un cariotipo heptaploide  $2n = 7x = 77$ . Para la determinación de la medida del largo total de cada cromosoma (del 1 al 11), se estimó el tamaño promedio en base a las medidas realizadas en los siete

cromosomas de cada tipo. El cromosoma 1, el de mayor tamaño, mide en promedio 2,7  $\mu\text{m}$ , y el 11 que es el de menor tamaño, 1,41  $\mu\text{m}$  (**Fig. 12 c**). El largo total promedio (LT) estimado de un sólo genomio es de 21,9  $\mu\text{m}$  por lo que el del complemento cromosómico total (77 cromosomas) es de 153,3  $\mu\text{m}$ . Se estimaron también las longitudes promedio de los brazos cromosómicos (Brazo Corto: BC, Brazo Largo: BL) y la relación entre longitud de ambos brazos (Valor r). A partir de estos valores, según el criterio de Levan (1964), todos los cromosomas son metacéntricos ya que su valor r está entre 1.0 y 1.7 (**Fig. 12 c**).

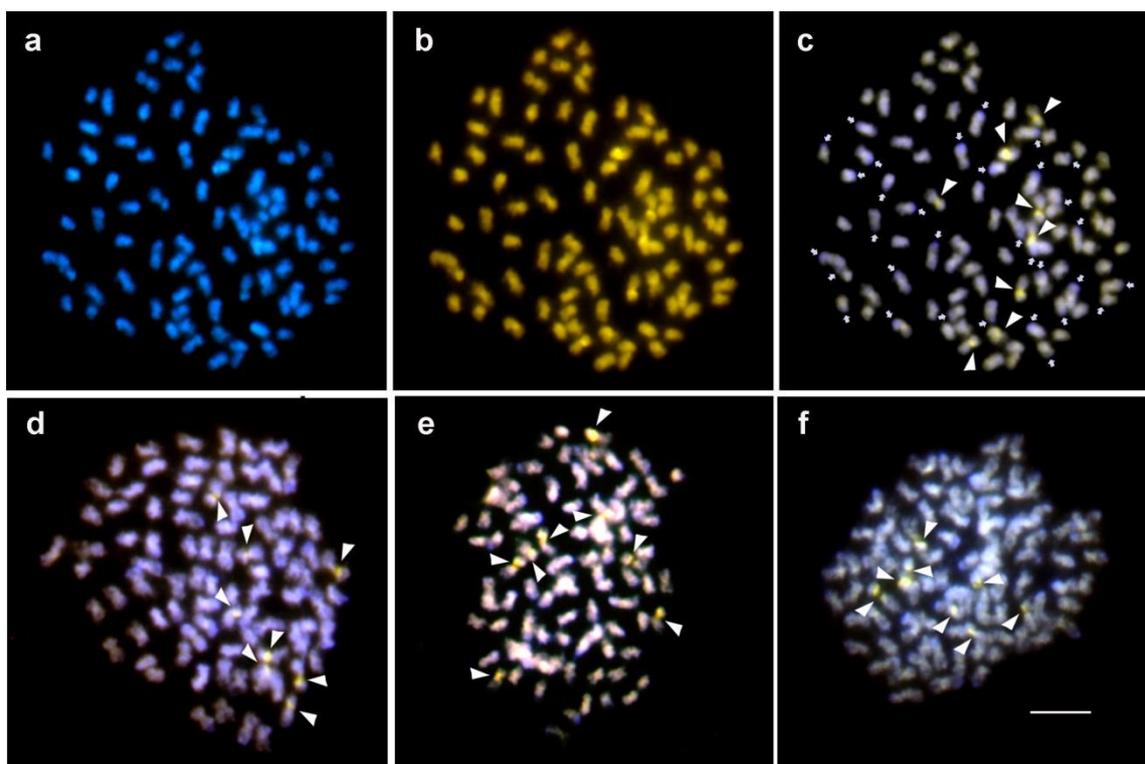
Al aplicar en plantas de arazá de fruto rojo la doble tinción secuencial CMA/DAPI se observan varias señales CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> en núcleos en interfases y en prometafases tempranas mitóticas (**Fig.13 a, b, c**). En esas figuras se puede apreciar que esos sitios están cercanos al nucléolo. En algunas metafases se obtuvieron hasta 7 sitios con señal CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (**Fig.13 d**) que se muestran con puntas de flecha. En otros genotipos de esta forma de arazá, se observan con claridad dos sitios pero la tinción no se considera buena, ya que no es homogénea en todo el núcleo (**Fig.13 e, f**). Además fueron identificadas regiones terminales DAPI positivas en uno de los brazos de 32 de los 77 cromosomas (**Fig. 11 b**).



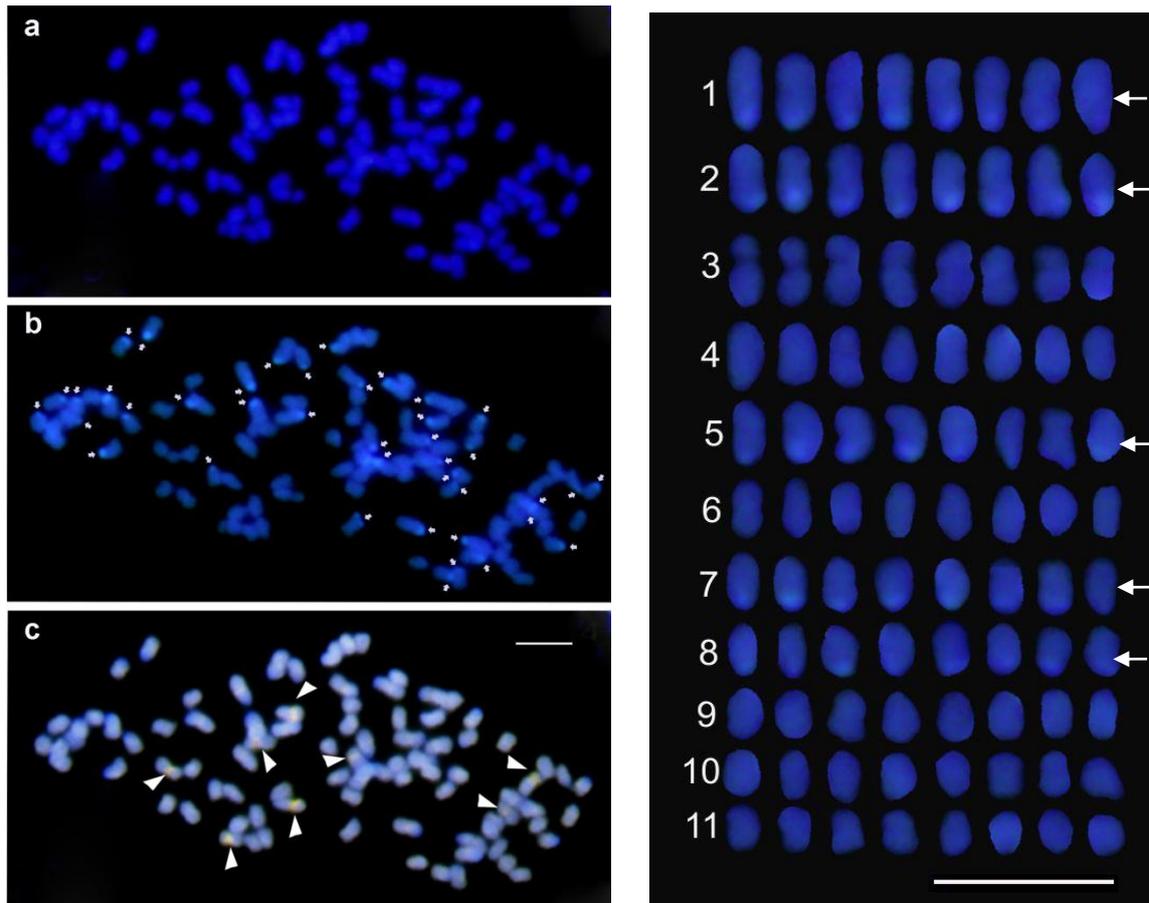
**Figura 13.** *Psidium cattleianum* var. *cattleianum* (fruto rojo)  $2n = 77$ . **a, b, c.** Prometafase e interfase (planta IV-3) con tinción DAPI, CMA y superposición de las imágenes, respectivamente; **d, e, f.** imágenes superpuestas luego de tinción con CMA y DAPI, (plantas IV-1, Solari y III-7, respectivamente). En todos los casos, las puntas de flecha señalan regiones CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Las barras corresponden a 5  $\mu$ m.

### 3.4. *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo) cultivadas

Al estudiar las plantas de arazá de fruto amarillo, el recuento de unidades en metafase resultó ser de 88 cromosomas, número diferente a la forma de arazá de fruto rojo (**Figs. 14, 15**). Los estudios se realizaron en algunas plantas de la progenie provenientes de una planta madre cultivada e instalada en el predio de la EEFAS (Tabla 2. III-5).



**Figura 14.** *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo)  $2n = 88$ . Metafases somáticas (planta III-5 pl 7). **a, b, c.** tinción DAPI, CMA y superposición de imágenes CMA y DAPI, respectivamente.; **d, e, f.** imágenes con tinción CMA y DAPI superpuestas. En todos los casos, las puntas de flecha señalan regiones  $CMA^+/DAPI^-$  del cromosoma 3. La barra corresponde a 5  $\mu m$ .



**Figura 15.** *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo)  $2n = 88$ . Metafase somática (planta III-5 pl 6). **a.** tinción DAPI, **b.** tinción DAPI (posterior a la aplicación de técnica FISH), se indican con flechas 40 sitios  $CMA^+/DAPI^+$ ; **c.** superposición de imágenes de las tinciones diferenciales CMA y DAPI, las puntas de flecha señalan regiones  $CMA^+/DAPI^-$  del cromosoma 3. A la derecha, el cariograma correspondiente a la metafase en **b.** Las barras corresponden a  $5\mu m$ .

Para la forma de frutos amarillos se construyeron los cariogramas que se muestran en las **Figuras 15, 16 y 17** (tomando como base las imágenes de las Figuras 15 c, 14 c y 17 a, respectivamente). Se realizaron agrupando los cromosomas en base a su tamaño relativo, morfología cromosómica y a su patrón de bandeo. La construcción evidenció un cariotipo octoploide  $2n = 8x = 88$ .

Se seleccionó el cariograma que se muestra en la **Figura 16** por ser el de mejor definición para realizar la medición de cada brazo cromosómico, se calculó la relación entre el largo de ambos en cada cromosoma y se concluyó

que todos son metacéntricos (Levan 1964). Además, se determinaron los promedios del largo total (LT) de cada cromosoma, siendo en todos los casos menores a 3  $\mu\text{m}$ , variando entre 1,04 y 2,13  $\mu\text{m}$  (**Tabla 3 a**), por lo cual se clasifican todos como cromosomas pequeños según Guerra (2000).

El largo total en micras del complemento cromosómico monoploide (un genomio) de esta forma de frutos amarillos pudo ser calculado en base a las mediciones de largo total de cada cromosoma realizadas en tres cariogramas buenos. El promedio del largo total de un genomio se estimó en 20,91  $\mu\text{m}$ . Estos resultados se presentan en la **Tabla 3 b**.

**Tabla 3.** *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* (fruto amarillo),  $2n = 88$ . **a.** Longitudes promedio en  $\mu\text{m}$  estimadas para Longitud Total de los cromosomas (LT), Brazo Corto (BC), Brazo Largo (BL) y relación entre longitud de ambos brazos (Valor r). C es la centría, todos metacéntricos (M). **b.** Medidas cromosómicas que corresponde a tres metafases (Figura 14 c, 15 c, 17 a).

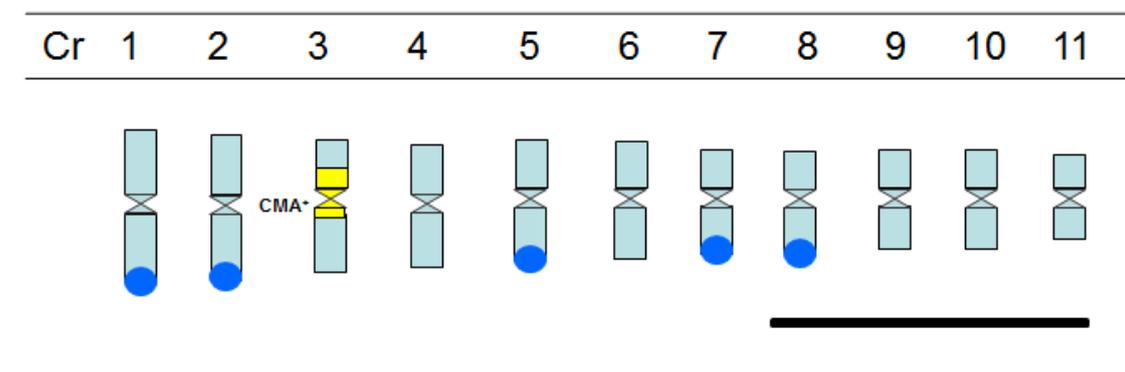
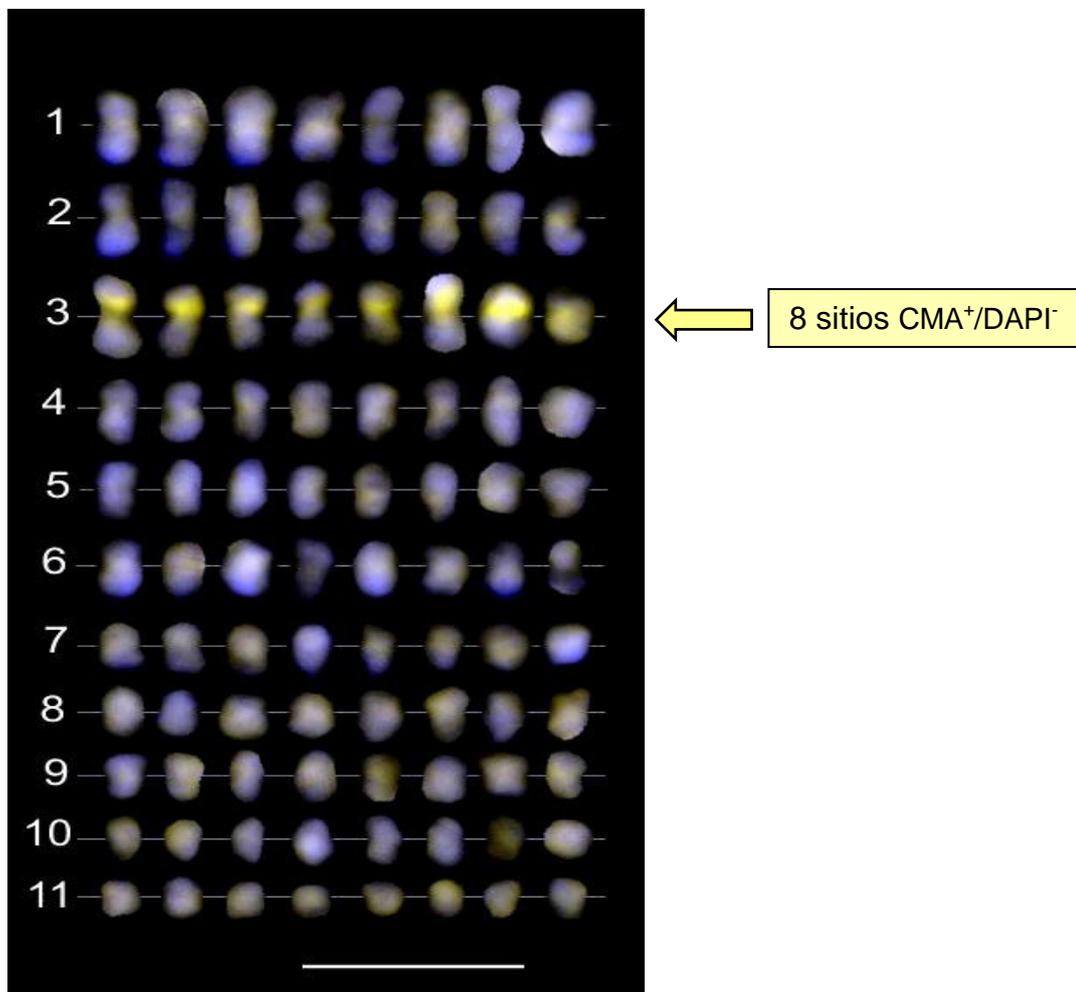
<b>a</b>	<b>Cr</b>	<b>LT</b>	<b>BC</b>	<b>BL</b>	<b>Vr</b>	<b>C</b>
	1	2.13	1.04	1.09	1.05	M
	2	1.99	0.95	1.05	1.11	M
	3	1.68	0.76	0.92	1.21	M
	4	1.66	0.78	0.89	1.15	M
	5	1.60	0.77	0.83	1.07	M
	6	1.56	0.74	0.82	1.12	M
	7	1.38	0.62	0.76	1.23	M
	8	1.32	0.60	0.72	1.20	M
	9	1.31	0.62	0.69	1.12	M
	10	1.27	0.61	0.66	1.09	M
	11	1.04	0.52	0.52	1.00	M
	<b>T.:</b>	16.92	$\mu\text{m}$			

<b>b</b>	<b>LT1</b>	<b>LT2</b>	<b>LT3</b>	<b>LT</b>
	2.13	3.32	2.26	2.67
	1.99	2.89	2.29	2.29
	1.68	2.65	2.17	2.17
	1.66	2.63	2.09	2.09
	1.60	2.45	1.98	1.98
	1.56	2.38	1.89	1.89
	1.38	2.21	1.73	1.73
	1.32	1.98	1.67	1.67
	1.31	1.88	1.59	1.59
	1.27	1.85	1.52	1.52
	1.04	1.55	1.31	1.31
	Largo	total en	$\mu\text{m}$ :	20.91

En el análisis de las microfotografías y de los cariogramas de varios preparados de la planta III-5 pl 6 y pl 7 de *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo) que tenían buenas metafases somáticas  $2n = 88$ , teñidas con la doble tinción secuencial CMA/DAPI, se pudieron identificar con mucha facilidad distintas bandas que permitieron determinar un patrón de bandeo característico.

En el cromosoma 3, se distingue una banda heterocromática de localización pericentromérica CMA positiva y DAPI negativa, muy característica y claramente visible en los ocho cromosomas de esta forma de fruto amarillo de la especie. Esta banda ocupa mayor extensión en la región proximal de uno de los brazos, el que es algo menor, y se observa de color amarillo cuando se realiza la superposición de imágenes. A partir de mediciones realizadas en la metafase que se muestra en la **Figura 15 c**, donde estas bandas se aprecian con mucha claridad, se estimó que su largo representa aproximadamente un 27 % del largo total del cromosoma 3.

En algunas preparaciones y luego de la doble tinción diferencial con CMA y DAPI, se observaron en un solo brazo de algunos cromosomas, telómeros DAPI positivos y CMA negativos. Al realizar la superposición de ambas imágenes, esos telómeros se aprecian de color azulado (cromosomas 1, 2, 6, 7), se muestran los 32 sitios con flechas en la metafase de la **Figura 14 c**. Resultó llamativo el observar con mucha mayor nitidez dichos telómeros DAPI<sup>+</sup> al aplicar la tinción con ese fluorocromo, pero luego de someter a algunas de estas preparaciones a la técnica usual de FISH para localizar regiones de ADN<sub>r</sub> específicos como el 45S (datos no incluidos en esta tesis) (**Fig. 15 b**). En este último caso se observó también en el cromosoma 5, por ello en esta última foto nombrada son 40 los sitios marcados con flechas.



**Figura 16.** *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo)  $2n = 88$ . Cariograma de metafase mitótica que corresponde a la metafase mostrada en la Figura 14 c (superposición de DAPI con CMA). Debajo se muestra el Idiograma: el cromosoma 3 presenta los sitios CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, los cromosomas 1, 2, 5, 7 y 8 presentan regiones terminales CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> (en base a la Figura 15 b). Las barras representan 5  $\mu$ m.

Con toda la información precedente fue posible armar el idiograma para *P. cattleianum* f. *lucidum* (fruto amarillo)  $2n = 88$  que se muestra en la **Figura 16**,

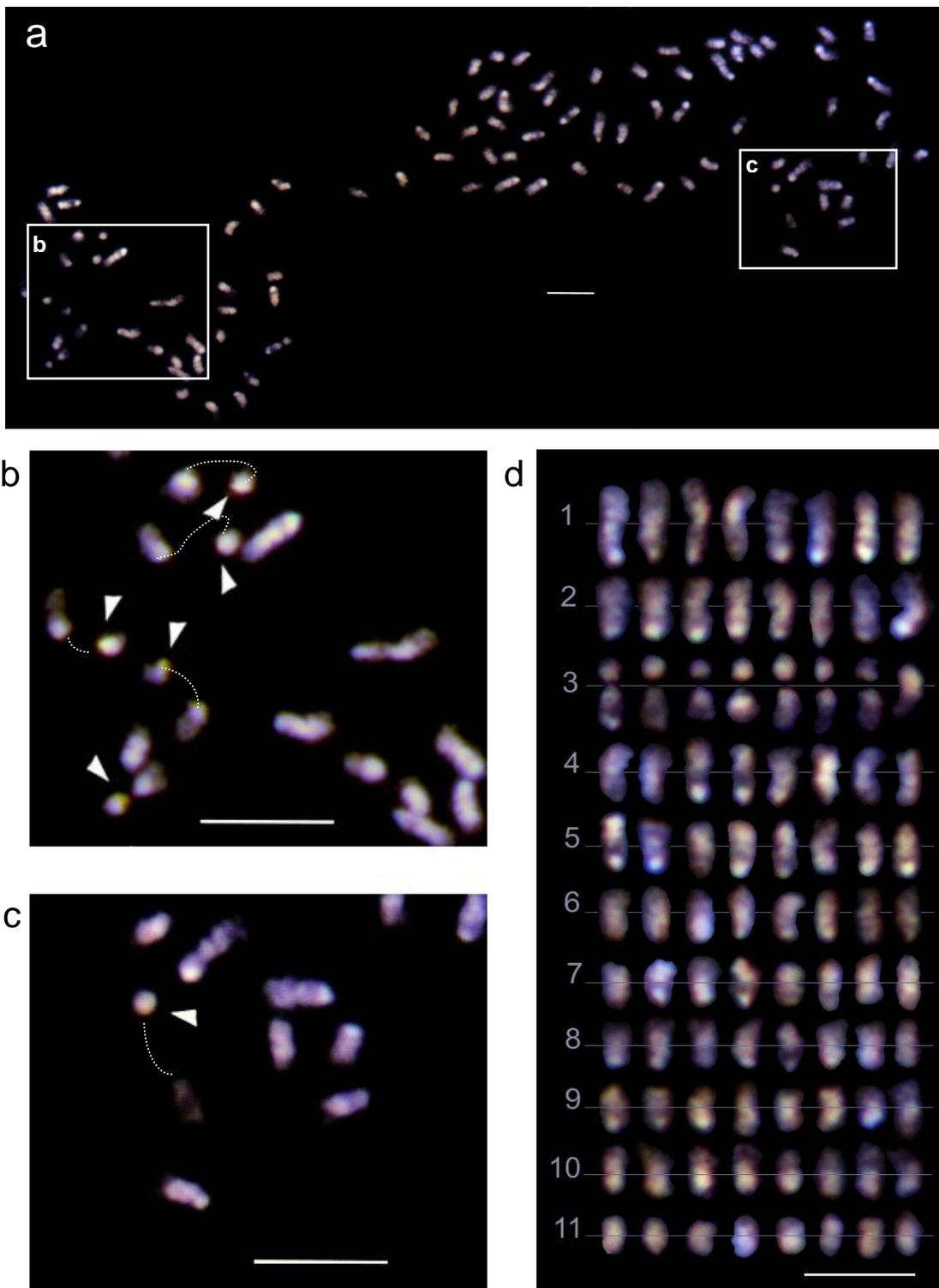
donde se representan los 11 cromosomas básicos de la especie en función de sus tamaños relativos, las bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> localizadas en el cromosoma 3 y las bandas terminales CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> en los cromosomas 1, 2, 5, 7 y 8.

Como resultado del análisis del cariotipo e idiograma de la forma de fruto amarillo de arazá, y basándonos en la presencia o ausencia de bandas negativas o positivas con ambas tinciones CMA y DAPI se puede ordenar los cromosomas en tres tipos de la siguiente manera:

(a) cromosomas que presentan una banda CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> en la región pericentromérica, ocupando mayor extensión en la zona proximal de uno de los brazos (el que es levemente menor), son 8 que corresponden al cromosoma 3;

(b) cromosomas que presentan tinción CMA<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> en la región terminal de uno de los brazos cromosómicos, se contabilizan 40 sitios correspondientes a los cromosomas 1, 2, 5, 7 y 8;

(c) cromosomas que con las técnicas utilizadas en este trabajo no evidencian ninguna tinción distintiva, son los cromosomas 4, 6, 9, 10 y 11, los que suman 40.



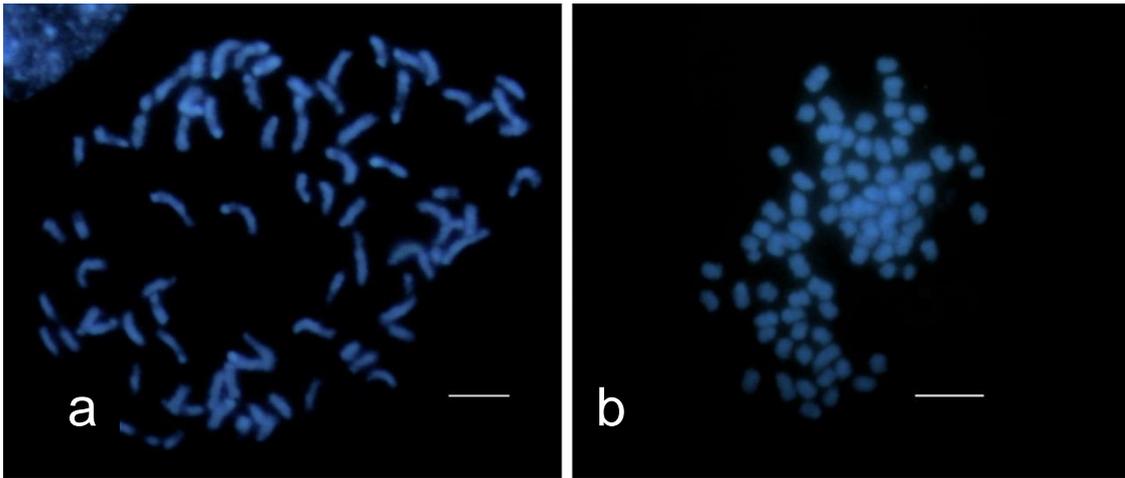
**Figura 17.** *Psidium cattleianum* f. *lucidum* (amarillo) **a.** Prometafase mitótica  $2n = 88$ , con tinción DAPI y CMA superpuestas (III-5 pl 7). **b.** detalle, se observa en cinco de los cromosomas 3 la separación de sus brazos; las puntas de flecha señalan los sitios CMA<sup>+</sup>/DAPI. **c.** detalle, se observa un sexto representante del cromosoma 3 con condensación diferencial de ambos brazos; la punta de flecha señala el sitio CMA<sup>+</sup>/DAPI. **d.** Cariograma, a partir de la foto en **a**. Las barras representan 5 $\mu$ m.

En base a las observaciones de un gran número de imágenes obtenidas a partir de los preparados realizados, se puede concluir que las bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> que caracterizan al cromosoma 3 son tan pequeñas que es difícil observarlas en cromosomas muy condensados, haciéndose más evidentes cuando el grado de condensación es más bajo; por otra parte, su localización muy próxima al centrómero que también presenta el patrón de tinción CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, provoca que muchas veces sea difícil distinguir ambas regiones cromosómicas. A su vez, este cromosoma presenta condensación diferencial en sus brazos, observándose en general mayor condensación en el brazo portador de la banda y con tendencia a separarse del otro brazo durante la realización del preparado, todo lo cual puede conducir a conteos erróneos o a que pueda ser confundido con un satélite cromosómico (**Figura 17 b y c**).

El análisis de los cariogramas de ambas formas, permite concluir que se trata de cariotipos simétricos, siendo todos los cromosomas bibraquiados y metacéntricos siguiendo la clasificación de Levan et al. (1964). Todos los cromosomas presentan menos de 3 µm de largo, por lo que se denominan de tamaño pequeño, según el criterio de Guerra (2000). En ambas formas de la especie se observan en general dos nucléolos en los núcleos en interfase, y en muy baja frecuencia se contabilizan tres o cuatro.

### **3.5. *Psidium cattleianum* f. *lucidum* de poblaciones silvestres**

En relación al trabajo de análisis de poblaciones silvestres, de los bosques nativos del este de Uruguay, hasta el presente fueron analizadas plantas provenientes de una de las poblaciones del departamento de Rocha. Las mismas se originaron de semillas cuyos frutos fueron colectadas en bosques nativos y todos eran de color amarillo. Se determinó que recién en plántulas de aproximadamente cinco meses de edad fue posible extraer raíces aptas para la realización de preparaciones citológicas.



**Figura 18.** *P. cattleyanum* f. *lucidum* silvestres (fruto amarillo) del departamento de Rocha. **a.** Prometafase somática de la planta R4,  $2n = 77$ ; **b.** Metafase somática de la planta R5,  $2n = 77$ . Las barras representan  $5 \mu\text{m}$ .

El estudio de estas plantas de origen silvestre identificadas como R4 y R5 (Rocha pl 4 y pl 5, respectivamente) permitió contabilizar en ambas 77 cromosomas en sus células somáticas de meristemo radicular (**Figura 18**), diferenciándose así de los ejemplares cultivados en la EEFAS de frutos amarillos de número cromosómico  $2n = 88$  y determinado en este trabajo.

## **4. DISCUSIÓN**

---

## DISCUSIÓN

Los esfuerzos por estudiar los recursos genéticos nativos y especialmente las plantas con frutos comestibles han aumentado en las últimas décadas. Myrtaceae es una familia con buena representación en nuestro territorio y varias especies con gran potencial productivo a investigar aún, tanto como productoras de frutos para consumo humano, como en carácter de ornamentales, entre ellas pitanga, guabayo del país, arazá, guaviyú, ubajay (Vignale y Bisio, 2005). Las plantas analizadas en este trabajo representan una pequeña parte del germoplasma de estas especies distribuidas en el país. Las que son provenientes del Jardín de Introducción de la Estación Experimental San Antonio de la Facultad de Agronomía en Salto (EEFAS) y seleccionadas por caracteres de interés productivo por la Ing. Vignale fueron originalmente plantados en parques, jardines y quintas frutales en diferentes regiones del país. Dado que el consumo familiar de estos frutos nativos tiene una larga tradición en el medio rural, muchos de los ejemplares colectados ya han sufrido cierto proceso de selección por parte de los pobladores locales en relación a la calidad de fruta, obteniendo genotipos superiores desde el punto de vista productivo que hoy pueden ser aprovechados en los programas de mejoramiento.

Los materiales colectados de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, provienen tanto de áreas silvestres y subespontáneas, como de jardines de establecimientos rurales y quintas frutícolas; los altos niveles de diversidad genética encontrados en esta especie a partir de los estudios realizados, tanto dentro de las poblaciones silvestres como en materiales cultivados, constituye un valioso recurso para el programa de mejoramiento; en ese sentido, ya se han realizado algunos cruzamientos utilizando plantas de origen silvestre con el objetivo de incorporar características de interés a los materiales cultivados por medio de la selección de poblaciones segregantes.

En el caso de la especie *Psidium cattleianum* Sabine, los materiales que están siendo evaluados provienen de parques urbanos y jardines de establecimientos rurales, no incluyendo hasta el momento ejemplares de origen silvestre. En

este trabajo iniciamos el estudio de plantas recientemente colectadas directamente en montes nativos del este del país, que actualmente forman parte de la colección mantenida en la Facultad de Agronomía. Se cuenta con plantas silvestres provenientes de Rocha, Cerro Largo y Treinta y Tres, aparentemente bien adaptadas a las condiciones de invernáculos, y en buen estado general adecuado para su utilización en distintos tipos de análisis. Hasta el momento sólo se han analizado plantas de arazá de fruto amarillo provenientes de poblaciones naturales del departamento de Rocha, encontrándose características que las distinguen claramente de los materiales de fruto amarillo mantenidos en la EEFAS, desde el punto de vista de su constitución cromosómica. Esta diferencia que surge de un análisis preliminar, es indicio de que estas poblaciones silvestres pueden ser fuente de variabilidad genética que eventualmente podría ser utilizada en programas de mejoramiento. Es importante considerar que los materiales provenientes de los departamentos de Cerro Largo y Treinta y Tres aún no han sido analizados, y que todas las plantas de origen silvestre mantenidas en la Facultad son sólo una pequeña muestra de las existentes en las poblaciones naturales localizadas. Con el fin de lograr un conocimiento más completo de los recursos genéticos con los que se cuenta en esta especie, sería necesario el estudio de la diversidad genética presente en estas poblaciones naturales.

#### **4.1. Metodologías citogenéticas para el estudio de las dos especies de Mirtáceas.**

Para la puesta a punto de las técnicas de elaboración de preparados tanto para *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como de *Psidium cattleianum* Sabine, se tomaron como base algunos ajustes metodológicos iniciados por I. da Cruz (com. pers.) y se realizaron ensayos con distintas concentraciones de enzimas y tiempos de digestión, distintas concentraciones de ácido acético y tiempo de acción, así como también distintas concentraciones de ácido clorhídrico para hidrólisis del material a diferentes temperaturas. Se obtuvieron mejores resultados para la eliminación de citoplasma con el procedimiento secuencial de digestión enzimática, hidrólisis con HCl y finalmente la aplicación de ácido

acético. El uso combinado de ambos ácidos ha sido utilizado con buenos resultados en trabajos anteriores de análisis citogenéticos en otras especies (Éder-Silva, 2007; Preeda et al., 2007).

La segunda metodología de elaboración de preparados descrita en la sección de Materiales y métodos, es la que permite obtener una mejor dispersión de cromosomas a través del proceso de aplastado, y también se logra contribuir a la eliminación del citoplasma por medio del flambeado, aunque no se obtiene tan buena separación entre los núcleos celulares. La primera metodología proporciona una buena separación de núcleos, facilitando la identificación, pero al no realizarse el aplastado, los cromosomas aparecen superpuestos o en distintos planos especialmente en el caso de arazá, dificultando el conteo cromosómico y la identificación del bandeo; además, se observó con esta técnica una mayor persistencia de citoplasma. Sería ideal lograr poner a punto una combinación de ambas técnicas.

Por otra parte se ensayaron distintas técnicas de tinción utilizadas en la citogenética clásica, constatando que las tinciones con los colorantes orceína lactopropiónica o carmín acético, no resultan suficientemente informativas en estas mirtáceas. Con orceína no se logró una adecuada tinción de los preparados elaborados con las técnicas descritas, no habiéndose identificado hasta el momento las razones de dicha dificultad. Cuando se utilizó carmín, en las metafases con alto grado de condensación de los cromosomas y dado su pequeño tamaño, la tinción no permitió determinar patrones heteropícnóticos. En los casos en que los cromosomas aparecían más distendidos (profases y metafases), no se obtuvo un contraste adecuado entre cromosomas y citoplasma circundante.

Dado que se obtuvieron mejores imágenes cuando se ensayaron técnicas de tinción de los preparados utilizando los fluorocromos 4',6-diamidinofenilindol (DAPI) y Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA), se optó por el análisis y confección de cariotipos en base a imágenes obtenidas luego de aplicar la doble tinción secuencial con estos fluorocromos. Esta técnica de tinción diferencial también ha resultado más efectiva para la observación microscópica de cromosomas pequeños de otras familias de plantas en trabajos anteriores (Preeda et al.,

2007). A su vez, se pudo constatar que los mejores resultados en relación a la efectividad de la tinción, se obtuvieron cuando los preparados se dejaron envejecer durante tres días exactamente. También se observó que la CMA es más sensible a la presencia de citoplasma que el DAPI, por lo cual se obtuvieron imágenes más claras en preparaciones de buena calidad en ese sentido. Finalmente, el extenso trabajo de puesta a punto de las técnicas de elaboración de preparados y su posterior tinción, así como el de ajustes en microscopio para lograr la mayor claridad de imágenes, permitieron obtener fotografías digitales de gran calidad, necesaria para realizar los diversos análisis.

#### **4.2. Análisis cromosómicos**

Como ya se señaló, la mayor parte de los estudios cromosómicos en la familia Myrtaceae se realizaron en las especies de frutos secos, de origen australiano, especialmente en especies de la tribu *Eucalypteae*, debido seguramente a su gran interés productivo (Atchison, 1947; Rye, 1979; Matsumoto, 2000; Costa, 2004); los datos referentes a especies de frutos carnosos (tribu Myrteae), corresponden en general a especies presentes en Brasil y dentro de ellas las que poseen mayor interés económico (géneros *Psidium*, *Eugenia*, *Acca*, *Campomanesia*, *Myrciaria*, *Pimenta*, *Plinia*) (Atchison, 1947; Rye, 1979; Costa, 2004; Costa y Forni-Martins, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b). Una revisión realizada por Costa (2009) concluye que hasta ese momento eran conocidos los números cromosómicos de 104 especies de 25 géneros de Myrteae, representando apenas 4,1 % de las especies y la mitad de los géneros de esta tribu. Siendo que varios géneros neotropicales siguen siendo aún desconocidos desde el punto de vista cromosómico, estas especies encierran un gran potencial para ser explorado.

El hecho frecuente de que en los estudios cromosómicos realizados en las especies de Mirtáceas, no se aporte información sobre su morfología, es explicado por distintos autores en base las dificultades que presenta el trabajo de caracterización de cromosomas tan pequeños, en todos los casos con largo inferior a 3  $\mu\text{m}$  (Atchison, 1947; Vijayakumar y Subramanian, 1985; Costa,

2004). Es de destacar que todos los análisis anteriores en Mirtáceas fueron realizados en base a tinciones convencionales y no diferenciales, siendo la más frecuentemente utilizada por los autores citados la tinción con Giemsa; dadas las características de los cromosomas en este grupo esas técnicas no han permitido obtener imágenes suficientemente claras como para realizar análisis precisos. En ese sentido, Costa y Forni-Martins (2007a) señalan que las técnicas convencionales no han sido suficientes para caracterizar desde el punto de vista cromosómico a las especies de Mirtáceas y para resolver las relaciones entre ellas.

En nuestro país, a pesar de la importancia del guayabo y el arazá como productoras de frutos comestibles directamente y procesados (jaleas, mermeladas, jugos), son especies poco estudiadas desde el punto de vista genético; es relativamente reciente el interés en realizar un estudio sistemático de estas especies nativas con potencial comercial, razón por la cual la información existente es en general escasa y fragmentaria. Por esta razón, los análisis realizados en este trabajo constituyen en su mayoría los primeros abordajes para profundizar en la caracterización citogenética de las especies *Acca sellowiana* (Berg.) Burret y *Psidium cattleianum* Sabine nativas de Uruguay.

#### **4.2.1 Análisis cromosómicos en *Acca sellowiana* (Berg.) Burret**

A partir de un trabajo preliminar realizado en nuestro laboratorio por I. Da Cruz y C. Mazzella (com. pers.) se determinó que en los mismos materiales analizados en esta tesis el número cromosómico somático en el guayabo del país *Acca sellowiana* era de 22 cromosomas. El análisis realizado en el presente trabajo sobre los mismos materiales (**Tabla 2:** RN3 VIII-14, LL3 VIII-16, JP IX-16) confirmó esos resultados, que son la primera determinación para la especie en Uruguay. El número cromosómico había sido determinado para la especie con materiales de otros orígenes por Bowden (1945), Atchison (1947) y Costa (2008), éste último en materiales de Brasil.

El análisis del cariotipo de *A. sellowiana* presentado por primera vez en este trabajo, permitió confirmar el carácter diploide de esta especie. Observando las metafases obtenidas, se encontró que el par cromosómico 1 (el de mayor tamaño), se distingue fácilmente del resto, así como también el par cromosómico 11, que es notoriamente más pequeño que los demás. Es llamativo el aspecto del cromosoma 3, el que frecuentemente se observa con sus brazos separados. La caracterización de los pares cromosómicos según su tamaño y localización del centrómero, se pudo realizar en base a los datos cuantitativos obtenidos de las mediciones realizadas en los cariogramas. A partir de este análisis se pudo determinar que todos sus cromosomas son metacéntricos (según clasificación de Levan, 1964) y de tamaño pequeño (menores a 3  $\mu\text{m}$ , según la clasificación de Guerra, 2000).

Con el bandeo diferencial obtenido al aplicar la técnica de doble tinción secuencial con los fluorocromos CMA y DAPI, se pudieron detectar en *A. sellowiana* dos bandas de heterocromatina CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> que caracterizan a ambos integrantes del par cromosómico número tres. A pesar de ser una de las técnicas más utilizadas en citogenética para realizar análisis cariotípicos, no se encontraron registros de que haya sido usada anteriormente para la caracterización de especies de la familia Myrtaceae. En ese sentido, los resultados aquí presentados también constituyen un aporte original, y comprueban la efectividad de esta metodología de uso combinado de estos fluorocromos para realizar análisis cariotípicos en estas especies. Dado que las regiones heterocromáticas correspondientes a las regiones organizadoras nucleolares (NOR) casi siempre coinciden con bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Guerra, 2000), y habiendo sido identificadas sólo dos bandas de este tipo en el genoma de *A. sellowiana*, se puede inferir que estos sitios podrían corresponder a la localización de secuencias codificantes de ARN ribosómico 45S (ADNr 45S). En las células analizadas de esta especie se observó que estas dos señales aparecen muy frecuentemente asociadas a las regiones nucleolares en núcleos interfásicos y prometafásicos, observación que apoyaría la hipótesis de que corresponden a la localización de ADNr 45S. Esto podría ser confirmado en el futuro mediante la aplicación de técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) utilizando sondas de ADNr 45S. Dado que estas regiones

características (ADN 45S, ADNr 5S) se encuentran presentes en todos los genomas tanto animales como vegetales, y puesto que su número y localización en los cromosomas varían entre especies, su detección ha permitido realizar estudios comparativos entre especies o géneros de plantas aportando datos útiles para resolver delimitaciones taxonómicas o relaciones filogenéticas, convirtiéndola en otras de las técnicas más utilizadas en la caracterización citogenética de las especies (Guerra, 2000). Sin embargo, sólo hay un trabajo previo de aplicación con sondas de ADN45S para analizar especies de Mirtáceas de los géneros *Psidium* (nueve especies), *Campomanesia* (dos) y una especie de *Pimenta* (Costa, 2009).

El idiograma correspondiente al cariotipo de *Acca sellowiana* que se muestra en la **Figura 9** junto con los valores que se presentan en la tabla adjunta a dicha figura, resumen la información generada en esta investigación sobre esa especie y constituye una contribución original al análisis estructural de su genoma, ya que no se encontró en la literatura descripciones de tamaño y morfología cromosómica de esta especie ni de las otras del mismo género. El tamaño total del complemento cromosómico diploide cuantificado en este trabajo es de 43,3  $\mu\text{m}$ , y permitió estimar el largo total del complemento haploide que es de 21,65  $\mu\text{m}$ .

En 2011 a partir de ejemplares cultivados del programa de mejoramiento de EEFAS se obtuvo el valor del contenido de ADN  $2C = 0,74$  pg (Pritsch et al., 2012), obtenido por citometría de flujo en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo del IIBCE. Por lo que la cantidad de ADN en el set básico de cromosomas (genoma monoploide,  $x = 11$ ) sería de  $1C = 0,37$  pg. Se trata por ello de una especie de genoma muy pequeño según la clasificación propuesta por Leitch (1998), quien considera que valores  $1C \leq 1.4$  pg corresponden a genomas muy pequeños, con menos de 1369 Mpb. Comparando este valor con el determinado por primera vez por medio también de la técnica de citometría de flujo por Costa (2008) en un ejemplar de Brasil,  $2C = 0,503$  pg ( $Cx = 0,252$  pg), se deduce que el genotipo de Uruguay tendría un contenido de ADN algo mayor. En relación al valor de longitud total del genoma haploide ( $x = 11$ ) determinado en este trabajo, las 21,65  $\mu\text{m}$  estimadas en etapa de metafase mitótica, corresponderían a los 0,37 pg determinados en

el genotipo analizado en Uruguay. Ambos valores están en concordancia, ya que en los dos casos estarían indicando que se trata de genomas muy pequeños.

#### **4.2.2 Análisis cromosómicos en *Psidium cattleianum* Sabine**

En la especie *Psidium cattleianum* los números cromosómicos  $2n = 77$  y  $2n = 88$  determinados en el presente trabajo representan los primeros registros para la misma de las plantas que se encuentran en Uruguay. El citotipo  $2n = 88$  determinado en nuestro trabajo para *Psidium cattleianum* f. *lucidum* coincide con el anteriormente descrito por Atchison (1947), y el citotipo  $2n = 77$  encontrado en *P. cattleianum* var. *cattleianum* fue reportado anteriormente por Hirano y Nakasone (1969) y por Singhal (1980). Teniendo en cuenta el número cromosómico básico determinado para la familia  $x = 11$  (Atchison, 1947; Rye, 1979; Costa, 2004; Costa y Forni-Martins, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b) y nuestro análisis de los cariogramas construidos, se puede deducir que se trata de materiales heptaploides ( $7x = 77$ ) y octoploides ( $8x = 88$ ).

Una primera observación que surge del análisis de los resultados de este trabajo realizado con materiales distribuidos en Uruguay, es que todos los genotipos analizados correspondientes a plantas cultivadas en la EEFAS con frutos rojos, *P. cattleianum* var. *cattleianum*, presentaron un complemento cromosómico somático heptaploide  $2n = 7x = 77$ , diferenciándose del genotipo cultivado en la EEFAS de frutos amarillos, *P. cattleianum* f. *lucidum*, que presentó un número cromosómico octoploide  $2n = 8x = 88$ . Sin embargo, resultó sorprendente que el análisis de plantas de frutos amarillos pero provenientes de poblaciones silvestres reveló, a diferencia de las de la EEFAS, un citotipo heptaploide  $2n = 7x = 77$ .

Comparando con toda la información publicada sobre esta especie que se resume en la **Tabla 1**, vemos que la forma de fruto rojo presenta niveles de ploidía  $6x$ ,  $7x$  y  $8x$ , mientras que la amarilla los presenta  $4x$ ,  $6x$  y  $8x$ , no existiendo el citotipo diploide. Estos datos surgen de ejemplares provenientes principalmente de Brasil, India y algunos de origen no determinado. Es por ello

un aporte original de este trabajo de tesis, el haber determinado por primera vez el citotipo heptaploide  $2n = 77$  en ejemplares de fruto amarillo. Es además interesante el hecho de que pertenecen a poblaciones silvestres distribuidas en bosque nativo del departamento de Rocha, Uruguay.

En resumen, según la información disponible hasta el momento, la especie no presenta el citotipo diploide sino sólo poliploides  $4x$ ,  $6x$ ,  $7x$ , y  $8x$ . Ambas formas, tanto la de fruto rojo como de fruto amarillo, coinciden en presentar niveles de ploidía  $6x$ ,  $7x$  y  $8x$ , y sólo en la de frutos amarillos se conoce el citotipo de 44 cromosomas que es el de menor nivel de ploidía para la especie. En base a estos resultados y analizando los datos presentados en la **Tabla 1** correspondientes a registros cromosómicos para *P. cattleyanum* encontrados en la revisión bibliográfica, podría concluirse que en esta especie el nivel de ploidía no tendría correlación con el color de frutos.

#### **4.2.2.1 Tamaño y morfología cromosómica de *P. cattleyanum* Sabine**

Analizando comparativamente las características tamaño y morfología cromosómica, entre *P. cattleyanum* var. *cattleyanum* (fruto rojo)  $2n = 7x = 77$ , y de *P. cattleyanum* f. *lucidum* (fruto amarillo)  $2n = 8x = 88$ , se puede concluir que no presentan diferencias apreciables, ya que todos fueron metacéntricos y con un valor similar para el largo total del complemento cromosómico básico que fue de 21,9 y 20,91  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Sólo existe un trabajo previo donde se presentan datos relacionados con tamaño y morfología cromosómica de *P. cattleyanum* correspondiente al citotipo  $2n = 4x = 44$  de frutos amarillos, en el cual se describe el cariotipo con 19 cromosomas metacéntricos y 3 submetacéntricos, con un largo que varía en el rango 1,09 - 0,45 micras; el largo total cromosómico estimado para este cariotipo básico de 22 cromosomas, fue de 31,9  $\mu\text{m}$  (Costa y Forni-Martins, 2007b). En el presente trabajo de tesis, se llegó a determinar para la forma de frutos amarillos  $2n = 88$  (cultivada) un largo cromosómico bastante mayor, comprendido entre 1,31 y 2,67  $\mu\text{m}$ , aunque esta diferencia de tamaños puede ser explicada por el distinto grado de condensación presentado por los

cromosomas en las metafases analizadas. Por otro lado, por medio del análisis del cariotipo se determinó un nivel de ploidía  $8x$ , con un número básico por genomio de 11 cromosomas, por lo cual el largo total del complemento cromosómico básico fue de  $20,91 \mu\text{m}$ . A su vez, a partir de los datos aportados por Costa y Forni-Martins (2007b) donde 22 cromosomas miden  $31,9 \mu\text{m}$ , se puede estimar que para el genomio básico  $x = 11$ , el largo total sería de  $16 \mu\text{m}$ , valor muy similar al obtenido en nuestro trabajo, aunque algo menor. Esto demostraría que al menos en la forma de frutos amarillos, hay conservación de los tamaños de cada uno de los 11 cromosomas básicos, en los citotipos  $2n = 44$  y  $2n = 88$ .

En este último trabajo se analiza también el cariotipo de la especie *Psidium cinereum*,  $2n = 44$  obteniendo un valor de  $28,25 \mu\text{m}$  para el largo total de los cromosomas metafásicos y cuya fórmula cariotípica se define como  $12m + 10sm$ . En Costa (2013) se realizan estudios cariotípicos de 15 especies del género *Psidium* y se determinó que en estas especies existe la predominancia de cromosomas metacéntricos, de tamaños semejantes y menores a 2 micras, en todas las especies analizadas. Anteriormente Vijayakumar y Subramanian (1985) proporcionan datos cariotípicos de varios cultivares de *Psidium guajava*, todos con  $2n = 2x = 22$ , con tamaños cromosómicos variando entre  $0,8$  y  $1,8 \mu\text{m}$ , y cuyos valores de largo cromosómico total varía entre  $21,2$  y  $32,8 \mu\text{m}$ .

En resumen, los análisis cariotípicos realizados hasta el momento en especies del género *Psidium* (Myrtaceae), han revelado que todas presentan cariotipos simétricos, con cromosomas de tamaño similar y poca diferencia de morfología entre ellos, y en todos los casos se trata de genomas de tamaño muy pequeño, según clasificación propuesta por Leitch (1998).

Existen en la literatura algunos pocos datos referentes a tamaños cromosómicos en otros géneros de Mirtáceas, de los cuales se realizó una recopilación presentada en el **Anexo II Tabla I**. El análisis comparativo de estos datos permite concluir que existe poca variación en los tamaños cromosómicos de las distintas especies, cuyos valores se encuentran dentro del rango de  $0,38 - 2,72 \mu\text{m}$ . Los largos cromosómicos de las especies analizadas en este trabajo se encuentran incluidos en dicho rango. De igual

manera, los valores estimados para el largo total por genomio en cada una de las especies (incluyendo las estudiadas aquí) varía de manera gradual entre 10,4 y 22,5  $\mu\text{m}$ , como se observa en el histograma presentado en la **Anexo II Tabla II**. Esta similitud en cuanto a tamaños cromosómicos y relativamente constantes características morfológicas, determinan que estos parámetros no resulten útiles para la caracterización de los distintos grupos taxonómicos, haciendo necesaria la aplicación de otras técnicas de bandeos cromosómicos, identificación de regiones NOR o hibridación *in situ* que permitan caracterizar estos genomas (Costa y Forni-Martins, 2007b).

#### 4.2.2.2 Doble tinción diferencial con los fluorocromos CMA y DAPI

Con los objetivos por un lado de caracterizar cromosómicamente a la especie, así como de encontrar diferencias cariotípicas entre la forma de fruto rojo y la de fruto amarillo, se aplicó la doble tinción diferencial con los fluorocromos CMA y DAPI. A pesar de las dificultades de trabajar con una especie que posee todos sus cromosomas pequeños y numerosos, se logró realizar buenos cariogramas en el caso de *P. cattleyanum* f. *lucidum* (fruto amarillo) de  $2n = 8x = 88$  y en *P. cattleyanum* var. *cattleyanum* (fruto rojo) de  $2n = 7x = 77$ .

En *P. cattleyanum* f. *lucidum* se logró incluso realizar agrupamiento en tres tipos cromosómicos en base a los patrones distintivos que resultan luego de realizar la doble tinción diferencial CMA y DAPI. Se distinguen tres patrones, que llamaremos cromosomas de tipos: a, b y c. El tipo (a) que posee una característica banda heterocromática  $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$  que se aprecia nítidamente en la región pericentromérica, corresponde al cromosoma 3 (los ocho cromosomas la muestran) (**Fig. 15**). Se observó que esta banda pierde su visibilidad en cromosomas muy condensados. Coincidentemente con lo observado en *Acca sellowiana* dicha banda también se localiza en el cromosoma 3. Esta coincidencia no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que estas son dos especies muy cercanas en un sentido filogenético; ambos géneros, junto a *Campomanesia* y *Pimenta*, han sido confirmados como grupo monofilético e incluidos dentro del grupo *Pimenta* en base a análisis morfológicos y moleculares de sus genomas (Lucas et al., 2007), razón por la

cual podrían también conservar algunas características cariotípicas comunes. Según Guerra (2000) dentro de un grupo de especies muy cercanas no son comunes los cambios drásticos en los patrones generales de distribución de la heterocromatina. Futuros análisis en un mayor número de especies podrían confirmar si esta es efectivamente una característica conservada dentro del grupo o de la tribu.

Por otra parte, los cromosomas de *P.cattleyanum* f. *lucidum* del tipo (b), se identificaron por ser portadores de regiones teloméricas que presentan bandeo positivo para el DAPI, y que se localizan en todos los casos en uno solo de sus brazos. En las metafases donde estos sitios DAPI<sup>+</sup> pudieron ser observados con mayor claridad, se llegó a contabilizar 40 bandas terminales DAPI<sup>+</sup> que son señaladas con flechas en la metafase que se muestra en la **Figura 15 b**. Debido a su mayor tamaño se determinó con facilidad que los cromosomas 1 y 2 del cariotipo básico poseen esta banda característica. Las restantes señales DAPI<sup>+</sup> están sobre otros tres cromosomas que corresponden al 5, 7 y 8.

Estas señales DAPI<sup>+</sup> fueron observadas en la mayoría de los núcleos analizados, si bien no fueron evidentes en todos. En algunas ocasiones no se visualizaban luego de realizar una primera tinción con el fluorocromo DAPI, pero sí se evidenciaron al analizar los preparados después de ser sometidos a la técnica de FISH (**Fig. 16**). Esta situación ha sido descrita y analizada metodológicamente en trabajos donde estas técnicas fueron utilizadas en otras familias de plantas (Barros e Silva y Guerra, 2009). Estos investigadores concluyeron que efectivamente la aplicación de la técnica de FISH previa a la tinción con DAPI puede aumentar el contraste de estas bandas con respecto al resto de las regiones del cromosoma que corresponden a eucromatina, haciéndolas más evidentes, posiblemente porque el proceso de desnaturalización del ADN necesario durante el procedimiento de FISH afectaría de alguna manera la estructura cromosómica. A la vez determinaron que pueden también aparecer señales DAPI<sup>+</sup> que no necesariamente correspondan a regiones ricas en las bases AT. Como en este trabajo con arazá las señales DAPI<sup>+</sup> fueron también observadas en preparaciones que no fueron sometidas previamente a la técnica FISH, y al mismo tiempo se determinó que coinciden con bandas negativas para la CMA (pobres en GC),

se concluye que los sitios DAPI<sup>+</sup> detectados corresponderían a regiones ricas en AT.

Por último, el grupo de cromosomas de tipo (c) son los que no presentan patrón de bandeado evidente con esta metodología de tinción. Corresponden a los integrantes de los cromosomas 4 y 6, así como los más pequeños 9, 10, 11.

En conclusión, en base a lo discutido para el genomio ( $x = 11$ ) de la forma de fruto amarillo, y teniendo en cuenta como parámetros el largo total del cromosoma, la localización de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, y la localización de bandas DAPI<sup>+</sup>, es posible identificar los cromosomas 3, 4, 5 y 6, e identificar el 1 y el 2 pero no distinguirlos entre sí, lo mismo sucede con el 7 y 8 entre sí, y por último con el 9, el 10 y el 11 entre sí.

A diferencia de las muy buenas imágenes obtenidas para la forma de arazá de fruto amarillo, se lograron pocas preparaciones que permitieran un buen nivel de análisis del cariotipo determinado para la forma de fruto rojo, *P. cattleyanum* var. *cattleyanum*. En la mejor de las metafases donde se logró una efectiva tinción, se detectaron 7 sitios que presentan señales CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, siempre localizadas en los cromosomas de mayor longitud (1, 2 o 3), no pudiéndose identificar si es uno o varios y en cuál (**Fig. 13 d**). En varios casos fue interesante observar hasta 5 señales CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> en interfases y profases, asociadas a un gran nucléolo (**Fig. 13 a, b, c**). Las bandas heterocromáticas observadas asociadas al nucléolo podrían coincidir con ADN ribosomal 45S, lo que podría a futuro dilucidarse con la técnica de FISH. En esta forma de frutos rojos, también se observaron bandas DAPI<sup>+</sup> de localización telomérica y siempre en uno sólo de los brazos cromosómicos, se han contabilizado un máximo de 32. Al no lograr buenas preparaciones que permitan cariotipar por largos cromosómicos, no se aporta aún un idiograma, se debe seguir investigando hasta lograrlo.

A partir de los resultados obtenidos y comparando ambas formas de la especie (fruto rojo y fruto amarillo), se puede concluir que presentan algunas similitudes: las CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> tienen localización pericentromérica en alguno de los cromosomas mayores, y en ambos casos las señales DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> se localizan en uno de los telómeros. Por otro lado y puesto que se llegaron a

contar 32 bandas terminales DAPI<sup>+</sup> (**Fig. 11 b**) en la primera forma (fruto rojo) y 40 del mismo tipo en la segunda (fruto amarillo), teniendo en cuenta que son 7x y 8x, respectivamente, se puede concluir que el número de bandas DAPI<sup>+</sup> está en concordancia con el nivel de ploidía. Si este patrón de distribución de heterocromatina detectada por CMA y por DAPI fuera una característica conservada, el idiograma correspondiente al cariotipo básico (un genomio) de la forma de fruto rojo, *P. cattleyanum* var. *cattleyanum*, debería coincidir con el determinado en este trabajo para la forma *P. cattleyanum* f. *lucidum* .

Siendo la heterocromatina NOR la más característica de las bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> detectada por medio de estos fluorocromos (Guerra, 2000), es esperable que los sitios encontrados puedan coincidir con secuencias de ADNr 45S. En ese caso, de acuerdo con nuestros resultados, la forma de frutos amarillos 2n = 8x = 88 (*P. cattleyanum* f. *lucidum*) debería presentar un máximo de 8 sitios correspondientes a NOR-heterocromatina y *P. cattleyanum* var. *cattleyanum* debería presentar 7. La posibilidad de que estas bandas correspondan a la localización del ADNr, como ya discutimos en la sección 4.2.1 de *A. sellowiana*, puede ser verificada por medio de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En el único trabajo previo con aplicación de sondas de ADN 45S para analizar especies de Mirtáceas (Costa, 2009), se publicó en plantas de *P. cattleyanum* 2n = 4x = 44 y 2n = 6x = 66, de frutos amarillos y rojos, respectivamente. Los resultados que dicho autor presenta de manera primaria con fotografías difíciles de reinterpretar por nosotros, indican que en el citotipo tetraploide fueron observados seis sitios de localización terminal correspondientes a ADNr 45S; en el hexaploide se observaron 10 sitios, siendo ocho de ellos terminales y dos intercalares. Como el autor mismo recalca en esta tesis doctoral que sus resultados son preliminares, se debe seguir investigando para dilucidar la localización de estos sitios así como su cuantificación.

En *Psidium cattleyanum*, igual que lo observado en *Acca sellowiana*, debido al procedimiento de elaboración de preparados y posiblemente relacionado con la localización pericentromérica de las regiones ricas en GC o CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, el brazo del cromosoma 3 que las porta tiene tendencia a separarse del resto del cromosoma, pudiendo ser confundidos al observar las metafases con

cromosomas independientes o con satélites, dificultando el análisis e interpretación de imágenes (**Fig. 16 a, b, c**). Del mismo modo que en el guayabo, el brazo que contiene estas regiones CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> presenta condensación diferencial observándose en general más condensado en prometafase que el otro brazo. Estas características observadas son importantes porque pueden inducir a interpretaciones erróneas. Hay 3 artículos donde se indica presencia de regiones satélite en varias especies de *Psidium*, entre ellas *P. cattleyanum*. Hirano y Nakasone (1969) utilizando tinción con orceína acética para el análisis de metafases, describen la presencia de un par de satélites cromosómicos en *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* (frutos amarillos) 2n = 66, señalando que no pudieron ser observados en la forma de frutos rojos de *P. cattleyanum*. En el mismo trabajo indican un par de satélites en plantas cultivadas de *P. guajava* (2n = 33, 24, 25) y en *P. friedrichsthalianum* (2n = 22, 66). Éder-Silva et al. (2007) indican satélites terminales en una metafase analizada de *Psidium arboreum* (2n = 98) y en *Psidium araca* = *Psidium guineense* dos satélites “*largamente distendidos por la ocurrencia de una constricción secundaria proximal*”. También han sido observados satélites en las especies *Campomanesia adamantium* (2n = 22) y *Pimenta dioica* (2n = 22) (Costa, 2009), géneros muy cercanamente emparentados con *Psidium*. Estos dos últimos autores utilizan la técnica de tinción con Giemsa. En las imágenes que acompañan estos trabajos, todas obtenidas con métodos de tinción convencionales, es notoria la similitud en el tamaño y la morfología cromosómica en las distintas especies incluyendo las analizadas por nosotros. Según nuestra experiencia en este trabajo, no se trataría de satélites sino de brazos cortos muy condensados, por lo dicho anteriormente. Con la técnica de doble tinción diferencial con los fluorocromos CMA y DAPI utilizada aquí se logró obtener imágenes de mayor claridad permitiendo aclarar esta confusión.

#### **4.2.2.3 Contenido en picogramos de ADN**

El contenido de ADN genómico (valor C) ha resultado ser un parámetro útil para comparar variedades o especies de plantas, y puede ser rápidamente determinado por medio de la técnica de citometría de flujo. En 2011 se

analizaron por medio de esta técnica plantas de *P. cattleyanum* provenientes del programa de mejoramiento de EEFAS, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos de arazá de fruto rojo (2C = entre 3,75 y 3,89 pg), siendo el promedio de varias plantas analizadas de 2C = 3,7 pg. Sí se encontró diferencia entre éstas y una planta del genotipo correspondiente a la forma de fruto amarillo (descendiente de la planta III-5), en la cual se obtuvo el valor 2C = 4,25 pg (C. Pritsch, com. pers; Speroni et al., 2012). Estos datos se presentan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** *Acca sellowiana* (Berg) Burret y *Psidium cattleyanum* Sabine, número cromosómico y contenido de ADN nuclear estimado por citometría de flujo. (\*) 1pg ADN = 978 Mpb (Dolezel et al., 2003).

Especie	2n	2C pg	Cx (pg)	1Cx (Mpb) (*)	Origen	Autor
<b><i>Acca sellowiana</i></b>	22	0.503 ± 0.019	0.252	246	IRC,s/n. SP, Campinas, Brasil	Costa, 2008
	22	0.74	0.37	362	EEFAS, Uruguay	Pritsch, 2012
<b><i>Psidium cattleyanum</i> (fruto amarillo)</b>	44		0.526	515	IRC 489 SP, Campinas, Brasil	Costa, 2008
	88	4,25	0.531	518	Progenie de III-5, EEFAS, Uruguay	Speroni et al., 2012
<b><i>Psidium cattleyanum</i> (fruto rojo)</b>	66	2.91	0.485	474,33	Rio de Janeiro, Brasil	Costa, 2009
	77	3,82	0.546	534	Progenie de IV-1. IV-3, Solari, EEFAS Uruguay	Speroni et al., 2012

Esta diferencia en el contenido de ADN entre ambas formas de *P. cattleyanum*, puede ser explicada considerando los niveles de ploidía determinados en este trabajo para las mismas plantas. Para la variedad de fruto amarillo con ploidía 8x, el valor del contenido de ADN promedio por genomio sería  $Cx = 4,25 \div 8 = 0,531$  pg, y el valor por genomio para la forma de frutos rojos de ploidía 7x sería  $Cx = 3,82 \div 7 = 0,546$  pg. Esto está en concordancia además con los valores similares del largo total del complemento cromosómico básico

cuantificado en este trabajo que fue de 21,9  $\mu\text{m}$  para la forma de frutos amarillos y de 20,91  $\mu\text{m}$  para la de frutos rojos.

Se concluye entonces que, por un lado ambas formas de arazá presentarían el mismo valor de contenido de ADN y por lo tanto el tamaño del genoma se mantiene conservado. Por otro lado, dado que el contenido de ADN estimado está en relación directa con el nivel de ploidía determinado, se pudo comprobar que el contenido total de ADN (valor 2C) resultaría ser un parámetro útil para estimar de forma indirecta el nivel de ploidía en ejemplares de esta especie. En el trabajo de Costa (2008) existen registros del contenido de ADN de *Psidium cattleianum* tanto para plantas de frutos amarillos  $2n = 44$  (cultivadas en Campinas, Brasil), como de frutos rojos  $2n = 66$  (cultivadas en Rio de Janeiro, Brasil). En dicho trabajo se anotan de una manera confusa valores que llaman 2C y 1Cx, aquí optamos por considerar por ser más claros, solamente la lista de valores 1Cx que corresponden al estimado para un genomio. En este sentido en su tabla *P. cattleianum* de fruto amarillo ( $2n = 4x = 44$ ) tiene un valor Cx de 0,526 pg, el que coincidiría con el valor estimado en nuestros materiales de 0,531 pg (ver **Tabla 4**). Así mismo dicho autor indica que para ejemplares de *P. cattleianum* de fruto rojo ( $2n = 6x = 66$ ) su valor Cx sería de 0,485 pg (calculado a partir de las 1424,92 Mpb que reporta para 1C). En este caso la diferencia con los ejemplares aquí estudiados (0,546 pg para Cx) es mayor.

Recientemente, y con el diploide *P. guajava*, Coser et al. (2012) determinaron el contenido de ADN de 28 genotipos de plantas cultivadas en Brasil de *P. guajava* todos  $2n = 22$ , encontrando un valor constante  $2C = 0.95$  pg en todos ellos, por lo que el valor Cx sería de 0,475 pg.

Existen además algunas estimaciones del contenido de ADN para otras especies de Mirtáceas pero dada la confusa nomenclatura utilizada, no es posible realizar comparaciones con nuestro trabajo. En la literatura muchas veces la terminología utilizada para referirse a tamaño del genoma no es la misma, ya que frecuentemente un mismo término es aplicado de manera ambigua o con diferentes significados; esto resulta aún más complejo en el caso de especies poliploides. Ante la necesidad de manejar una nomenclatura

unificada, Greilhuber et al. (2005) discuten este tema y proponen el uso de una terminología consensuada que permita describir el contenido de ADN sin ambigüedades y que es la adoptada en este trabajo.

En Angiospermas, el contenido de ADN nuclear comprende un amplio rango de valores, aunque la mayoría tienen genomas pequeños, con valores comprendidos entre 0,1 y 3,5 pg (Leitch, 1998). El menor valor reportado corresponde a la especie *Cardamine amara* (Brassicaceae) con  $1C = 0.05$  pg (Bennett and Smith, 1991) y el mayor de  $1C = 152,23$  pg se encontró en la monocotiledónea *Paris japonica* (Melanthiaceae) (Pellicer et al., 2010).

El genoma de *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo muy estudiada que posee  $2n = 2x = 10$  cromosomas, tiene un tamaño de  $2C = 0,30$  pg (Arumuganathan, 1991), siendo uno de los de menor tamaño conocidos en plantas superiores. Aunque las Angiospermas presentan una gran variación tanto en el tamaño del genoma como en el número cromosómico, según Soltis (2003) el tamaño del genoma puede variar independientemente del número cromosómico.

En conclusión, los ejemplares de Uruguay de *Psidium cattleianum* tanto la forma de fruto rojo como la de fruto amarillo tienen un contenido de ADN similares, y también similar a lo encontrado en la especie diploide cercana *P. guajava* (Coser et al., 2012), por lo que podemos suponer que el contenido por genomio en este género se mantiene básicamente constante. Comparativamente con otros contenido de ADN que presentan los vegetales superiores, el contenido de un genomio en el del género *Psidium* así como los otros géneros de la familia Myrtaceae son muy pequeños (menor a 1,4 pg). En un contexto filogenético, los genomas pequeños (menores a 3,5 pg) son considerados como una condición ancestral, mientras que los tamaños genómicos grandes (mayores a 14 pg) se consideran una condición derivada (Leitch, 1998; Soltis et al., 2003). A su vez, si se considera que especies poliploides derivan de ancestros diploides (por hibridización por alopoliploidía o autoploidía), se puede considerar la poliploidía como una condición derivada (Costa, 2009). Por lo tanto, las especies aquí estudiadas *P. cattleianum* y *Acca sellowiana*, que poseen genomas muy pequeños

presentarían una condición basal dentro de las Angiospermas, siendo que *P. cattleyanum* ocuparía una posición más derivada. Esto está en concordancia con el análisis filogenético realizado por Lucas (2007) quien determinó que *Acca sellowiana* aparece en posición más basal en relación a los géneros *Campomanesia* y *Psidium* analizados del grupo Pimenta.

#### **4.2.2.4 Poliploidía en *Psidium cattleyanum* Sabine**

En la **Tabla 1** se presenta el resultado de la revisión bibliográfica realizada en relación a registros del número cromosómico de esta especie. Raseira y Raseira (1995) trabajando con materiales colectados en Rio Grande do Sul en cultivos de las zonas del Litoral Atlántico y del Planalto, encontraron plantas de fruto rojo de 66, 77 y 88 cromosomas, y plantas de fruto amarillo de 44 y 66. Dichos autores no pueden aseverar que números aneuploides encontrados (ejemplo 68, 71 y otros) sean efectivamente tales, o conteos espúreos debidos a problemas técnicos que son una constante al realizar preparaciones con esta especie de mirtácea y al alto número de cromosomas pequeños que tienen. Si consideramos que dichos materiales cultivados se corresponden a los que tendría el sur de Brasil en su bosque nativo, y la misma hipótesis para los materiales analizados en este trabajo de tesis, podríamos concluir que siendo Uruguay el extremo Sur de la distribución de esta especie, se habrían dispersado o al menos sobrevivido y multiplicado en nuestro territorio solamente el citotipo rojo de nivel de ploidía  $7x$ , y ninguno de los citotipos para la forma amarilla descritos para Brasil. Sin embargo, si consideramos solamente los materiales que hemos colectado en bosque nativo en nuestras poblaciones naturales de arazá del este del país, sólo se ha determinado por ahora que existe sólo la forma amarilla y con citotipo  $2n = 77$ , siendo llamativo que el mismo no ha sido reportado antes para el sur de Brasil. Deben realizarse más investigaciones en bosques nativos tanto de Brasil como de Uruguay, para sacar conclusiones sobre la distribución y dispersión de cada forma de arazá y sus citotipos. Lamentablemente no tenemos información del origen de materiales herborizados y descritos por Atchison en 1947.

Analizando los registros existentes de otras especies del género *Psidium* se puede apreciar que hay especies que presentan más de un citotipo, siendo uno de ellos el diploide, como *P. guajava* (2x, 3x, 4x), *P. australe* var *australe* (2x, 5x), *P. guineense* (2x, 4x, 5x), *P. friedrichstalianum* (2x, 4x). Sin embargo la mayoría de las especies de este género son exclusivamente poliploides, con números cromosómicos que varían entre  $2n = 33$  y  $2n = 99$ . Entre ellas, las especies *P. acutangulum*, *P. grandifolium*, *P. firmum*, *P. guyanense* y *P. schenkianum* son tetraploides  $2n = 44$ , *P. grandifolium* (4x, 5x), *P. rufum* (5x), *P. myrtoides* (7x, 8x), y hay también una especie no determinada *Psidium* sp. que presenta 99 cromosomas siendo el número mayor reportado hasta ahora para este género (Costa 2009, 2013). Se observa que en todos los casos se mantiene un número cromosómico múltiplo de 11, confirmando el número básico establecido para la familia. Un caso de *P. arboreum*  $2n = 98$ , con posible pérdida de un cromosoma de  $2n = 99$  es reportado por Eder-Silva et al. (2007), y también han sido reportada en plantas de *P. guajava* cultivadas que presentan números cromosómicos aneuploides  $2n = 24, 25, 30$  (Hirano y Nakasone, 1969), pero en general la constancia de números cromosómicos euploides (múltiplos de 11) permite concluir que se trata de una familia cuyas especies presentan un alto grado de conservación en relación a la organización estructural de sus genomas. Comparativamente, la especie estudiada en este trabajo no presentan citotipos diploides, y coinciden con otras del género en los niveles de ploidía 4x al 8x, estando en Uruguay sólo números altos 7x y 8x.

En relación a la biología reproductiva de la especie *Psidium cattleyanum* los trabajos publicados no son concluyentes. Dado el carácter poliploide de muchas de las especies y citotipos en este género, parte del análisis debe centrarse en si el origen en cada caso es por auto o por aloploidía. En materiales nativos de arazá hoy está siendo estudiado por métodos citológicos y de genética molecular (Speroni et al., 2012).

Niveles de ploidía impar son frecuentemente asociados con irregularidades en la reproducción sexual (Costa, 2009), sin embargo, este autor no realiza análisis de los procesos meióticos en las especies estudiadas. Singhal (1985) realizó análisis de microesporocitos en un material  $2n = 77$  de *P. cattleyanum* (= *P. coriaceum*) y observó meiosis muy anormales, junto a un alto porcentaje

de esterilidad de polen (80 %), cuantificó en la meiosis la formación de 17 a 23 bivalentes y de 31 a 43 univalentes, con una frecuencia de 20.6 II + 35.7 I. Según este autor, la alta frecuencia de univalentes y total ausencia de multivalentes indicaría un origen alopoliploide de la especie. Por su parte, Costa (2009) en su análisis de esta especie, y usando la técnica de FISH con sondas ADNr 45S, encuentra como ya se indicó, seis posibles sitios para ese gen en plantas de fruto amarillo 4x, y diez en el caso de plantas de fruto rojo 6x. El mismo autor indica que con la hipótesis de que la especie fuera autopoliploide, en el material 6x eran de esperarse 9 sitios y no diez. Por ello propone un posible origen alopoliploide para la especie *P. cattleyanum* a partir de dos especies diploides con distinto número de sitios de ADNr 45S. Sin embargo, la estructura cariotípica de la especie que fue determinada en nuestro trabajo, estaría en concordancia con un origen autopoliploide. Sería necesario realizar estudios que permitan determinar el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis para poder inferir la naturaleza de estos poliploides.

Desde el punto de vista de la morfología y fenología de las plantas, y dada la gran uniformidad observada en las progenies de *P. cattleyanum* obtenidas de semilla (Raseira y Raseira, 1995; Vignale y Bisio, 2005), así como la gran cantidad de semilla que caracteriza a sus frutos, la hipótesis más probable en relación al modo de reproducción de la especie sería la apomixis. Según Rye (1979), la alta frecuencia de especies poliploides en la familia Myrtaceae y la ocurrencia de niveles de ploidía impar, estaría asociada con reproducción por apomixis. El hecho de que poblaciones alejadas geográficamente presenten grandes diferencias fenotípicas, sumado a que en cada una de ellas los individuos son muy semejantes entres sí (Raseira y Raseira, 1995), reforzaría esta hipótesis. A su vez estos últimos autores plantean que en el caso del citotipo octoploide es de esperar una gran variabilidad en las progenies, a menos que se trate de un autopoliploide, con autopolinización, y que aun así existiría variabilidad en características cuantitativas determinadas por herencia aditiva. Los estudios realizados sobre materiales cultivados en Uruguay, evidenciaron una muy baja o nula viabilidad de polen en todos los materiales analizados (Speroni et al., 2012), lo cual también refuerza la hipótesis de

reproducción por apomixis. Esta hipótesis podrá ser confirmada mediante los actuales estudios embriológicos y de genética molecular en la especie (Speroni et al., 2012).

El alto porcentaje de especies poliploides encontrado en la tribu Myrteae, indica la importancia de la poliploidía en la evolución de este grupo (Atchison, 1947; Rye, 1979; Costa y Forni-Martins, 2006a). En este sentido, la tendencia a la poliploidía observada en varios géneros de Mirtáceas podría estar relacionada con la gran diversidad de especies que caracteriza a esta familia de plantas. La poliploidía está extensamente distribuida en muchas familias vegetales, muy frecuentemente asociada a complejos de especies donde las hibridaciones interespecíficas juegan un rol importante, como es el caso bien estudiado del género *Paspalum* en gramíneas (Vaio et al., 2005). Es ampliamente reconocido el hecho de que la poliploidía juega un importante rol en los procesos de especiación en las Angiospermas (Soltis et al., 2009). Es uno de los mecanismos adaptativos y de dispersión más importante en plantas, ya que les permite una distribución geográfica y ecológica más amplia que sus parentales diploides (Briggs y Walters, 1997). Stebbins (1950) considera que angiospermas con números cromosómicos mayores a 11, se originaron por poliploidía.

Dentro de la tribu Myrteae, *Psidium* junto con *Eugenia* son los dos géneros donde es más frecuente la poliploidía. Teniendo en cuenta además que son los dos géneros más ampliamente distribuidos en los más diversos tipos de hábitats, se reforzaría la teoría de que la poliploidía tiene un papel importante en la diversificación de estos géneros favoreciendo la colonización de nuevos hábitats y ampliando su distribución geográfica en relación a los demás géneros de Myrteae (Costa, 2009). Por todo esto, el estudio citotaxonómico de las especies poliploides resulta particularmente interesante desde el punto de vista científico ya que puede aportar información que contribuya al conocimiento y a la comprensión de los procesos evolutivos de las especies.

## **5. CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES

- ✓ Todos los ejemplares cultivados del guayabo del país, *Acca sellowiana* (Berg.) Burret analizados son diploides, con 22 cromosomas y un cariotipo simétrico de cromosomas metacéntricos, con un sitio CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> localizado en el par cromosómico 3 y que ocupa más de un 20 % del cromosoma metafásico. Debido a que es común observar dichas bandas en interfase asociadas al nucléolo, la hipótesis que surge es que podrían corresponder a regiones de ADNr 45S. El largo del cariotipo haploide de 21,65  $\mu\text{m}$  corresponde a los 0,37 pg de contenido de ADN encontrado en promedio por otros autores para estos materiales.
- ✓ Las plantas de arazá, *P. cattleyanum* Sabine, cultivadas en la EEFFAS, son poliploides. Las de la forma de frutos rojos *P. cattleyanum* var. *cattleyanum* son heptaploides  $2n = 77$ , mientras que las de la forma de frutos amarillos *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* son octoploides  $2n = 88$ . Ambos cariotipos son simétricos con todos los cromosomas metacéntricos. En la forma de frutos rojos se pudieron localizar siete señales CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. La forma de frutos amarillos presenta un sitio CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> en los ocho integrantes del cromosoma 3, siendo una banda de localización pericentromérica y que ocupa aproximadamente un 27 % del largo total del cromosoma. Varios cromosomas presentan además bandas DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> en uno sólo de sus telómeros.
- ✓ Las plantas silvestres de arazá de la forma de frutos amarillos de una población de Rocha en Uruguay son heptaploides  $2n = 77$ , a diferencia de la misma forma cultivada ( $2n = 88$ ) e igual a la forma cultivada de fruto rojo analizada en este trabajo y cultivada en Uruguay.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFÍA

ARUMUGANATHAN K. & EARLE E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9 (3): 208-218.

ATCHISON E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* 34 (3): 159-164.

BACCINO M.E. 2011. Estructura genética de cuatro poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret situadas en el noreste de Uruguay. Tesis de grado (Licenciatura en Ciencias Biológicas), Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. 72 p.

BACCINO E., QUEZADA M., RIVAS M., PUPPO M. & PRITSCH C. 2010. Estructura genética de cuatro poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (guayabo del país). 5º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Salto, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 602. INIA - FAGRO - MGAP. 56 p.

BARROS E SILVA A.E. & GUERRA M. 2009. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic and Histochemistry iFirst*: 1-11.

BENNETT M.D. & SMITH J.B. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 334 (1271): 309-345.

BENEVENGA SARMENTO M., SILVEIRA DA SILVA A.C. & da SILVA C. 2012. Recursos genéticos de frutas nativas da familia Myrtaceae no Sul do Brasil. *Magistra* 24 (4) 250-262.

BERG, O. 1855–1856. Revisio Myrtacearum Americae. *Linnaea* 27: 1-472. In: LUCAS E.J., HARRIS S.A., MAZINE F.F., BELSHAM S.R., LUGHADHA E.M.N., TELFORD A.& CHASE M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56 (4): 1105-1128.

BERG O. 1857–1859. Myrtaceae. In: von Martius, C.F.P. (ed.), *Flora Brasiliensis*, vol. 14 part 1. Frid. Fleischer, Lipsiae. In: LUCAS E.J., HARRIS S.A., MAZINE F.F., BELSHAM S.R., LUGHADHA E.M.N., TELFORD A.& CHASE M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56 (4): 1105-1128.

- BIEGELMEYER R., ANDRADE J.M.M., ABOY A.L., APEL M.A., DRESCH R.R., MARIN R., RASEIRA M.C.B. & HENRIQUES A.T. 2011. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. *Journal of food science*, 76 (7): 991-996.
- BOWDEN W.M. 1945. A list of chromosome numbers in higher plants I. Acanthaceae to Myrtaceae. *American Journal of Botany* 32 (2): 81-92.
- BRIGGS D. & WALTERS S.M. 1997. *Plant variation and evolution*. Cambridge University Press: Cambridge, UK. En: COSTA I.R. & FORNI-MARTINS E.R. 2006b. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- BRUSSA C. & GRELA I. 2007. *Flora arbórea del Uruguay, con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. COFUSA. Uruguay. 544 p
- CABRERA D., VIGNALE B., NEBE J.P., FEIPPE A., ZOPPOLO R. & CASTILLO A. 2008. INIA y los frutos nativos de nuestra tierra. *Revista INIA - No 14*.
- CHASE M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56 (4): 1105-1128.
- COSER S. M., FERREIRA M. F.D.S., FERREIRA A., MITRE L.K., CARVALHO C.R. & CLARINDO W.R. 2012. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. *Scientia Horticulturae* 148: 223-229
- COSTA I. R. 2004. *Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil*. Tese de Mestre em Biologia Vegetal (Instituto de Biologia), Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.
- COSTA I.R. & FORNI-MARTINS E.R. 2006a. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz et Pavon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.) *Caryologia* 59: 7-13.
- COSTA I.R. & FORNI-MARTINS E.R. 2006b. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.

- COSTA I.R. & FORNI-MARTINS E.R. 2007a. Chromosome studies in Gomidesia, Marlierea, Myrceugenia and Myrcia (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). Kew Bull 62: 113-118.
- COSTA I.R. & FORNI-MARTINS E.R. 2007b. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 155: 571-580.
- COSTA I.R., DORNELAS M.C. & FORNI-MARTINS E.R. 2008. Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae. Plant Systematic and Evolution 276: 209–217.
- COSTA I.R. 2009. Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e generos relacionados. Tesis de Doutor en Biología Vegetal. Universidad Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 235 p.
- DUCROQUET J.P.H.J, HICKEL E.R. & NODARI R.O. 2000. Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal: Ediciones Funep. (Série Frutas Nativas 5), 66 p.
- DOLEZEL J., BARTOS J., VOGLMAYR H. & GREILHUBER J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry 51: 127 – 128.
- FEIPPE A.G., PERALTA F., IBAÑEZ F., CALISTRO P., VIGNALE B., CABRERA D. & ZOPPOLO R. 2010. Evaluación del potencial nutracéutico en selecciones de frutos nativos del Uruguay. 5º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Salto, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 602. INIA - FAGRO - MGAP. 56 p.
- FRANZON R.C., DE OLIVEIRA CAMPOS L.Z., PROENÇA C.E.B. & SOUSA-SILVA J.C. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Documentos 266, Embrapa Cerrados, Planaltina DF. 48 p.
- GOVAERTS R., SOBRAL M., ASHTON P., BARRIE F. & HOLST B.K., LANDRUM L., MATSUMOTO K., MAZINE F.F., LUGHADHA E.N., PROENÇA C.E.B., SILVA L.H.S., WILSON P. & LUCAS E. 2008 World Checklist of selected plant families- Myrtaceae. (<http://apps.kew.org/wcsp/> - consultado el día 26/02/2014).
- GREILHUBER J., DOLEZEL J., LYSÁK M.A.&BENNET M.D. 2005.The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. Annals of botany 95 : 255-260.

- GRELA I. 2004. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de Maestría (Ciencias Biológicas), PEDECIBA, Universidad de la República. 103 p.
- GUERRA M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology*, 23(4), 1029-1041.
- HIRANO R.T. & NAKASONE H.Y. 1969. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 94 (2): 83-86.
- JOLOCHIN, G.S. 2008. Revisión de Myrtaceae adans. de la flora uruguaya. Tesis de grado (Ingeniero Agrónomo), Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.
- LEGRAND D. 1968. Las Mirtáceas del Uruguay, III. *Boletín Facultad Agronomía*, No 101. 80 p.
- LEITCH I.J., CHASE M.W. & BENNETT M.D. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* 82 (1) 85-94.
- LUCAS E.J., HARRIS S.A., MAZINE F.F., BELSHAM S.R., LUGHADHA E.M.N., TELFORD A. & CHASE M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56 (4): 1105-1128.
- MARA ACOSTA V. 2012. Aportes al conocimiento de la biología floral y reproductiva y caracterización del guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). Tesis de grado (título de Ingeniero Agrónomo), Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay.
- MARTINEZ N., VIGNALE B., MONTES F. & DELLACASSA E. 2010. Caracterización de frutos nativos del Uruguay según su valor nutricional. 5º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Salto, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 602. INIA - FAGRO – MGAP, 56 p.
- MATSUMOTO S.T., MARIN-MORALES M.A., RUAS C.F. & RUAS P.M. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Caryologia* 53 (3 - 4): 205-212.

McVAUGH, R. 1968. The genera of American Myrtaceae- an interim report. *Taxon* 17: 354–418.

MORA F., PALMA-ROJAS C.& JARA-SEGUEL P. 2005. Comparación del cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). *Agricultura técnica* 65 (1): 20-25.

PELLICER J., FAY M.F. & LEITCH I.J. 2010. The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society* 164 (1): 10-15.

PREEDA N., YANAGI T., SONE K., TAKETA S.& OKUDA N. 2007. Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries. *Scientia Horticulturae* 114:133-137.

PRITSCH C., VIGNALE B., RIVAS M., PUPPO M., GÁNDARA J., QUEZADA M., CAMUSSI G., ROSS S. & KRAUSE M. 2007. Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como recurso genético. 11º Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura y 3º Congreso Panamericano Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas. Montevideo, Uruguay. Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura.

PRITSCH C., MAZZELLA C., VAIO M., QUEZADA M., DA CRUZ I., LOMBARDO P., CABRERA D. & VIGNALE B. 2010. Hacia la caracterización de la estructura del genoma de la especie frutal nativa *Acca sellowiana* (Berg.) Burret: abordajes genéticos, citológicos y moleculares. 5º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Salto, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 602. INIA - FAGRO - MGAP. 56 p.

PRITSCH C., MAZZELLA C., QUEZADA M., DA CRUZ I., VÁZQUEZ S., GAIERO P., VAIO M., SILVA P., BACCINO E., LOMBARDO P., HINRICHSEN P., GARCÍA A.A.F., CABRERA D. & VIGNALE B. 2012. Avances en estudios genómicos en Guayabo del país (*Acca sellowiana*). 6º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Canelones, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 679. INIA - FAGRO - MGAP. 56 p.

PUPPO, M. 2008. Prospección y caracterización de poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (Guayabo del país). Tesis de grado (Ingeniero Agrónomo), Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

QUEZADA M., PASTINA M.M., RAVEST G., SILVA P., VIGNALE B., CABRERA D.& PRITSCH C. 2014. A first genetic map of *Acca sellowiana* based on ISSR, AFLP and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 169: 138-146.

- QUEZADA M. 2008. Estudio de la diversidad genética de una colección de *Acca sellowiana* (Berg) Burret con alto potencial agronómico mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Tesis de grado (Licenciatura en Ciencias Biológicas), Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. 111p.
- RASEIRA M.D.C.B. & RASEIRA A. 1996. Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum*. EMBRAPA-CPACT. 95 p.
- RIVAS M., VIGNALE B., CAMUSSI G., PUPPO M. & PRITSCH C. 2007. Los recursos genéticos de *Acca sellowiana* (Berg) Burret en Uruguay. Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur 2 (1): 103-112.
- RYE B.L. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. Australian Journal of Botany 27: 547-573.
- SALVARREY, M.J. 2008. Evaluación de diferentes técnicas de propagación vegetativa en “Guayabo del país” (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.). Tesis de grado (Ingeniero Agrónomo), Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. 111p.
- SANCHOTENE M.C.C. 1989. Frutíferas nativas úteis a fauna na arborização urbana. 2da ed. Porto Alegre, Sagra. 304 p. In: FRANZON R.C., DE OLIVEIRA CAMPOS L.Z., PROENÇA C.E.B. & SOUSA-SILVA J.C. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Documentos 266, Embrapa Cerrados, Planaltina DF. 48 p.
- SINGHAL V.K., GILL B.S. & Bir S.S. 1985. Cytology of woody species. Proceedings: Plant Sciences 94 (4-6): 607-618.
- SOBRAL M. 2003. A familia Myrtaceae no Rio Grande do Sul. Sao Leopoldo, Unisinos, Brazil. 215 p.
- SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., BENNETT M.D. & LEITCH I. 2003. Evolution of genome size in the Angiosperms. American Journal of Botany 90 (11): 1596–1603.
- SOLTIS D.E., ALBERT V.A., LEEBENS-MACK J., BELL C.H., ZHENG C., SANKOFF D., dePAMPHILIS C.W., WALL P.K. & SOLTIS P.S. 2009. Polyploidy and Angiosperm diversification. American Journal of Botany 96 (1): 336–348.
- SPERANZA P., VAIO M. & MAZZELLA C. 2003. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. Genetics and Molecular Biology 26: 499-503.

- SPERONI G., MAZZELLA C., VIGNALE B., PRITSCH C., CABRERA D., BONIFACINO M., QUEZADA M., SILVA M.P., JOLOCHÍN G., TARDÁGUILA A., GAIERO P., MILLÁN C. & TRUJILLO, C. 2012. Estudios biológicos y taxonómicos de la especie frutal nativa *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). 6º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Canelones, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 679. INIA - FAGRO - MGAP. 56 p.
- STEBBINS G.L. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York. USA.
- VAIO M., SPERANZA, P., VALLS J.,F., GUERRA M.& MAZZELLA C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of Paspalum (Poaceae, Paniceae). *Annals of botany*96 (2): 191-200.
- VIDAL C.& DOS SANTOS K.L. 2011. Feijoa (*Acca sellowiana*). Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal 33 (1) 1 1-334.
- VIGNALE B. & BISIO L. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. Agrociencia (Uruguay) 9 (1-2): 35-39.
- VIGNALE B., CAMUSSI G., CABRERA D., NEBEL J.P., CUNDA N. & PRITSCH C. 2006. Avances en la selección del guayabo del país *Acca sellowiana* (Berg) Burret en Uruguay. III Simposio Nacional do Morango e II Encontro de Pequenas Frutas Nativas do MERCOSUR. Pelotas, Brasil. EMBRAPA Clima Temperado, 115 p.
- VIGNALE B., CABRERA L., NEBEL J.P., LOMBARDO P., RODRÍGUEZ P., ZOPPOLO R. & PEREIRA C. 2012. Selección de frutas nativas. Avances. 6º Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos. Canelones, Uruguay. Serie Actividades de Difusión 679. INIA - FAGRO – MGAP, 56 p.
- VIJAYAKUMAR N. & SUBRAMANIAN D. 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513–520.
- WILSON P.G., O'BRIEN M.M., GADEK P.A. & QUINN C.J. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*88 (11): 2013-2025.
- WILSON P.G., O'BRIEN M.M., HESLEWOOD M.M. & QUINN C.J. 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematic and Evolution*251: 3-19.

## **7. ANEXOS**

---

## ANEXOS

### ANEXO I. Relevamiento de datos de material de *Psidium cattleianum* Sabine, ingresados al Herbario “B. Rosengurtt” de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Se realizó el relevamiento de todos los materiales de *Psidium cattleianum* Sabine depositados en el Herbario B. Rosengurtt, colectados por diversos investigadores desde 1904 hasta 1999. Se trata de ejemplares colectados en la región este del territorio nacional, en bosques nativos de los Departamentos de Cerro Largo y Rocha. El resto del material depositado en el Herbario es de Jardines, Parques y Viveros. Según Brussa y Grela (2007) *Psidium coriaceum* O. Berg, *Psidium littorale* Raddi y *Psidium variable* O. Berg son sinonimias.

**Tabla I.** Materiales de *Psidium cattleianum* Sabine depositados en el Herbario B. Rosengurtt. En cada muestra de herbario: nombre de la especie, código de ingreso al Herbario, color del fruto, fecha de la colecta, lugar del ejemplar, nombre del colector; observaciones.

Nombre de especie	Código N°	Color del fruto	Fecha	Lugar	Colector	Obs.
<i>Psidium cattleianum</i>	B-3847		Enero 1942	Vivero Municipal Cerro, Mvideo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	B-3575		24/12/1941	FAGRO Montevideo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	182		Abril 1934	Jardín Botánico Montevideo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	B-3974		12/04/1942	Vivero de Toledo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	7558		Abril 1914	Miguelete, Montevideo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	6125	rojo	16/12/1904	No informa	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	7557		Abril 1914	Miguelete, Montevideo	Legrand	
<i>Psidium cattleianum</i>	No	amarillo	15/04/1944	Parque Lussich, Maldonado		
<i>Psidium cattleianum</i>	18329		10/05/1986	Rocha Pque. San Miguel	Marchesi	silvestre
<i>Psidium cattleianum</i>	8273		28/12/1961	Cerro Largo Cuch.Mangrullo	Rosengurtt	silvestre
<i>Psidium cattleianum</i>	MVFA 29234		16/05/1999	Cerro Largo Camino Sierra de los Ríos	Brussa C, Grela I.	silvestre
<i>Psidium cattleianum</i>	MVFA 29350		12/11/1999	Cerro Largo Camino Sierra de los Ríos	Brussa C, Grela I.	silvestre
<i>Psidium cattleianum</i>	6127	amarillo	24/03/1966	Rocha que. San Miguel	Marchesi	silvestre

## ANEXO II. Tamaños cromosómicos en especies de la familia Myrtaceae.

**Tabla I.** Recopilación de datos referentes a tamaños cromosómicos en especies de la familia Myrtaceae. Los valores que aparecen sombreados fueron calculados a partir de los datos disponibles en cada trabajo.

Espece	2n	Largo cromosomas $\mu\text{m}$	Largo genomio (x=11)	Largo Total (2n)	Referencia
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	22	1.0-2.0	13.2	26.4	Vijayakumar & Subramanian, 1985
<i>Psidium guajava</i>	22	1.0-1.8	14.8	29.6	"
<i>Psidium guajava</i>	22	1.0-2.0	16.4	32.8	"
<i>Psidium guajava</i>	22	0.8-1.2	10.6	21.2	"
<i>Syzygium calophyllifolium</i>	22	0.9-1.6	12.7	25.4	"
<i>Syzygium jambolanum</i>	22	1.0-2.0	14.8	29.6	"
<i>Eugenia caryophyllata</i>	22	1.0-2.1	14.7	29.4	"
<i>Eucalyptus globulus</i>	22	1.0-2.2	14.6	29.2	"
<i>Eucalyptus citridora</i>	44	1.2-2.5	17.5	35.00	"
<i>Callistemon lanceolatus</i>	22	1.0-1.9	14.3	28.60	"
<i>Eucalyptus deanei</i>	22	0.6-1.3	10.4	20.8	Matsumoto et al., 2000
<i>Eucalyptus dunni</i>	22	0.7-1.4	11.4	22.8	"
<i>Eucalyptus grandis</i>	22	0.8-1.4	11.4	22.8	"
<i>Eucalyptus maculata</i>	22	0.7-1.2	11.2	22.4	"
<i>Eucalyptus propinqua</i>	22	0.8-1.3	11.8	23.6	"
<i>Eucalyptus saligna</i>	22	0.7-1.4	11.5	23.0	"
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	22	0.8-1.3	11.9	23.8	"
<i>Eugenia bracteata</i>	22	0.57-1.02	17.03	34.06	Costa y Forni-Martins, 2007
<i>Eugenia hyemalis</i>	44	0.43-1.36	17.07	68.28	"
<i>Eugenia punicifolia</i>	22	0.49-1.13	14.75	29.5	"

<b>Especie</b>	<b>2n</b>	<b>Largo cromosomas <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Largo genomio (x=11)</b>	<b>Largo Total (2n)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Eugenia uniflora</i>	22	0.4-1.28	15.2	30.4	"
<i>Myrciaria delicatula</i>	22	0.48-1.18	16.4	32.8	"
<i>Myrciaria tenella</i>	22	0.63-1.34	21.9	43.8	"
<i>Plinia cauliflora</i>	22	0.44-0.82	12.84	25.68	"
<i>Gomidesia sp.</i>	22	0.52-1.35	18.02	36.04	"
<i>Marlierea tomentosa</i>	22	0.46-0.77	13.5	27.0	"
<i>Marlierea warmingliana</i>	22	0.76-1.09	18.7	37.4	"
<i>Myrcia lingua</i>	22	0.5-1.23	19.6	39.2	"
<i>Myrcia sp.</i>	44	0.5-1.0	16.29	65.14	"
<i>Campomanesia pubescens</i>	22	0.56-1.61	22.25	44.5	"
<i>Psidium cattleianum</i> f. <i>lucidum</i>	44	0.45-1.09	15.9	63.8	"
<i>Psidium cinereum</i>	44	0.38-0.91	14.12	56.5	"
<i>Acca sellowiana</i>	22	1.36-2.72	21.65	43.3	Este trabajo
<i>Psidium cattleianum</i> f. <i>lucidum</i>	88	1.04-2.13	20.91	167.28	Este trabajo
<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>cattleianum</i>	77	1.41-2.7	21.9	153.3	Este trabajo

**TABLA II.** Histograma mostrando el largo cromosómico ( $\mu\text{m}$ ) estimado por genomio (x) en especies de Myrtaceae. En el recuadro se indican las especies analizadas en este trabajo.

