

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN HÍBRIDOS TRIPLOIDES Y TETRAPLOIDES DE *TURNERA KRAPOVICKASII*, *T. SCABRA* Y *T. SUBULATA* (PASSIFLORACEAE, TURNEROIDEAE)

AVELIANO FERNÁNDEZ¹, SILVIA A. FERNÁNDEZ^{1*}, IVANA E. KOVALSKY^{1,2} y
VIVIANA G. SOLÍS NEFFA^{1,2}

Summary: Cytogenetic studies in triploid and tetraploid hybrids of *Turnera krapovickasii*, *T. scabra* and *T. subulata* (Passifloraceae, Turneroideae). In order to investigate the genomic relationships among species of series *Turnera* ($x=5$), a controlled crossing program was performed and yielded numerous hybrids. Among the yellow flowered species of series *Turnera*, *T. krapovickasii*, *T. scabra* and *T. subulata* have diploid and autotetraploid cytotypes. So far, the degree of reproductive isolation between diploids and autotetraploids, and the degree of genomic affinity at tetraploid level are unknown. In this study, we present the results of the cytogenetic analysis of triploid ($2n=3x=15$) intraspecific hybrids of *T. krapovickasii* and *T. scabra* and tetraploid ($2n=4x=20$) ($2n=4x=20$) *T. krapovickasii* \times *T. scabra* and *T. subulata* \times *T. scabra* hybrids. In the triploid hybrids we found cells with 1 to 5 trivalents and the pollen viability was 11.4% - 15.2%. In the tetraploid hybrids we found cells with 1 to 5 quadrivalents and the pollen viability was 76% - 87.97%. The results of this work revealed that the reproductive isolation between diploids and tetraploids is incomplete, and that the triploid hybrids are not completely sterile. Likewise, the cytogenetic analysis of the interspecific hybrids evidenced that the genomes of *T. krapovickasii*, *T. scabra* and *T. subulata* display more affinity at tetraploid level than at diploid level.

Key words: *Turnera*, meiosis, genomic relationships, triploid, tetraploid.

Resumen: A fin de investigar las relaciones genómicas entre especies de la serie *Turnera* ($x=5$), se lleva a cabo un programa de cruzamientos controlados y se obtuvieron numerosos híbridos. Entre las especies con flores amarillas de la serie *Turnera*, *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata* poseen citotipos diploide y autotetraploide. Hasta el momento se desconocen el grado de aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides y el grado de afinidad genómica de estas especies a nivel tetraploide. En este trabajo se presentan los resultados del análisis citogenético de los híbridos intraespecíficos triploides ($2n=3x=15$) de *T. krapovickasii* y *T. scabra* y los híbridos tetraploides ($2n=4x=20$) *T. krapovickasii* \times *T. scabra* y *T. subulata* \times *T. scabra*. En los híbridos triploides se hallaron 1-5 trivalentes y la viabilidad del polen fue 11,3% - 15,2%. En los híbridos tetraploides se encontraron células con hasta 5 cuadrivalentes y la viabilidad del polen fue 76% - 87,97%. Los resultados obtenidos demostraron que el aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides es incompleto y que los híbridos triploides no son completamente estériles. Asimismo, se evidenció que los genomas de *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata* serían más afines a nivel tetraploide que a nivel diploide.

Palabras Clave: *Turnera*, meiosis, relaciones genómicas, triploides, tetraploides.

¹ Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Casilla de Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina.

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), Avenida Libertad 5470, 3400 Corrientes, Argentina.

* Email: silvia.fernandez@comunidad.unne.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La subfamilia Turneroideae comprende 226 especies distribuidas en 12 géneros. De estos géneros, *Turnera* L. es el más numeroso y cuenta con 141 especies ampliamente distribuidas en las áreas tropicales y subtropicales del continente americano, y dos especies africanas (Arbo *et al.*, 2015). En América, las especies de *Turnera* se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el centro de Argentina y, algunas especies se han extendido como plantas ruderales a Asia y Oceanía (Arbo, 1995, 2005). Las especies de *Turnera* se agrupan en once series que se diferencian por la estructura floral, el desarrollo y grado de adnación del pedúnculo floral, el epicarpio, y rasgos seminales como la forma, ornamentación, pubescencia y desarrollo de la cálaza (Arbo, 2008). La heterostilia es también un fenómeno bastante frecuente, las especies pueden ser heterostilas u homostilas, y las heterostilas son generalmente autoincompatibles (Barrett, 1978; Arbo, 1987).

Los estudios cromosómicos mostraron que la poliploidía desempeñó un papel muy importante en la evolución de las especies de *Turnera* (Fernández, 1987). Se cuenta con información cariológica para 6 de las 11 series (Barrett, 1978; Fernández, 1987; Raman & Kesavan, 1964; Hamel, 1965; Barrett & Shore, 1980; Arbo & Fernández, 1983; Solís Neffa & Fernández, 1993; Solís Neffa, 1996; Solís Neffa & Fernández, 2002). El número básico $x=7$ es el más frecuente y fue hallado en las series *Salicifoliae*, *Stenodictyae*, *Microphyllae* y *Leiocarpae*. El número $x=13$ fue hallado en la serie *Papilliferae* y $x=5$ en la serie *Turnera*. Se detectaron niveles de ploidía desde $2x$ hasta $10x$ (Barrett, 1978; Fernández, 1987; Raman & Kesavan, 1964; Arbo & Fernández, 1983; Shore & Barrett, 1985; Solís Neffa & Fernández, 2001; Elías *et al.*, 2011; Kovalsky & Solís Neffa, 2012). Los estudios meióticos en poliploides indican que hay alo- y autopoliploides (Fernández, 1987; Shore, 1991; Solís Neffa & Fernández, 2001).

Actualmente, las investigaciones que se desarrollan en el género *Turnera* tienen como uno de sus objetivos interpretar los mecanismos involucrados en el origen y establecimiento de los poliploides (Fernández & Arbo, 1990, 2000 a y b; Fernández & Solís Neffa, 2004; Panzeri *et al.*, 2008; Fernández, *et al.*, 2010; Kovalsky & Solís

Neffa, 2012, 2015; Kovalsky *et al.*, 2014; Kovalsky & Solís Neffa, 2015). La serie *Turnera* cuenta con 22 especies que presentan la estructura floral más compleja en la familia y están divididas en dos subseries por sus caracteres seminales (Arbo, 1986) y citogenéticos (Arbo, 2005). La subserie *Umbilicatae* comprende algunas especies tropicales, mientras que la subserie *Turnera* constituye el complejo *T. ulmifolia*. Este último es un complejo polimórfico originariamente constituido por más de 10 variedades (Urban, 1883) que poseen flores amarillas y blanco - azuladas, muchas de las cuales son reconocidas actualmente como especies independientes (Backer, 1951; Arbo, 1985). Desde 1982, se lleva a cabo un programa de cruzamientos controlados entre las especies de la serie *Turnera* (principalmente de la subserie *Turnera*) y se han obtenido numerosos híbridos. Como resultado de los estudios citogenéticos de dichos híbridos, se han analizado las relaciones genómicas entre algunas especies (Fernández, 1997; Fernández & Arbo, 1989, 1990, 1993a, 1993b, 1996, 2000a, 2000b; Fernández & Solís Neffa, 2004; Fernández *et al.*, 2010; López *et al.* 2010 a, 2010b).

Entre las especies con flores amarillas de la serie *Turnera*, *T. krapovickasii* Arbo, *T. scabra* Millsp. y *T. subulata* Sm. poseen citotipo diploide $2n=2x=10$ y autotetraploide $2n=4x=20$ (Fernández, 1987; Arbo, 2005; Shore *et al.*, 2006). Los citotipos de estas especies están segregados espacialmente, aunque se han detectado algunas poblaciones mixtas (Shore & Barrett, 1986; Barrett & Shore, 1987; Lazaroff *et al.*, 2016). En dichas poblaciones, el grado de aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides podría tener un importante papel en la coexistencia entre los citotipos (Harlan & deWet, 1975; de Wet, 1980; Felber & Bever, 1997; Ramsey & Schemske, 1998; Burton & Husband, 2000). Por otra parte, las tres especies difieren en su distribución geográfica, aunque el área entre *T. subulata* y *T. scabra* se superpone parcialmente, habiéndose detectado poblaciones con algunos híbridos (Arbo & Fernández, 1987; Fernández & Arbo, 1989; Arbo, 2005). A partir del análisis citogenético de los híbridos diploides, se demostró que las barreras reproductivas entre las tres especies mencionadas es incompleto y se sugirió que sus genomas serían muy afines (Fernández & Arbo, 1989, 1993). Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con información sobre el grado

de aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides ni tampoco acerca del grado de afinidad genómica de estas especies a nivel tetraploide.

En este marco, en este trabajo se presentan los resultados del análisis citogenético de los híbridos triploides de *T. krapovickasii*, *T. scabra* y de los híbridos tetraploides entre estas especies y entre *T. subulata* y *T. scabra*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un programa de cruzamientos bajo condiciones controladas de invernáculo. Las accesiones utilizadas como progenitores en el presente estudio se citan en la Tabla 1, junto a los códigos empleados, los números cromosómicos, coleccionistas, fechas y localidades de colección. Los números cromosómicos de las plantas empleadas como progenitores fueron obtenidos previamente (Fernández, 1987). Los ejemplares testigo están depositados en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES), Corrientes, Argentina.

Aunque las especies empleadas en los cruzamientos son autoincompatibles, las flores de las plantas utilizadas como progenitores femeninos fueron castradas previamente a la polinización con

el polen de la planta seleccionada como progenitor masculino. Las flores polinizadas se marcaron con una etiqueta indicando el número de cruzamiento y los frutos en desarrollo se encerraron en una bolsa de tul de malla fina para asegurar la cosecha de las semillas. Las semillas obtenidas se sembraron en macetas individuales y los individuos resultantes fueron transplantados luego de haberse desarrollado el primer par de hojas.

La cruzabilidad entre los citotipos y especies se estimó a partir de los siguientes parámetros: el número de frutos y semillas obtenidos en relación al número de flores polinizadas, el promedio de semillas viables por fruto y la viabilidad del polen de los híbridos obtenidos.

El nivel de ploidía de la progenie F_1 se determinó en meiosis. Para el estudio de la meiosis en algunos casos se utilizaron anteras frescas y en otros los botones florales fueron fijados en 5 partes de etanol absoluto y una parte de ácido láctico (Fernández, 1973). Después de 24 horas fueron transferidos a etanol 70° en refrigeración a 4°C. La coloración se efectuó con orceína acética al 2%. Los preparados permanentes se hicieron con el método de Bowen (1956). Las configuraciones meióticas fueron analizadas en diacinesis – metafase I.

La viabilidad del polen de los híbridos fue estimada mediante la técnica de coloración

Tabla 1. Material estudiado de *Turnera*.

Especie	Código	2n	Coleccionista y procedencia	Fecha de colección
<i>T. krapovickasii</i> Arbo	K1	10	Ahumada 4549, Argentina, Jujuy, Capital.	12/21/1982
	K2	10	Krapovickas 38858, Bolivia, Tarija, O'Connor.	4/29/1983
	K3	10	Krapovickas 39177, Bolivia, Tarija, Gran Chaco.	5/5/1983
	K4	10	Krapovickas 39099, Bolivia, Tarija, O'Connor.	5/2/1983
	K4as	10	Arbo 2706, androestéril de K4 cultivada en Corrientes.	-
	K5	20	Schinini 19514, Argentina, Salta, Anta.	12/8/1979
<i>T. scabra</i> Millsp.	K6	20	Beck 9433, Paraguay, Nueva Asunción, Gral. Garay.	10/5/1983
	I2	10	Araquistain 1354, Nicaragua, Managua, Península de Chiltepe.	2/18/1980
	I4	10	Montiel s/n, Nicaragua, Managua.	03/1986
	I1	20	Jiménez 8769, Rep. Dominicana, La Vega, Loma del Puerto.	3/16/1980
<i>T. subulata</i> Smith	I6	20	Vodicka 879, Haití, Carrefour.	8/26/1985
	E4	20	Arbo 2408, Brasil, Piauí, Teresina.	1/28/1981

con carmín-glicerina (1:1). Las anteras fueron colectadas durante las primeras horas de la mañana y los granos de polen fueron extraídos en una gota de colorante carmín-glicerina. Los granos de polen teñidos totalmente se consideraron como viables y los traslúcidos o con poca coloración como inviables. Se contaron al menos 300 granos por planta.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 1 y en las Tablas 2, 3 y 4.

De los 112 cruzamientos realizados, el 39 % fue exitoso (Tabla 2). En general, los cruzamientos $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ realizados en *T. krapovickasii* y en *T. scabra*, fueron exitosos, excepto el cruzamiento I2 ($2x$) \times I1 ($4x$) en el cual ninguna de las flores polinizadas produjo frutos (Tabla 2).

En cuanto a las distintas variables estimadas para cada tipo de cruzamiento, en *T. krapovickasii*, el mayor porcentaje de frutos se obtuvo del cruzamiento K1 ($2x$) \times K5 ($4x$) y el menor porcentaje del cruzamiento K4as ($2x$) \times K5 ($4x$); mientras que el mayor promedio de semillas por fruto se obtuvo de los cruzamientos $2x \times 4x$. En *T. scabra*, sólo resultaron exitosos los cruzamientos $4x \times 2x$. Por otra parte, en los cruzamientos interespecíficos entre los tetraploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra*, todas las variables analizadas fueron mayores cuando *T. krapovickasii* fue empleada como progenitor femenino. En el caso del cruzamiento entre *T. subulata* y *T. scabra*, si bien solo dos cruzamientos fueron exitosos, ambos resultaron en un alto número de semillas.

En relación al comportamiento meiótico, en la Tabla 3 se muestran el promedio de las asociaciones cromosómicas y la fertilidad de polen de los híbridos intercitotipos e interespecíficos obtenidos. Los triploides de ambas especies analizadas presentaron diferentes configuraciones en diacinesis y MI, en las que se encontraron 1-5 III. En *T. krapovickasii* la configuración más frecuente fue 3 I + 3 II + 2 III (41,66 %, Fig. 1.A, Tabla 4). En este híbrido se encontró una célula con 1 II + 1 III + 1 X (Fig. 1.B), la cual no fue incluida en la Tabla 3. En el triploide de *T. scabra* se encontraron seis configuraciones diferentes, siendo las más frecuentes 1 I + 1 II + 4 III (39,33 %, Fig. 1.C) y 5 III (25,84 %, Fig. 1.D). En

los híbridos triploides de ambas especies siempre se encontró al menos un trivalente por célula y también se observaron cromosomas rezagados y puentes en anafase I y en anafase II. La fertilidad de polen de los triploides varió entre 11,30 % y 15,20 % (Tabla 3).

En los híbridos tetraploides *T. krapovickasii* \times *T. scabra* y *T. subulata* \times *T. scabra*, la configuración más frecuente fue de 2 II + 4 IV, con un 33 % en el primer híbrido y 44,45 % en el segundo (Tabla 4). Se encontraron células con univalentes, bivalentes y cuadrivalentes en el primer híbrido, mientras que en el segundo además de estas asociaciones también se observaron trivalentes. En todas las células analizadas de *T. krapovickasii* \times *T. scabra* se encontraron cuadrivalentes, hallándose un máximo de 5 IV (Fig. 1. F) en el 14 % de las células analizadas. La viabilidad del polen fue alta con un 87,97% (Tabla 3) en *T. krapovickasii* \times *T. scabra* mientras que en *T. subulata* \times *T. scabra* fue de 76 %. En anafase I se encontró 6,5 % de cromosomas rezagados y 8 % de puentes en *T. krapovickasii* \times *T. scabra*, en tanto que en *T. subulata* \times *T. scabra* se encontraron valores similares con 7 % de cromosomas rezagados y 10,7 % de puentes. En el primer híbrido se observaron solamente puentes, mientras que en el segundo se encontraron puentes y fragmentos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el aislamiento reproductivo entre los citotipos diploides y tetraploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra* no es absoluto y que los triploides resultantes de los cruzamientos experimentales no son completamente estériles. Asimismo, el análisis citogenético de los híbridos interespecíficos tetraploides evidenció que los genomas de *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata* serían muy afines entre sí.

Híbridos triploides. En algunos complejos poliploides, los tetraploides con frecuencia están aislados reproductivamente de sus progenitores diploides por fuertes barreras postcigóticas, las que involucran mecanismos que conducen a la inviabilidad de los híbridos (bloqueo triploide) y a la esterilidad (Ramsey & Schemske, 1998; Futuyama, 1998; Petit *et al.*, 1999; Schuter, 2001). Los

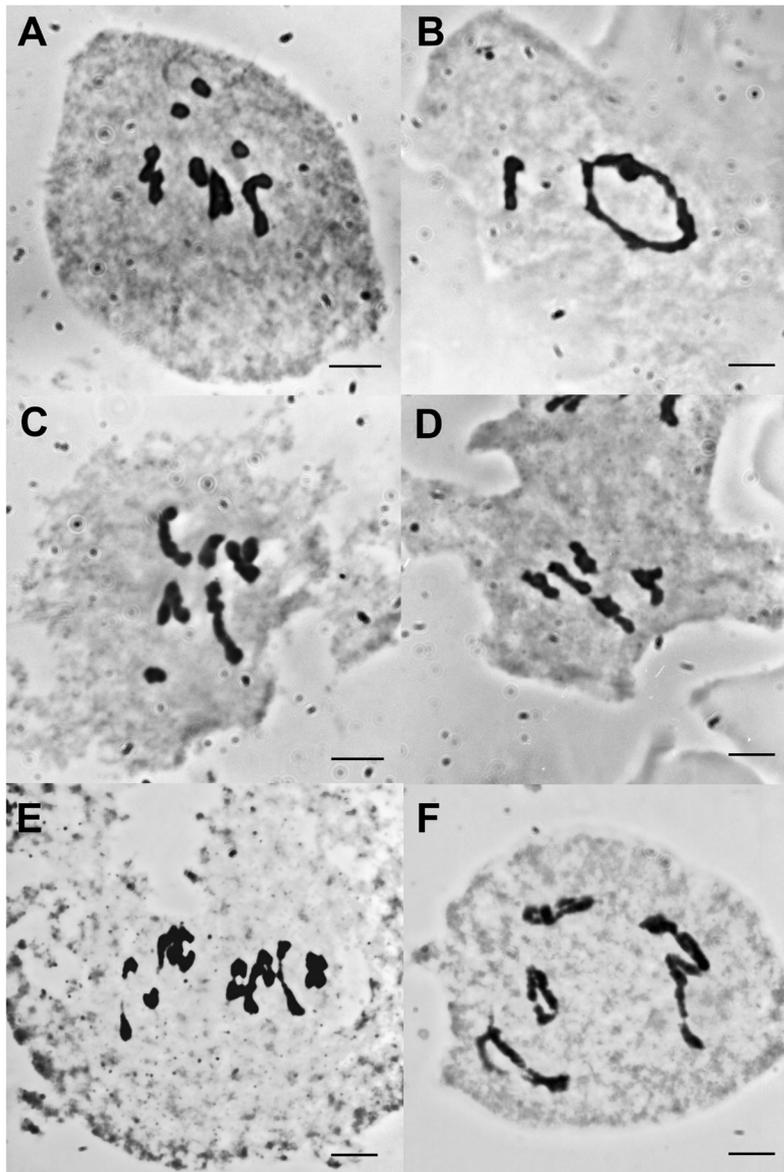


Fig. 1. A-B: *T. krapovickasii*, $2n = 3x = 15$. A: $3I + 3II + 2III$. B: $1II + 1III + 1X$. C-D: *T. scabra*, $2n = 3x = 15$. C: $1I + 1II + 4III$. D: $5III$. E-F: *T. krapovickasii* \times *T. scabra*, $2n = 4x = 20$. E: $4II + 3IV$. F: $5IV$. Escala: $5 \mu m$.

embriones triploides abortan en etapas tempranas del desarrollo como resultado del desbalance de la relación del nivel de ploidía del embrión y del endosperma o de la proporción materno: paterna (bloqueo triploide) (Ramsey & Schemske, 1998; Köhler *et al.*, 2010). El bloqueo triploide varía según las especies (Marks, 1966), pudiendo ser fuerte como en *Solanum* (Werner & Pelouquin,

1991a), *Trifolium pratense* L. (Taylor & Wieseman, 1988) o en *Lotus tenuis* Wald. *et* Kit. (Negri & Veronessi, 1989). En estas especies, los triploides son raros o pueden estar ausentes (Lumaret *et al.* 1987; van Dijk *et al.*, 1992). Sin embargo, la presencia de triploides en las zonas de contacto entre diploides y tetraploides así como en la progenie de cruzamientos experimentales en otras

Tabla 2. Resultados de los cruzamientos experimentales.

Cruzamiento	Número de flores polinizadas	Número de frutos producidos	Número promedio de semillas por fruto	Nivel de ploidía de la progenie
K1 (2x) × K5 (4x)	21	13 (61,90%)	6.8 (1 - 17)	3x
K4as (2x) × K6 (4x)	11	3 (27,27%)	2.67 (1 - 6)	3x
K5 (4x) × K1 (2x)	12	5 (41,67%)	1.4 (1 - 3)	3x
I2 (2x) × I1(4x)	20	0 (0,00%)	-	-
I1(4x) × I2 (2x)	26	12 (46,15%)	3.11 (1 - 10)	3x
K5 (4x) × I1(4x)	3	3(100%)	17 (1 - 41)	4x
I1(4x) × K5 (4x)	7	6 (85,71%)	13.5 (1 - 22)	4x
E4(4x) × I1 (4x)	12	2 (16,67%)	34 (34)	4x

especies (Zohary & Nur, 1959; Felber & Bever, 1997), evidencian que el bloqueo triploide nunca es absoluto y que puede ser sobrellevado con cierta frecuencia. En estas circunstancias, los triploides pueden aparecer con mayor frecuencia (Husband & Schemske, 1998; Husband, 2004).

En las especies de *Turnera* con citotipos diploide y autotetraploide, la mayoría de las poblaciones están constituidas por un solo citotipo, aunque también se encontraron poblaciones mixtas diploide – triploide – tetraploide (Eliás *et al.*, 2011; Kovalsky & Solís Neffa, 2012). En *T. krapovickasii* y *T. scabra*, los diploides y tetraploides están segregados espacialmente (Shore & Barrett, 1986; Barrett & Shore, 1987; Lazaroff *et al.*, 2016),

aunque también se detectaron algunos individuos triploides en las poblaciones naturales diploides de *T. krapovickasii* (Lazaroff *et al.*, 2016). Dicho hallazgo, sumado a la presencia de triploides en la progenie de los cruzamientos experimentales entre diploides y tetraploides de *T. krapovickasii* y *T. subulata* detectados en este trabajo, evidencian que el bloqueo triploide también puede ser superado en estas especies.

Asimismo, se ha sugerido que el aislamiento reproductivo entre los citotipos puede ser asimétrico (Husband & Sabara, 2003). El colapso de los embriones debido a desbalances en el nivel de ploidía o en la relación materno : paterna en el embrión / endosperma puede ser sobrellevado

Tabla 3. Promedio ± ES y variaciones de las asociaciones cromosómicas en MI de los de los híbridos triploides y tetraploides de *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata*.

Híbrido	Nivel de ploidía	I	II	III	IV	CMP	Viabilidad del polen (%)
I1 x I2	3x	1,19 ± 0,10 (0 - 4)	1,15 ± 0,09 (0 - 3)	3,83 ± 0,09 (2 - 5)	-	22	15.2
K4as x K6	3x	2,08 ± 0,37 (0 - 4)	2,03 ± 0,37 (0 - 4)	2,91 ± 0,37 (1 - 5)	-	89	11.3
K5 x I1	4x	0,09 ± 0,09 (0 - 2)	3,57 ± 0,53 (0 - 8)	-	3,19 ± 0,27 (1 - 5)	21	87.97
E4 x I1	4x	0,22 ± 0,14 (0 - 1)	3,55 ± 0,72 (0 - 8)	0,22 ± 0,14 (0 - 1)	3 ± 0,37 (1 - 5)	12	76

Tabla 4. Configuraciones cromosómicas de los híbridos triploides y tetraploides de *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata*.

Configuraciones cromosómicas	11 x 12		K4AS x K6		K5 x 11		E4 x 11	
	Frecuencia	Porcentaje (%)						
5 III	23	25.84	2	16.67				
1I + 1II + 4III	35	39.33	2	16.67				
2I + 2II + 3III	21	23.6	2	16.67				
3I + 3II + 2III	9	10.11	5	41.66				
4I + 4II + 1III			1	8.33				
4I + 1II + 3III	1	1.12						
5IV					3	14.29	1	11.11
2II + 4IV					7	33.33	4	44.45
4II + 3IV					4	19.05	1	11.11
6II + 2IV					4	19.05		
8II + 1IV					2	9.52	1	11.11
2I + 5II + 2IV					1	4.76		
1I + 2II + 1III + 3IV							1	11.11
1I + 4II + 1III + 2IV							1	11.11
TOTAL	89	100	12	100	21	100	9	100

cuando la planta con el nivel de ploidía más alto es empleada como progenitor femenino, como fuera observado en algunos cruzamientos interploidía involucrando otras especies de *Turnera* (Shore & Barret, 1985; Arbo & Fernández, 1987, Fernández & Solís Neffa, 2004; Fernández *et al.*, 2010) así como especies de otros géneros (Woodell & Valentine, 1961, Ockendon, 1968; Levin, 1971). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la asimetría en los cruzamientos interploidía podría variar entre las especies de *Turnera*, ya que aunque en *T. scabra* los cruzamientos sólo fueron exitosos cuando los tetraploides fueron utilizados como progenitores femeninos, en *T. krapovickasii* el número de cruzamientos exitosos, así como de frutos y semillas obtenidos, fue variable en las diferentes combinaciones empleadas en los cruzamientos.

Por otra parte, la eficacia reproductiva de los triploides y el tipo de gametos ($n=1x$, $n=2x$ y $n=3x$) que forman pueden contribuir a la dinámica de las zonas de contacto entre citotipos (Harlan & deWet, 1975; de Wet, 1980; Felber & Bever, 1997; Ramsey & Schemske, 1998; Burton & Husband, 2000). En las zonas de contacto entre citotipos, la producción de triploides estériles, como resultado de las hibridaciones entre diploides y tetraploides, puede favorecer la evolución de barreras reproductivas entre los dos citotipos y, de este modo, contribuir a la segregación espacial de ambas poblaciones. Por el contrario, aún con una fertilidad parcial, los triploides pueden actuar como intermediarios en la producción de tetraploides (hipótesis del triploide - puente) (Harlan & de Wet, 1975; de Wet, 1980) y/o contribuir al flujo génico entre diploides y tetraploides (Stebbins, 1971; Levin, 1975; Felber & Bever, 1997; Lenormand, 2002; Pannell *et al.*, 2004; Stift *et al.*, 2010).

Los resultados aquí obtenidos demostraron que los triploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra*, no son completamente estériles. Los porcentajes de viabilidad del polen de dichos triploides concuerdan con los detectados previamente en triploides provenientes de poblaciones naturales y en los resultantes de cruzamientos experimentales (Arbo & Fernández, 1983; Elías, 2009; Kovalsky, 2012). Las causas de la infertilidad de los poliploides son complejas e incluyen tanto aberraciones meióticas, como los efectos fisiológicos y los factores génicos de la poliploidía (Comai, 2005). En particular, en los

triploides, la ocurrencia de univalentes y trivalentes sería la principal causa de esterilidad, ya que la presencia de los mismos complica la segregación meiótica normal de los cromosomas homólogos, los que se dividen desigualmente durante anafase I (Sybenga, 1975). La alta frecuencia de univalentes y trivalentes detectada en los triploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra* sería, por lo tanto, la causa de la reducción de la viabilidad del polen de los triploides. Por otra parte, la detección de polen viable en los triploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra* sugiere que dichos triploides forman gametos viables (aunque en baja proporción), los que podrían intervenir en la formación de neopoliploides mediante poliploidización sexual unilateral, como se comprobó en *T. sidoides* (Kovalsky & Solís Neffa, 2012, 2015).

Asimismo, el mayor número promedio de trivalentes que de univalentes y bivalentes detectado en los híbridos triploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra*, evidencia la continuidad genética entre diploides y tetraploides. Este hecho sumado a que los triploides de *T. krapovickasii* y *T. scabra* no son totalmente estériles, sugiere que dichos triploides podrían tener un importante papel en el flujo génico entre citotipos en las poblaciones mixtas o en las zonas de contacto diploide-tetraploide.

Es interesante señalar que en el híbrido triploide de *T. krapovickasii* K4as × K6 se encontró una célula con una asociación cromosómica de decavalente, la única explicación posible es que se deba a una translocación múltiple entre los cromosomas de las dos accesiones (K4as y K6). Probablemente esta translocación múltiple involucre segmentos muy pequeños, motivo por el cual se encontró una sola célula con esta asociación.

Híbridos tetraploides. *T. krapovickasii* y *T. scabra* están aisladas geográficamente. *T. krapovickasii* vive en el norte Argentino y sur de Bolivia, mientras que *T. scabra* crece en el norte de Brasil y Centro América. Los resultados del análisis citogenético tanto de los híbridos tetraploides aquí obtenidos como de los híbridos diploides obtenidos previamente (Fernández & Arbo, 1989) sugieren que, a pesar del aislamiento geográfico, el aislamiento reproductivo entre ambas especies es incompleto.

Los resultados del análisis citogenético de los híbridos diploides obtenidos previamente (Fernández & Arbo, 1989) y de los híbridos

tetraploides de *T. krapovickasii* × *T. scabra* y *T. subulata* × *T. scabra* obtenidos en este trabajo, sugieren que la capacidad de cruzamiento y las barreras de esterilidad entre las especies están más desarrolladas a nivel diploide; mientras que los tetraploides se cruzan con bastante facilidad entre sí para producir híbridos con un alto grado de fertilidad. Además, el porcentaje de viabilidad del polen es menor en los híbridos diploides (35,7% - 69,85%, en Fernández & Arbo, 1989) que en los híbridos tetraploides (76% - 87,97%). En los híbridos diploides en metafase I se encontraron células con tres a cinco bivalentes (Fernández & Arbo, 1989); mientras que los híbridos tetraploides aquí estudiados presentaron cuadrivalentes en todas las células (hasta el máximo posible de 5 cuadrivalentes). De acuerdo con estos resultados, *T. krapovickasii*, *T. scabra* y *T. subulata* serían más afines a nivel tetraploide que a nivel diploide.

T. subulata y *T. scabra* conviven en Colombia, Venezuela y Brasil (Arbo, 2005), hibridan con facilidad (Arbo & Fernández, 1987; Fernández & Arbo, 1989; Shore & Barrett, 1985) y sus cariotipos son altamente semejantes (Solís Neffa & Fernández, 1993). Los análisis citogenéticos mediante técnicas clásicas y moleculares indican que existe una homología considerable entre los genomas de *T. scabra*, *T. subulata* y *T. krapovickasii* (López et al. 2013). De acuerdo a Fernández y Arbo (1989) probablemente *T. subulata* haya dado origen a *T. scabra* y *T. krapovickasii*, esta deducción surgió a partir de la interpretación de la distribución geográfica y del análisis citogenético de los híbridos diploides entre estas especies. Los datos de cruzabilidad, comportamiento meiótico y viabilidad de polen de los híbridos tetraploides obtenidos en este trabajo sustentan esta hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Secretaría General de Ciencia y Técnica (P004/14) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET PIP 11220120100192CO). S. A. Fernández es becaria doctoral CONICET. I. E. Kovalsky es becaria postdoctoral ANPCyT-FONCyT. V. G. Solís Neffa es miembro de la Carrera del Investigador Científico de CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- ARBO, M. M. 1985. Notas taxonómicas sobre Turneráceas sudamericanas. *Candollea* 40: 175-191.
- ARBO, M. M. 1986. Paraguay, centro importante de especiación en las Turneráceas. *Candollea* 41:211-218.
- ARBO, M. M. 1987. Turneraceae. En: SPICHTER R, (ed.). *Flora del Paraguay* Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève & Missouri Botanical Garden, 6: 1-65.
- ARBO, M. M. 1995. Turneraceae Parte I. Piriqueta. *Flora Neotropica Monog.* 67: 1-156.
- ARBO, M. M. 2005. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae) III. Series Anomalae y Turnera. *Bonplandia* 14(3-4): 115-318.
- ARBO, M. M. 2008. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae) IV. Series Leiocarpae, Sessilifoliae y Conciliatae. *Bonplandia* 17:107-334.
- ARBO, M. M. & A. FERNÁNDEZ. 1983. Posición taxonómica, citología y palinología de tres niveles de ploidía de *Turnera subulata* Smith. *Bonplandia* 5: 111-226.
- ARBO, M. M. & A. FERNÁNDEZ. 1987. Cruzamientos intra e interespecíficos en *Turnera*, serie *Canaligeriae*. *Bonplandia* 6(1): 23 - 28.
- ARBO, M. M., A. GONZÁLEZ & S. SEDE. 2015. Phylogenetic relationships within Turneraceae based on morphological characters with emphasis on seed micromorphology. *Plant. Syst. Evol.* 301 (7): 1907-1926.
- BACKER, C. A. 1951. Turneraceae. *Flora Malesiana Ser:* 1, 4: 235-238.
- BARRETT, S. C. H. 1978. Heterostyly in a tropical weed: the reproductive biology of the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Can. J. Bot.* 56(15): 1713-1725.
- BARRETT, S. C. H. & J. S. SHORE. 1980. Variation in breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex. Trabajo presentado en el Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, Vancouver, Canadá.
- BARRETT, S. C. H. & J. S. SHORE. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41: 340-354.
- BOWEN, C. C. 1956. Freezing by liquid carbone dioxide in making slides permanent. *Stain Technol.* 31: 87-90.
- BURTON, T. L. & B. C. HUSBAND. 2000. Fitness differences among diploids and tetraploids and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium* (Onagraceae): mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution* 54:1182-1191.

- COMAI, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6: 836-846.
- DE WET, J. M. J. 1980. Origins of polyploids. — In: Lewis, W. H. (ed.), *Polyploidy, biological relevance*: 3–16. Plenum Press, New York.
- ELÍAS, G. 2009. Dinámica de una zona de contacto diploide-tetraploide de *Turnera sidoides* subsp. Pinnatifida (Turneraceae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán.
- ELÍAS, G.; M. SARTOR & V. G. SOLÍS NEFFA. 2011. Patterns of cytotype variation of *Turnera sidoides* subsp. pinnatifida (Turneraceae) in mountain ranges of central Argentina. *J. Plant. Res.* 124: 25–34.
- FELBER, F. & J. D. BEVER. 1997. Effect of triploid fitness on the coexistence of diploids and tetraploids. *Biol. J. Linn. Soc.* 60: 95-106.
- FERNÁNDEZ, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Bol. Soc. Argen. Bot.* 15(2-3):287-290.
- FERNÁNDEZ, A. 1987. Estudios cromosómicos en *Turnera* y *Piriqueta* (Turneraceae). *Bonplandia* 6(1): 1-21.
- FERNÁNDEZ, A. 1997. Estudio citogenético en híbridos entre una especie octoploide, *Turnera aurelii* y dos diploides, *T. caerulea* y *T. joelii*. *Bonplandia* 9:281–286.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 1989. Relaciones genómicas entre cuatro especies diploides de *Turnera* con flores amarillas (Serie Canaligerae). *Bonplandia* 6(2): 93-109.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 1990. Gametas no reducidas y relaciones genómicas en tres especies de *Turnera* (Turneraceae). *Darwiniana* 30: 21 – 26.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 1993a. Relaciones genómicas entre seis especies de *Turnera* (Serie Canaligerae) del Paraguay. *Candollea* 48: 305-318.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 1993b. Citogenética de híbridos entre *Turnera grandidentata* (4x) y *T. subulata* y *T. scabra* (Turneraceae). *Bonplandia* 7:119-127.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 1996. Relaciones genómicas entre las especies diploides de flores blanco-azuladas de *Turnera* (Serie Canaligerae). *Bonplandia* 9: 95-102.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 2000a. Cytogenetic relationships between *Turnera aurelii*, *T. cuneiformis* (2n=8x=40) and *T. orientalis* (2n=6x=30) (Turneraceae). *Cytologia* 65: 97-102.
- FERNÁNDEZ, A. & M. M. ARBO. 2000b. Relaciones genómicas entre dos especies hexaploides de *Turnera*, *T. orientalis* y *T. velutina*, y una especie diploide, *T. grandiflora* (Turneraceae, serie Turnera). *Bonplandia* 10:181-187.
- FERNÁNDEZ, A. & V. G. SOLÍS NEFFA. 2004. Genomic relationships between *Turnera krapovickasii* (2x, 4x) and *T. ulmifolia* (6x) (Turneraceae, Turnera). *Caryologia* 57: 45-51.
- FERNÁNDEZ, A., H. REY, & V.G. SOLÍS NEFFA. 2010. Evolutionary relationships between the diploid *Turnera grandiflora* and the octoploid *T. fernandezii* (Serie Turnera, Turneraceae). *Ann. Bot. Fenn.* 47: 321-329.
- FUTUYMA, D. J. 1998. *Evolutionary biology*. 3rd. Sunderland. MA: Sinauer Assoc. Inc.
- HAMEL, J. L. 1965. Le noyau et les chromosomes somatiques de *Turnera ulmifolia* L. *Mém. Mus. Natl. His. Nat. Sér. B, Bot.* 16(1): 3-8.
- HARLAN, J. R. & J. M. J. DEWET. 1975. En Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Bot. Rev.* 41: 361-390.
- HUSBAND, B. C. & D. W. SCHEMSKE. 1998. Cytotype distribution at a diploid – tetraploid contact zone in *Chamerion (Epilobium) angustifolium* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 85 (12):1688-1694.
- HUSBAND, B. C. & H. A. SABARA. 2003. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytol.* 161: 703-713.
- HUSBAND, B. C. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 537-546.
- KÖHLER, C., O. MITTELSTEN SCHEID & A. ERILOVA. 2010. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends Genet.* 26: 142–148.
- KOVALSKY, I. E. 2012. Origen y establecimiento de neopoliploides en poblaciones naturales de *Turnera sidoides* L. (Turneraceae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- KOVALSKY, I. E. & V. G. SOLÍS NEFFA. 2012. Evidence of 2n microspore production in a natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *J. Pl. Res.* 125: 725–734.
- KOVALSKY, I. E. & V. G. SOLÍS NEFFA. 2015. Análisis de la progenie de individuos productores y no productores de gametos masculinos no reducidos de *Turnera sidoides* L. (Passifloraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50:23–33.
- KOVALSKY, I. E., A. FERNÁNDEZ & V. G. SOLÍS NEFFA. 2014. Mecanismos citológicos involucrados en la producción de gametos masculinos no reducidos en individuos diploides de *Turnera sidoides* subsp. *carnea* (Passifloraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49:227–234.
- Turnera krapovickasii (Passifloraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 51 (1): 153-167.
- LENORMAND, T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 17: 183–189.

- LEVIN, D. A. 1971. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon* 20:91-113.
- LEVIN, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plants populations. *Taxon* 24: 35-43.
- LOPEZ, A., A. FERNÁNDEZ & L. POGGIO. 2010a. Genomic affinities in *Turnera* (subseries *Turnera*, *Turneraceae*) inferred by in situ hybridization techniques. *Genome* 53: 594-598.
- LOPEZ, A., L. POGGIO & A. FERNÁNDEZ. 2010b. Genomic relationships between *Turnera orientalis* and *T. occidentalis* (Turneraceae). *Ann. Bot. Fennici* 47: 471-476.
- LÓPEZ, A., A. FERNÁNDEZ & J. S. SHORE. 2013. Inferences on the origins of polyploid *Turnera* species (Passifloraceae). *Botany* 91: 167 - 175.
- LUMARET R., J. L. GUILLERM, J. DELAY, A. A. L. LOUTFI, J. IZCO & M. JAY. 1987. Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L. from Galicia (Spain). *Oecologia* 73:436-446.
- MARKS, G. E. 1966. The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from *Solanum chacoense*. *Evolution* 20: 552-5.
- NEGRI, V. & F. VERONESSI. 1989. Evidence for the existence of $2n$ gametes in *Lotus tenuis* Wald. et Kit ($2n=2x=12$); their relevance in evolution of breeding of *Lotus corniculatus* L. ($2n=4x=24$). *Theor. Appl. Genet.* 78: 400-404.
- OCKENDON, D. J. 1968. Biosystematic studies in the *Linum perenne* group. *New Phytol.* 67: 787 - 813.
- PANNELL J. R., D. J. OBBARD & R. J. BUGGS. 2004. Polyploidy and the sexual system: what can we learn from *Mercurialis annua*? *Biol. J. Linn. Soc.* 2: 547-560.
- PANSERI A. F., J. G. SEIJO & V. G. SOLIS NEFFA. 2008. Análisis de la producción y frecuencia de microsporas no reducidas en diploides de *Turnera sidoides* (Turneraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 43: 95-101.
- PETIT, C., F. BRETAGNOLLE & F. FELBER. 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends Ecol. Evol.* 14: 306-311.
- RAMAN, V. S. & P. C. KESAVAN. 1964. Meiosis and nature of polyploidy in *Turnera ulmifolia*. *J. Indian Bot. Soc.* 43: 495-499.
- RAMSEY, J. & D. W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 467-501.
- SCHUTER, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.* 16: 372-380.
- SHORE, J. S. 1991. Tetrasomic inheritance and isozyme variation in *Turnera ulmifolia* vars. *elegans* Urb. and *intermedia* Urb. (Turneraceae). *Heredity* 66: 305-312.
- SHORE, J. & S. C. H. BARRET. 1985. Morphological differentiation and crossability among populations of the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Syst. Bot.* 10(3): 308-321.
- SHORE, J. & S. C. H. BARRETT. 1986. Genetic modifications of dimorphic incompatibility in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 796-807.
- SHORE, J. S., M. M. ARBO & A. FERNÁNDEZ. 2006. Breeding system variation, genetics and evolution in the Turneraceae. *New Phytol.* 171: 539-551.
- SOLÍS NEFFA, V. G. 1996. Cariotipos de especies de *Turnera* (Turneraceae). *Bonplandia* 9 (1-2): 121-127.
- SOLÍS NEFFA, V. G. & A. FERNÁNDEZ. 1993. Estudios cromosómicos en especies de *Turnera* (Turneraceae). *Bonplandia* 7(1-4): 101-118.
- SOLÍS NEFFA, V. G. & A. FERNÁNDEZ. 2001. Cytogeography of the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae, Leiocarpae). *Bot. J. Linn. Soc.* 137: 189-196.
- SOLÍS NEFFA, V. G. & A. FERNÁNDEZ. 2002. Karyotypic studies in *Turnera sidoides* complex (Turneraceae, Leiocarpae). *Amer. J. Bot.* 89: 551-558.
- STEBBINS, G. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Arnold London, UK.
- STIFT M., R. BREGMAN, J. G. B. OOSTERMEIJER & P. H. VAN TIENDEREN. 2010. Other tetraploid species and conspecific diploids as sources of genetic variation for an autotetraploid. *Am. J. Bot.* 97: 1858-1866.
- SYBENGA, J. 1975. Meiotic Configurations: Meiotic configurations: a source of information for estimating genetic parameters. Springer-Verlag, Berlin.
- TAYLOR, N.L. & E. WIESEMAN. 1988. Triploids and tetraploids from 43-23 crosses in red clover. *Crop Sci.* 27: 14-18.
- URBAN, I. 1883. Monographie der familia der Turneraceen. *Jahrb. Konigl. Bot. Gart.* 2:1-152.
- VAN DIJK, P., M. HARTOG & W. VAN DELDEN. 1992. Single cytotype areas in autopolyploid *Plantago media* L. *Biol. J. Linn. Soc.* 46: 315 - 331.
- WOODELL, S. R. J. & D. H. VALENTINE. 1961: Studies in the British Primulas. IX. Seed incompatibility in diploid- autotetraploid crosses. *New Phytol.* 60: 282-294.
- ZOHARY, D. & U. NUR. 1959. Natural triploids in the orchard grass, *Dactylis glomerata* L., polyploid complex and their significance for gene flow from diploid to tetraploid levels. *Evolution* 13: 311- 17.

Recibido el 21 de diciembre de 2016, aceptado el 9 de febrero de 2017.

