

Artículo científico

Análisis citogenético de *Plectranthus barbatus* Andrews naturalizado en la provincia de Tucumán, Argentina**Cytogenetic analysis of *Plectranthus barbatus* Andrews naturalized in Tucumán province, Argentina**

A. Pastoriza*; A. Nasif; L. Martínez Pulido; C.J. Budeguer; B. Andrada Mansilla

Cátedra Genética, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Kirchner 1900, (4000), Tucumán, Argentina. *E-mail: adrianapastoriza@yahoo.com.ar

Resumen

El boldo brasileiro (*Plectranthus barbatus* Andrews) es una planta originaria de la India y naturalizada en algunas regiones de Argentina. Se usa en medicina popular, farmacología y como ornamental. El objetivo de este trabajo fue caracterizar a *P. barbatus* mediante estudios citogenéticos para contribuir al conocimiento biológico y genético de la especie. El material se colectó en San Pedro de Colalao, provincia de Tucumán, Argentina. Para los estudios citológicos se utilizaron meristemas radiculares (mitosis) e inflorescencias (meiosis). Para la determinación de viabilidad de polen en células madres de polen, se empleó la técnica de coloración de Azul de Algodón en Lactofenol. El número cromosómico en mitosis es de $2n=32$. En meiosis, se observaron monovalentes y trivalentes en Metafase I, rezagados en Anafase I y en Telofase I. En los preparados de polen se encontró un 70 % de granos anormales y un 30 % de normales. Según los números básicos de $x = 6, 7$ u 8 citados para el género, se deduce que se trata de un tetraploide con meiosis irregular (autotetraploide). La falla en la formación de semillas explica su forma más frecuente de propagación: la multiplicación vegetativa. Sería conveniente tener en cuenta este tipo de multiplicación para mantener un genotipo deseado, logrando uniformidad genética en la población, a la vez que se logra rapidez en la obtención de una gran cantidad de plantas.

Palabras clave: Mitosis; Meiosis; Irregularidad reproductiva; Poliploide.

Abstract

The Brazilian boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews) is a plant from India and naturalized in some regions of Argentina. It is used in folk medicine, pharmacology and as ornamental. The aim of this work was to characterize to *P. barbatus* by means of cytogenetics studies to contribute to the biological and genetics knowledge of the species. The material was collected in San Pedro de Colalao, Tucumán province, Argentina. Root-meristems (mitosis) and inflorescences (meiosis) were used for the cytological studies. To determine pollen viability of pollen mother cells the coloration technique of Blue Cotton in Lactophenol was employed. The chromosomal number in mitosis was $2n=32$. In meiosis, monovalent and trivalent at Metaphase I, delayed at Anaphase I and Telophase I were observed. In pollen preparations a 70% of abnormal grains and a 30% of normal ones was found. According to the basic numbers of $x = 6, 7$ or 8 cited for the genus, it is deduced that it is a tetraploid species with irregular meiosis (autotetraploid). The failure in the seed formation explains its more frequent form of propagation: the vegetative multiplication. It would be convenient to keep into account this type of multiplication for maintaining a desired genotype, reaching genetics uniformity in the population at the same time that a quick obtaining of a great number of plants.

Keywords: Mitosis; Meiosis; Reproductive irregularity; Polyploid.

Introducción

El género *Plectranthus* pertenece a la familia *Lamiaceae* y cuenta con alrededor de 300 especies (Toth *et al.*, 2013). Se caracteriza por incluir numerosas especies aromáticas muy importantes

por la riqueza de sus aceites esenciales presentes en tricomas glandulares, brotes, hojas y tallos. Posee ejemplares con interés medicinal y económico, aunque la composición química de sus aceites aún no es muy conocida en todas las especies (Magalhães Bandeira *et al.*, 2010).

Recibido 18/04/17; Aceptado 06/06/17.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Plectranthus barbatus Andrews conocido como boldo brasileiro es originario de la India, se distribuye ampliamente en Egipto, Arabia, África Occidental y Sudamérica (Codd, 1975). Es una de las especies aromáticas más importantes tradicionalmente usada en medicina popular y presenta numerosos sinónimos tales como *Plectranthus forskohlii* Briq.; *Plectranthus grandis* (Cramer) R. H.; *Coleus forskohlii* Briq. y *Coleus barbatus* (Andr) Benth entre otros (Campos Reis *et al.*, 2015). Es una planta herbácea con raíz abundante. Los tallos crecen hasta 60 cm aproximadamente y se vuelven decumbentes cuando crecen mucho.

La inflorescencia y las flores son típicas de la familia *Lamiaceae*. Las raíces son fasciculadas, gruesas, suculentas y contienen la forskolina química (Mariya *et al.*, 2013). Sus hojas son ovadas, pilosas, gruesas con bordes dentados. Las flores de coloración azulada (Figura 1), crecen en racimos (espigas) en la estación lluviosa (Costa, 2006).



Figura 1. *Plectranthus barbatus* Andrews, procedente de San Pedro de Colalao (Departamento Trancas), Provincia de Tucumán, Argentina. A) Vista general de la población. B) y C) Flores.

También conocido como boldo nacional en Brasil, es una de las plantas más citadas en relevamientos etnobotánicos. Muestra gran variación morfológica, siendo una especie ampliamente distribuida y adaptada a numerosos ambientes. Esta especie es cultivada y utilizada en forma de medicamentos fitoterapéuticos por sus propiedades analgésicas, antidiarréicas y antiespasmódicas, siendo recomendada en problemas respiratorios, enfermedades del corazón y ciertos desórdenes del sistema nervioso central. Numerosos estudios muestran que “forskolin” es el componente activo principal (Campos Reis *et al.*, 2015).

En vista de la importancia de su uso, resulta relevante profundizar estudios genéticos, en especial aquellos que describan detalladamente su cariotipo para la correcta identificación de las plantas (Campos Reis *et al.*, 2015).

Los trabajos relacionados con la citogenética clásica y la citogenética molecular, son escasos o poco difundidos (Magalhães Bandeira, 2010). Sin embargo, hay estudios que muestran diferentes números básicos para el género y diferentes números cromosómicos para la especie, indicando variaciones en el genoma, tanto aneuploides como euploides (Campos Reis *et al.*, 2015).

De los estudios citogenéticos realizados para el género *Plectranthus* se ha informado una gran variación en el número cromosómico, desde $2n=14$ a $2n=84$, como así también, variaciones en el comportamiento en meiosis, informados en estudios previos de ejemplares provenientes de la provincia de Tucumán (Nasif *et al.*, 2016).

Aunque el número básico más común de la especie es $x=7$ y el número de cromosomas es 28 (De Wet, 1958; Morton, 1962), algunas especies presentan números básicos secundarios de $x=6$ a $x=8$ (Darlington y Wylie, 1955). Adicionalmente, en el género son comunes las variaciones intraespecíficas de números cromosómicos. Morton (1993) describió números aneuploides $2n=26$ y 28 para *Plectranthus assurgens* (Baker) J. K. Morton y *Plectranthus glandulosus* Hook, $2n=28$ y $2n=30$ para *Plectranthus tenuicaulis* (Hook. F.) J. K. Morton, mientras que para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Thoppil (1993) describe una gran variación de números somáticos ($2n=16, 24, 30, 32, 34$ y 48), indicando que los eventos de poliploidía en asociación con aneuploidía pueden contribuir a conocimiento de la complejidad del género.

Además del número cromosómico, es importante conocer el grado de ploidía para analizar otras variables para la confección del cariotipo, como longitud cromosómica, longitud de brazo corto y brazo largo y ubicación del centrómero. El índice centromérico es un parámetro que permite la clasificación de los cromosomas de acuerdo con la posición del centrómero y es muy utilizado en la sistematización de los complementos cromosómicos (Levan *et al.*, 1964; Stebbins, 1971).

Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar a *P. barbatus* mediante estudios citogenéticos, para contribuir al conocimiento biológico y genético de la especie. Para ello, se realizaron análisis de cromosomas en mitosis, en meiosis y viabilidad de granos de polen.

Materiales y métodos

El material de *P. barbatus* Andrews, se colectó en la localidad de San Pedro de Colalao (Departamento Trancas), provincia de Tucumán (26° 14' 00'' S y 65°29'00'' O).

Para los estudios de mitosis en meristemas radiculares, se analizaron quince plantas, un preparado por cada una, observando en promedio, treinta células por cada preparado. Se realizó un pretratamiento con paradiclorobenceno (Paclisol) durante 2,20 h a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron en una solución de Carnoy (alcohol etílico absoluto: ácido acético glacial, 3:1), luego se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1N a 58°C durante 4 min. Para la confección de los preparados se aplastaron los meristemas entre porta y cubre objeto en gota de colorante hematoxilina acética al 2 % (p/v) con citrato férrico al 1 % (p/v) como mordiente (Budeguer, 2012a; Pastoriza *et al.*, 2013). El análisis del cariotipo se basó en la técnica de Levan *et al.* (1964). Para meiosis se fijaron las inflorescencias en solución de Newcomer (alcohol isopropílico: ácido acético glacial: éter de petróleo: acetona: dioxano, 6:3:1:1:1). Los preparados se realizaron siguiendo el protocolo de Budeguer *et al.* (2013). Se aplastaron las anteras jóvenes empleando la misma técnica de coloración que para mitosis. La determinación de viabilidad de polen se realizó en Células Madre de Polen (CMP), empleándose Azul de Algodón en Lactofenol (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Budeguer, 2012b). Se aplastaron anteras maduras con colorante sobre un portaobjeto y se cubrió con cubre objeto de 24 x 24 mm. A las 24 h se observó en microscopio óptico, considerando normales a los granos turgentes y bien coloreados y anormales a los deformes o sin colorear. Las microfotografías fueron tomadas con el microscopio Carl Zeiss Primo Star con cámara digital integrada.

Resultados y discusión

El número cromosómico observado en mitosis fue de $2n=32$, que se corresponde con un $x=8$ citado para el género (Darlington, 1955; De Wet, 1958; Nasif *et al.*, 2016). Se trata de un complemento bimodal, con cromosomas metacéntricos (m) y submetacéntricos (sm). Teniendo en cuenta lo informado por Lacadena (1981), que indica que el tamaño de los cromosomas en monocotiledóneas puede alcanzar hasta 20 μm y en dicotiledó-

neas hasta 5 μm ; el cariotipo de *P. barbatus* está conformado por un grupo de cromosomas pequeños y otro de cromosomas muy pequeños, variando entre 2,5 μm a 1,5 μm , respectivamente. La fórmula cromosómica determinada fue $7m + 1sm$ (Figura 2), encontrándose además, un cromosoma con satélite (cromosoma SAT), entre el grupo de los cromosomas de mayor tamaño.

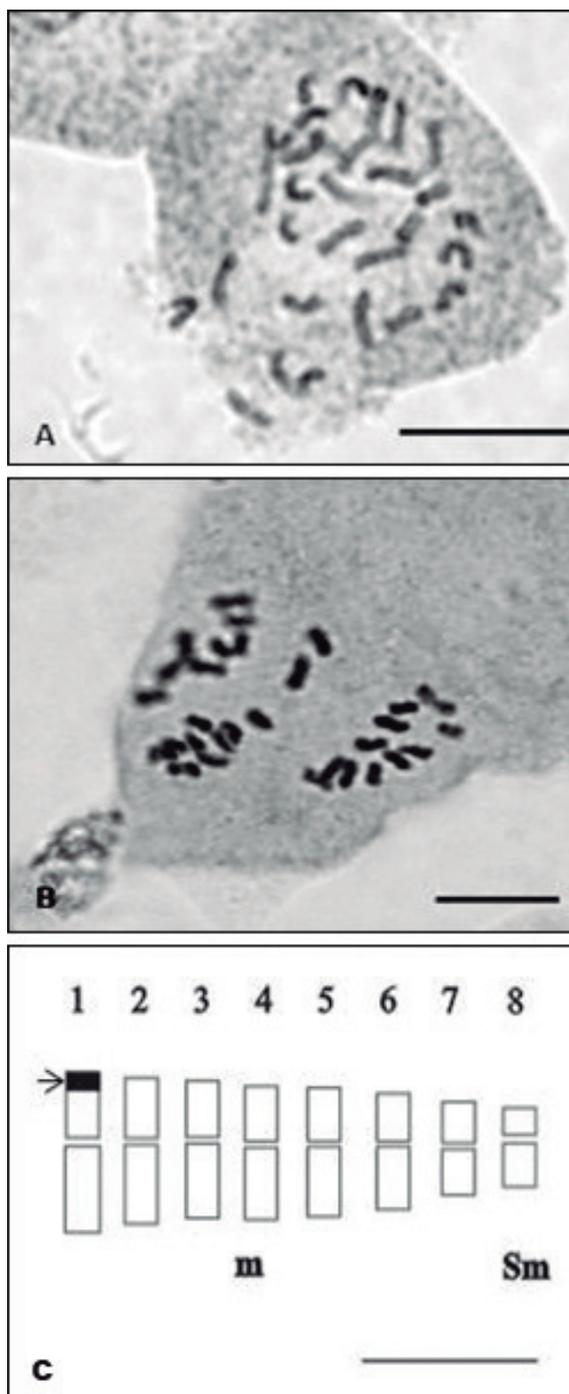


Figura 2. Mitosis en *Plectranthus barbatus* Andrews. $2n=32$. A) Prometáfase mitótica. B) Metaáfase mitótica. C) Idiograma de *P. barbatus* Andrews ($7m + 1sm$). La flecha señala el satélite. La barra indica 10 μm .

Los resultados obtenidos, difieren de los informados por Campos Reis *et al.* (2015), que obtuvieron una fórmula cromosómica de $14m + 1sm$, de un $2n=30$, la cual se corresponde con un individuo diploide, a diferencia de lo encontrado en este trabajo, donde se determinó un tetraploide con un $x=8$ (De Wet, 1958). Por otro lado, Thoppil (1993) describe una gran variación de números cromosómicos ($2n=16, 24, 30, 32, 34$ y 48), indicando que los eventos poliploides en asociación con los aneuploides, pueden contribuir a la complejidad del género.

En el análisis de cromosomas en meiosis, se observó la presencia de monovalentes y trivalentes en Metafase I, además de cromosomas rezagados en Anafase I y en Telofase I (Figura 3). Estas configuraciones son indicadoras de meiosis irregulares, dando generalmente como consecuencia, la formación de gametas inviables y por ende problemas de fertilidad.

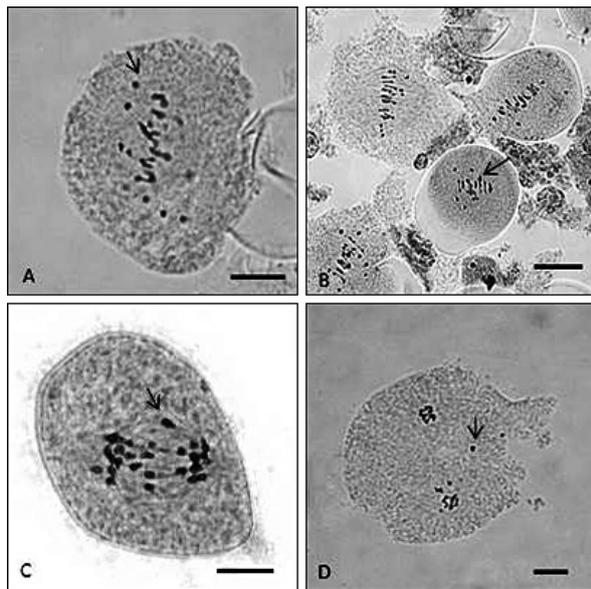


Figura 3. Meiosis en *Plectranthus barbatus* Andrews. Las flechas señalan: A) Monovalente en Metafase I, B) trivalente en Metafase I, C) Cromosomas rezagados en Telofase I, D) Micronúcleos en la División II de meiosis. La barra indica 10μ .

En el análisis de CMP se encontró un 70 % de granos anormales y un 30 % de normales. Los granos de polen observados poseen una morfología característica de la familia de las *Lamiaceae*, presentando granos hexacolpados con surcos verrucosos, que le confieren una forma subsferoidal (Velarde Montero *et al.*, 2011) (Figura 4).

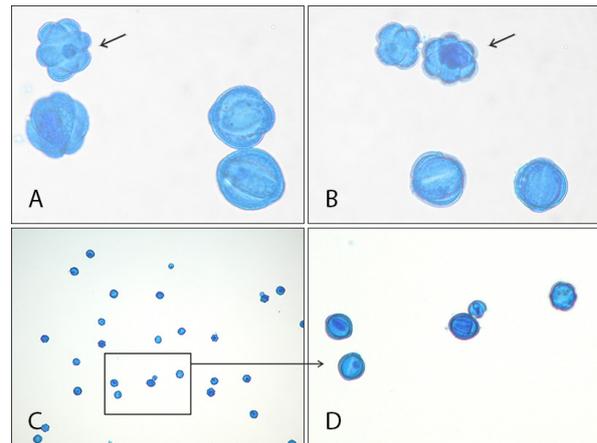


Figura 4. Granos de polen en *Plectranthus barbatus* Andrews. A y B) Granos de polen. La flechas señalan granos hexacolpados (aprox. $600x$). C) Granos de polen (aprox. $250x$). D) Extracción de la foto C, con detalle de granos inviables, I: inviable, V: viable (aprox. $400x$).

Conclusiones

El número cromosómico $2n=32$, con un número básico de $x=8$, indica que se trata de una especie tetraploide. Las irregularidades encontradas en meiosis están altamente correlacionadas con la poca viabilidad del polen y en consecuencia con la escasa formación de semillas. La condición de poliploide con anomalías en meiosis, respondería a un autotetraploide, a diferencia de los alotetraploides que son fértiles.

La falla en la formación de semillas explica su forma más frecuente de propagación, la multiplicación vegetativa. Sería conveniente tener en cuenta este tipo de multiplicación para mantener un genotipo deseado, logrando uniformidad genética en la población, a la vez que se logra rapidez en la obtención de una gran cantidad de plantas.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al subsidio del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), proyecto A/520.

Referencias bibliográficas

- Budguer C.J. (2012a). Variabilidad genética de poblaciones naturales de *Chenopodium ambrosioides* L. en la provincia de Tucumán. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina. En: <http://www.faz.unt.edu.ar/images/stories/pdfs/tesis/1m2012bud.pdf>, consulta: Abril 2017.

- Budeguer C.J. (2012b). Caracterización citogenética y viabilidad del polen de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants en la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 32 (1-2): 17-20.
- Budeguer C.J., Nasif A., Martínez Pulido L., Pastoriza A., Andrada Mansilla B. (2013). Cytogenetics of *Lippia alba* (Mill.) Brown from Lules, Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 33 (1): 11-14.
- Campos Reis A., Viccini L.F., Marçal de Sousa S. (2015). Contributions to cytogenetics of *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): a medicinal plant. *Comparative Cytogenetics* 9 (3): 451-463.
- Codd L.E. (1975). *Plectranthus* and allied genera in southern Africa. *Bothalia* 11 (4): 393-394.
- Costa, M.C.C.D. (2006). Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisaõ dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8 (2): 81-88.
- D'Ambrogio de Argüeso A. (1986). Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur, Argentina.
- Darlington C.D., Wyle A.P. (1955). *Chromosome Atlas of flowering plants*. George Allen & Unwin Ltd., Gran Bretaña.
- De Wet J.M.J. (1958). Chromosome number in *Plectranthus* and related genera. *South African Journal of Science* 34: 153-156.
- Lacadena J.R. (1981). Genética. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Levan A., Fredga A., Sanderber A. (1964). Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Magalhães Bandeira J.D., Bianchi V.J., Rubin S., Peters J.A., Bolacel Braga E.J. (2010). Genetic similarities among four species of the *Plectranthus* (L'Hér.) genus. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32 (1): 43-48.
- Mariya P., Radha A., Suresh Kumar D. (2013). On the High value Medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines* 5 (1): 64-73.
- Morton J.K. (1962). Cytotaxonomic studies on the West African Labiatae. *Journal of Linnean Society of London* 58: 231-283.
- Morton J.K. (1993). Chromosome numbers and polyploidy in the flora of Cameroon Mountain. *Opera Botanica a Societate Botanica Lundensi* 121: 159-172.
- Nasif A., Martínez Pulido L., Pastoriza A., Budeguer C.J., Andrada Mansilla B. (2016). Estudios citogenéticos en el Boldo Brasileiro. *Actas XXXIII Reunión Científica de la Sociedad de Biología de Tucumán*. 27-28 de octubre, Tañi del Valle, Tucumán, Argentina. P. 136.
- Pastoriza A., Martínez Pulido L., Budeguer C.J., Nasif A., Andrada Mansilla B. (2013). Estudios genéticos en *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc., *Chenopodium graveolens* Willd. y *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 33 (1): 15-19.
- Stebbins G.L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., Gran Bretaña.
- Toth M.G., Burgos A.M., Cenóz P.J. (2013). Multiplicación agámica de *Plectranthus ornatus* por medio de estacas. *Horticultura Argentina* 32 (79): 25-31.
- Thoppil J.E. (1993). Chromosome studies and exploration of chemical constituents in some members of South Indian Lamiaceae. Tesis doctoral, Universidad Mahatma Gandhi, Kerala, India. En: <http://www.mgtheses.in/page/?q=T%200609&search=Thoppil+%&page=1&rad=sc#>, Consulta: abril 2017.
- Velarde Montero G., Abundiz Bonilla L.A.M., Rodríguez de la Concha Paez M.A. (2011). Caracteres anatómicos y morfopalinológicos para la determinación de *Plectranthus coleiodes* Benth. c.v. mintleaf (Lamiaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2 (4): 13-31.