



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE JIGACHO
(*Vasconcellea stipulata* Badillo) MEDIANTE TÉCNICAS
CITOGENÉTICAS**

AUTOR: MARIÑO ROBALINO, LISSETTE MARIANELA

DIRECTOR: SEGOVIA SALCEDO, MARÍA CLAUDIA Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación , “**DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE JIGACHO (*Vasconcellea stipulata* Badillo) MEDIANTE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS**” fue realizado por la señorita **Mariño Robalino, Lissette Marianela** el mismo que ha sido revisado en su totalidad , analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido, por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que los sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de mayo de 2019.

María Claudia Segovia Ph.D.

DIRECTORA



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Mariño Robalino, Lissette Marianela**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE JIGACHO (*Vasconcellea stipulata* Badillo) MEDIANTE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS**” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos, y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es verás.

Sangolquí, 29 de mayo de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Lissette Marianela'.

Mariño Robalino Lissette Marianela

C.C.:1600578171



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Mariño Robalino Lissette Marianela**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE publicar el trabajo de titulación: “**DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE JIGACHO (*Vasconcellea stipulata* Badillo) MEDIANTE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS**” en el repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de mayo de 2019.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer 'Lissette Marianela'.

Mariño Robalino Lissette Marianela

C.I: 1600578171

DEDICATORIA

Sin duda alguna este logro va dedicado a mis padres,

que, con su apoyo incondicional siempre,

he podido conseguirlo.

Lisette Marianela Mariño Robalino

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Alberto y Carmita por haberme dado las mejores enseñanzas, y sobre todo por haber confiado siempre en mí. Gracias papá por ese apoyo incondicional, por siempre impulsarme a ser mejor, por esas palabras de motivación en cada momento de mi vida, por haberme guiado siempre por el buen camino y por ser el mayor orgullo que puedo tener. A ti mamá agradecerte por siempre haber estado ahí cuando lo necesitaba no solo como mamá sino como mi mejor amiga. Esos consejos, regaños y halagos sirvieron para estar aún más consciente de mi meta. A ambos les quedo muy agradecida. Gracias por ser mis padres.

A mi abuela Inés, que ha sido como una segunda madre y la que jamás ha dudado de mí. Gracias por todas las palabras de aliento, de apoyo, de motivación e igualmente gracias por confiar a ciegas en mí en todo momento. Quererla mucho.

Jeff, totalmente agradecida por haberme motivado en los momentos en los que yo creía que ya no podía más. Por haberme levantado el ánimo siempre y haberme soportado los días más tristes. Por ser la persona que me ha ayudado a crecer en muchos aspectos y este es también el resultado de ese constante apoyo. Gracias por ser quien quiere seguir creciendo a mi lado. Te amo.

Mari, hermana mía, gracias simplemente por existir. Por ser la persona que siempre ha estado ahí, por ser quien me ha acompañado siempre en las locuras, por compartir conmigo todos los días experiencias nuevas, por ser una persona tan humilde y educada. Gracias por esos ánimos y grandes consejos en los momentos precisos. Gracias por estar siempre conmigo.

Sofí, gracias por haberme regalado tu amistad, por ser una persona tan sincera, transparente y excepcional. Por haberme dado esos grandes consejos cuando me sentía mal. Por soportar por

horas mis historias y por haberme levantado el ánimo siempre. Gracias, muchas gracias, por ser la persona que eres.

Profundamente agradecida con mi tutora académica, María Claudia Segovia, por haberme dado la oportunidad de participar en este trabajo de investigación, donde he adquirido gran conocimiento, gracias por haberme entendido en todas las adversidades que se han presentado, y sobre todo por haberme alentado a seguir adelante. A la doctora Mónica Jadán por haberme abierto las puertas de sus laboratorios y haberme permitido trabajar en ellos, además gracias por esos consejos de gran utilidad que permitieron que el trabajo sea más fluido. Gracias por siempre crear ese ambiente más ameno y llevadero en el laboratorio. Andre, mi laboratorista favorita, muy agradecida por esa gran amistad brindada, además de haberme apoyado siempre científicamente con todo lo que he necesitado esa amistad que en el camino se formó permitió motivarme aún más. Gracias por tantas alegrías, risas y momentos divertidos, así como consejos y recomendaciones que ayudaron siempre.

Por último, profundamente agradecida con la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y todo el personal docente que me ha permitido convertirme en una profesional, gracias por todo el conocimiento aportado y por haberme abierto las puertas de la institución para que pueda formarme académicamente en lo que más me gusta, la biotecnología.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|--------------|
| CERTIFICACIÓN | I |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD | II |
| AUTORIZACIÓN | III |
| DEDICATORIA | IV |
| AGRADECIMIENTO..... | V |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | VII |
| LISTADO DE TABLAS..... | X |
| LISTADO DE CUADROS | XIII |
| LISTADO DE FIGURAS..... | XIV |
| LISTADO DE ABREVIATURAS..... | XVIII |
| RESUMEN..... | XIX |
| ABSTRACT | XX |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA..... | 1 |
| 3.2 JUSTIFICACIÓN | 2 |
| 3.3 OBJETIVOS..... | 5 |
| 3.3.1 Objetivo general..... | 5 |
| 3.3.2 Objetivo específico..... | 5 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4 MARCO TEÓRICO | 6 |
| 3.4.1 Familia Caricaceae | 6 |
| 3.4.2 Género Vasconcellea | 12 |
| 3.4.3 Vasconcellea stipulata Badillo | 21 |
| 3.4.4 Citogenética | 26 |
| 3.4.5 Softwares útiles para la caracterización cromosómica | 30 |
| 3.5 HIPÓTESIS | 31 |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 4.1 PARTICIPANTES | 32 |
| 4.2 FASE DE CAMPO-OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 32 |
| 4.3 FASE PRELIMINAR | 33 |
| 4.3.1 Instalación del material vegetal en condiciones de invernadero | 33 |
| 4.3.2 Muestreo en el invernadero | 34 |
| 4.4 FASE DE LABORATORIO | 37 |
| 4.4.1 FASE I: Estandarización de un protocolo para la observación de células radiculares metafásicas | 38 |
| 4.4.2 FASE II: Cálculos del índice mitótico y de la hora de mayor índice mitótico. | 43 |
| 4.4.3 FASE III: Caracterización cromosómica | 44 |
| CAPITULO 3: RESULTADOS | 50 |
| 5.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBSERVACIÓN DE CÉLULAS RADICULARES METAFÁSICAS | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 CÁLCULOS DEL ÍNDICE MITÓTICO Y DE LA HORA DE MAYOR ÍNDICE MITÓTICO..... | 59 |
| 5.3 NÚMERO CROMOSÓMICO..... | 63 |
| 5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS | 64 |
| 5.4.1 Modificaciones en el protocolo básico para una mejor observación de cromosomas metafásicos para la obtención del cariotipo..... | 64 |
| 5.4.2 Parámetros para la caracterización del cariotipo..... | 66 |
| 5.4.3 Obtención del cariotipo | 73 |
| 5.4.4 Obtención del ideograma..... | 75 |
| CAPITULO 4: DISCUSIÓN | 77 |
| 5.5 FASE PRELIMINAR..... | 77 |
| 5.5.1 Instalación del material vegetal en condiciones de invernadero..... | 77 |
| 5.5.2 Muestreo en el invernadero | 78 |
| 5.6 FASE DE LABORATORIO | 79 |
| 5.6.1 FASE I: Estandarización de un protocolo para la observación de células radicales metafásicas..... | 79 |
| 5.6.2 FASE II: Cálculos del índice mitótico y de la hora de mayor índice mitótico..... | 82 |
| 5.6.3 FASE III: Caracterización cromosómica..... | 84 |
| CAPITULO 5: CONCLUSIONES..... | 91 |
| CAPITULO 6: RECOMENDACIONES..... | 93 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 94 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica del jigacho (V. stipulata Badillo).</i> | 22 |
| Tabla 2. <i>Material necesario para proceder a la toma de muestras (meristemos radiculares a partir de plantas jóvenes aclimatadas en invernadero).</i> | 35 |
| Tabla 3. <i>Tratamientos a evaluar para la obtención del mejor protocolo que permita la visualización de células metafísicas de buena calidad a partir de meristemos radiculares de jigacho (V. stipulata).</i> | 38 |
| Tabla 4. <i>Preparación de soluciones para el pretratamiento de los meristemos radiculares.</i> | 39 |
| Tabla 5. <i>Preparación de la solución enzimática.</i> | 40 |
| Tabla 6. <i>Preparación de los diferentes tintes para la coloración de los cromosomas.</i> | 40 |
| Tabla 7. <i>Parámetros para la evaluación cuantitativa y cualitativa de la variable resolución y de la variable tinción analizadas.</i> | 42 |
| Tabla 8. <i>Valores de los niveles de resolución observados en los cromosomas metafásicos de 20 células en los doce tratamientos propuestos (1=muy baja, 2=baja,3=regular, 4=buena y 5= excelente).</i> | 50 |
| Tabla 9. <i>Valores de los niveles de tinción observados en los cromosomas metafásicos de 20 células en los doce tratamientos propuestos (1=muy baja ,2= baja, 3=regular ,4=buena 5= excelente).</i> | 51 |
| Tabla 10. <i>Células metafásicas observadas con los tres mejores tratamientos encontrados y valores promedio de la resolución y tinción de los cromosomas. 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmin, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína. ..</i> | 59 |

- Tabla 11.** *Células de V. stipulata en las distintas fases de división celular. Fotografías obtenidas con ocular de 10X y objetivo de 100X (magnificación total 1000X)..... 60*
- Tabla 12.** *Evaluación de los Índices de Fases(IF) e Índices Mitóticos(IM) Parciales desde las 6:00 hasta las 18:00 con intervalos de media hora. 61*
- Tabla 13.** *Parámetros proporcionados por el software MircroMeasure tras la medición de 35 células metafásicas. LT: longitud total del cromosoma, q: longitud del brazo largo, p: longitud del brazo corto, r: relación de brazos, CI: índice centromérico, LR: longitud relativa 67*
- Tabla 14.** *Mediciones promedio de las 35 células metafásicas de los 18 cromosomas totales. q: longitud brazo largo, p: longitud brazo corto, q+p: longitud total del cromosoma, q-p: diferencia longitud brazo largo y brazo corto, r: relación de longitudes de brazos. 69*
- Tabla 15.** *Mediciones promedio de las 35 células metafásicas de los 9 pares de cromosomas homólogos. q: longitud brazo largo, p: longitud brazo corto, q+p: longitud total del cromosoma, q-p: diferencia longitud brazo largo y brazo corto, r: relación de brazos y CI (%): índice centromérico 69*
- Tabla 16.** *Mediciones promedio de las longitudes relativas de las 35 células metafásicas en los 18 cromosomas totales: q (%): longitud relativa del brazo largo, p (%): longitud relativa del brazo corto, q+p (%): longitud relativa total de cada par cromosómico, Tipo: clasificación de cada cromosoma según la posición de su centrómero (m= metacéntrico)..... 70*
- Tabla 17.** *Mediciones promedio de las longitudes relativas en las 35 células metafásicas de los 9 pares de cromosomas homólogos. q: longitud relativa del brazo largo, p: longitud*

relativa del brazo corto, $q+p$: longitud relativa total de cada par cromosómico, r : relación brazo largo y brazo corto de cada par cromosómico, Tipo: clasificación de cada par cromosómico según la posición de su centrómero (m = metacéntrico). 70

Tabla 18. *Índices de asimetría promedio de las 35 células metafísicas analizadas proporcionadas por el software Karyotype Analysis 2.0 71*

Tabla 19. *Información adicional proporcionada por el software Karyotype Analysis 2.0..... 71*

LISTADO DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. <i>Niveles de asimetría en el cariotipo según Stebbins (1971).</i> | 29 |
| Cuadro 2. <i>Clasificación de los cromosomas según Levan et al. (1964).</i> | 47 |
| Cuadro 3. <i>Resultados de la prueba de Barlett (para la variable resolución (A) y la variable tinción (B), obtenidos con RStudio.</i> | 54 |
| Cuadro 4. <i>Resultados de la prueba de Kruskall-Wallis (para la variable resolución (A) y la variable tinción (B) obtenidos con RStudio.</i> | 55 |
| Cuadro 5. <i>Prueba Dunn aplicada en RStudio para la comparación entre todos los tratamientos realizados para la variable de resolución. Resultados de las 10 primeras comparaciones.</i> | 55 |
| Cuadro 6. <i>Prueba Dunn aplicada en RStudio para la comparación entre todos los tratamientos realizados para la variable de tinción. Resultados de las 10 primeras comparaciones.</i> | 56 |

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Inflorescencia de *V. pubescens* (chamburo) con tres tipos de flores: bisexual, masculinas y femeninas. 9
- Figura 2.** Cronograma de la familia Caricaceae obtenido mediante un modelo de reloj molecular aplicado a dos genes plásticos (matK y rbcL). 11
- Figura 3.** Densidad de las especies del género *Vasconcellea* en Latinoamérica. Las celdas más oscuras representan las zonas de mayor riqueza en especies (el color más oscuro indica 12 especies en la zona). 13
- Figura 4.** Diversidad en la forma de los frutos del híbrido *V. x heilbornii* A) Frutos de diferentes variedades de *V. x heilbornii*, B) Fruto del cultivar *V. x heilbornii* “Babaco” (Badillo) Badillo. 18
- Figura 5.** Cultivo de *V. x heilbornii* ‘Babaco’ en Baños de Agua Santa (Ecuador). 21
- Figura 6.** Distribución geográfica de *V. stipulata* en Sudamérica (Centro y Sur de Ecuador). ... 23
- Figura 7.** *Vasconcellea stipulata* Badillo) a) fruto, b) semilla, c) inflorescencia masculina, d) sección transversal de una flor femenina en un brote floral mostrando la corola y el ovario, e) estambres superiores e inferiores, f) hoja, h) flor femenina, gineceo o pistilo de la flor femenina, i) detalle de la conexión abxial entre peciolo y hoja, j) corte transversal del fruto, k) vista lateral del fruto. 25
- Figura 8.** Vivero de Patate (Tungurahua, Ecuador) de donde se adquirieron las plantas de jigacho (*V. stipulata*) para el desarrollo de la presente investigación. 32
- Figura 9.** Plantas de jigacho mantenidas bajo condiciones de invernadero con su respectivo etiquetado para su registro y monitoreo. 33

| | |
|--|----|
| Figura 10. Estimulación del enraizamiento. A) Enraizantes utilizados en soluciones para el riego de las plantas de jigacho, B) Planta de jigacho con un gran volumen radicular después de la aplicación de los enraizantes. | 34 |
| Figura 11. Material preparado para el muestreo en el invernadero de los meristemos radiculares de jigacho (bloques de hielo, cooler, agua destilada, guantes, pinzas, bisturí, vidrio reloj, frasco vacío, papel toalla). | 35 |
| Figura 12. Raíces tomadas para los análisis citogenéticos. A) Raíces cortadas de la planta con la ayuda de unas pinzas de punta fina. B) Raíz con características óptimas para los análisis posteriores (observada bajo un estereoscopio). | 37 |
| Figura 13. Preparación del squash con los meristemos ya teñidos. A) Corte del ápice del resto de la raíz, B) aplastamiento del tejido meristemático con la ayuda de un borrador de un lápiz. | 41 |
| Figura 14. Ventana de trabajo de MicroMeasure 3.0 donde se señalan las mediciones que el software puede proporcionar tras haber realizado las mediciones de los cromosomas metafísicos (por placa). | 45 |
| Figura 15. Ventana de trabajo de Karyotype Analysis 2.0 donde se señalan los resultados y datos que el software puede proporcionar tras haber realizado las mediciones de los cromosomas metafísicos (por placa). | 46 |
| Figura 16. Análisis estadístico de la normalidad de la variable resolución A) gráfico de densidad, B) histograma, C) gráfico Q-Q normal, D) Valor-p de la prueba de normalidad con Shapiro-Wilk. | 52 |
| Figura 17. Análisis estadístico de la normalidad de la variable tinción. | 53 |

- Figura 18.** Diagrama de cajas obtenido con los datos de la variable resolución. 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmín, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína. 57
- Figura 19.** Diagrama de cajas obtenido con los datos de la variable tinción. 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmín, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína. 57
- Figura 20.** Índice mitótico parcial (% IM) de células del tejido meristemático radicular en jigacho calculado a diferentes horas del día. 62
- Figura 21.** Índice de fase para metafase (% IFm) de células del tejido meristemático radicular en jigacho calculado a diferentes horas del día. 63
- Figura 22.** Células metafásicas de meristemos radicales de jigacho donde se observa que el número cromosómico de la especie es de $2n=2x=18$ 63
- Figura 23.** Diferencias en las células meristemáticas al variar las horas de digestión enzimática. Tratamiento con 2 horas en enzimas (37°C) A), células tratadas con 4 horas de digestión enzimática (37°C) B). 64
- Figura 24.** Diferencias en las células al añadir un tratamiento hipotónico después de la digestión enzimática. Células sin tratamiento hipotónico A), células con tratamiento hipotónico (KCl 75 mM, 30 min) B). 65
- Figura 25.** Diferencias en la dispersión de los cromosomas metafásicos. Placa realizada sin aplicación de vapor A), placa realizada con la adición de vapor por 10s, B). 65
- Figura 26.** Primera célula metafásicas analizada en MicroMeasure versión 3.3. (Los círculos rojos marcan el centrómero observado en los cromosomas mientras que las líneas azules marcan la longitud de ambos brazos de los cromosomas). 66

- Figura 27.** Primera célula metafásica analizada en Karyotype Analysis 2.0 (Los círculos rojos marcan el centrómero observado en los cromosomas mientras que las líneas azules marcan la longitud de ambos brazos de los cromosomas). 68
- Figura 28.** Ideograma obtenido con el software Karyotype Analysis 2.0 después realizar las mediciones de los cromosomas de unas de las fotos de las células metafásicas obtenidas..... 73
- Figura 29.** Placa metafásica con cromosomas altamente condensados utilizada para la elaboración del cariotipo. 74
- Figura 30.** Cariotipo del jigacho (*V. stipulata*) con los pares homólogos cromosómicos($2x=2n=18$)..... 74
- Figura 31.** Ventana de trabajo del programa computacional DRAWID con las herramientas que ofrece para la medición de los cromosomas y la elaboración del ideograma. 75
- Figura 32.** Ideograma del jigacho (*V. stipulata*) representado por los con 18 cromosomas totales del set (barra=2 μ m). 75
- Figura 33.** Ideograma del jigacho (*V. stipulata*) representado por los nueve pares de cromosomas homólogos (barra= 2 μ m)..... 76

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| μm : micras | CVCI: coeficiente de variación del índice centromérico |
| °C: grados centígrados | CVCL: coeficiente de variación de la longitud cromosómica |
| h: horas | Ask (%): índice de asimetría (Arano,1963) |
| s: segundos | TF (%): porcentaje de la forma total |
| ml: mililitros | Ysi: índice de simetría del cariotipo |
| cm: centímetros | Rec: índice de similitud en el tamaño de los cromosomas |
| am: hora de la mañana | A1: índice de asimetría intracromosómica |
| q: longitud brazo corto | A2: índice de asimetría intercromosómica |
| p: longitud brazo largo | A: asimetría del cariotipo |
| KCl: cloruro de potasio | D1: índice de dispersión |
| LT: longitud total del cromosoma | UPGMA: método de grupo de pares no ponderados con media aritmética |
| r: relación de brazos | mM: milimolar |
| CI: índice centromérico | M: molar |
| IF: índice de fases | |
| IM: índice mitótico | |
| TCL: longitud total del set cromosómico | |
| THL: longitud total haploide | |
| MCA: asimetría centromérica promedio | |

RESUMEN

Una gran parte de las especies del género *Vasconcellea* presentan excelentes características como resistencia a fitopatógenos o buenas propiedades organolépticas del fruto de gran interés para programas de mejoramiento genético en especies cultivables tales como *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo ('Babaco') o incluso de la papaya común, *Carica papaya*. La especie *Vasconcellea stipulata* Badillo (jigacho), además de poseer dichas características ha sido reportada junto con *Vasconcellea pubescens* (chamburo) como los posibles parentales del babaco, uno de los cultivos de gran importancia económica en Ecuador. Conocer las características citogenéticas de estas tres especies permitirá entender su historia evolutiva y establecer las bases para programas de mejoramiento en el cultivo de babaco. El objetivo del presente trabajo de investigación fue realizar un estudio citogenético mediante la técnica de aplastamiento o "squash" de tejido meristemático obtenido a partir de raíces jóvenes de *V. stipulata* para obtener el cariotipo detallando las características morfológicas de los cromosomas. Además, se determinaron otros aspectos citogenéticos como el ideograma, número cromosómico y hora mitótica. El protocolo básico para la observación de cromosomas metafásicos incluyó un pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína 0.002 mM, fijación con etanol: ácido propiónico (3:1), digestión enzimática con pectinasa 20% y celulasa 2% y tinción con lacto-propiono-orceína. En cuanto a los resultados obtenidos se encontró que: a) la hora de mayor índice mitótico fue a las 07:30 de la mañana, b) se trata de una especie diploide con un número cromosómico $2n=2x=18$, c) el tamaño de los cromosomas se encuentra entre $2.44-1.27\mu$ y el tamaño total del set cromosómico fue de 33.38μ , d) todos los cromosomas fueron clasificados como metacéntricos ya que el índice centromérico se encontró dentro del rango: 40.1-50 y d) los índices de asimetría como TF (46.66 %), índice Sy_i (87.54) e índice Rec (75.89) indican que se trata de un cariotipo simétrico.

Palabras clave:

- **ÍNDICE MITÓTICO**
- **CARIOTIPO**
- **VASCONCELLEA**
- **ÍNDICE CENTROMÉRICO**
- **SQUASH**

ABSTRACT

A large part of the species of the genus *Vasconcellea* has excellent characteristics such as resistance to phytopathogens or good organoleptic properties of the fruit of great interest for breeding programs in cultivable species such as the case of *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo ('Babaco') or even of the common papaya, *Carica papaya*. The species *Vasconcellea stipulata* Badillo (jigacho), besides having these characteristics, has been reported together with *Vasconcellea pubescens* (chamburo) as the possible parents of babaco, one of the crops of great economic importance in Ecuador. Knowing the cytogenetic characteristics of these three species will allow us to understand their evolutionary history and establish the bases for breeding programs for babaco. The objective of this research was to perform a cytogenetic study using the crushing technique or "squash" of meristematic tissue obtained from young roots of *V. stipulata* to obtain the karyotype detailing the morphological characteristics of the chromosomes. In addition, other cytogenetic aspects were determined, such as the ideogram, chromosome number and mitotic hour. The basic protocol for the observation of metastatic chromosomes included a pretreatment with 0.002 mM 8-hydroxyquinoline, fixation with ethanol: propionic acid (3: 1), enzymatic digestion with pectinase 20% and cellulase 2% and staining with lacto-propiono-orcein. Regarding the results obtained, it was found that: a) the hour of highest mitotic index was at 07:30 in the morning, b) it is a diploid species with a chromosome number $2n = 2x = 18$, c) the size of the chromosomes is between $2.44-1.27\mu$ and the total size of the chromosomal set was 33.38μ , d) all the chromosomes were classified as metacentric since the centromeric index was found within the range: 40.1-50 and d) the indexes of Asymmetry such as TF (46.66%), Syi index (87.54) and Rec index (75.89) indicate that it is a symmetric karyotype.

Key words:

- MITOTIC INDEX
- KARYOTYPE
- VASCONCELLEA
- CENTROMERIC INDEX
- SQUASH

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

2.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ecuador es un país con una alta densidad en especies del género *Vasconcellea* perteneciente a la familia Caricaceae (Kyndt et al. 2005). Las especies de dicho género son de importancia en varios aspectos. Existen especies que producen frutos comercialmente demandados como el híbrido natural *Vasconcellea x heilbornii* ('Babaco'). En otras especies se han detectado características que pueden ser transferidas al babaco para reducir los problemas fitosanitarios, mayor tolerancia a temperaturas bajas y mejorar las propiedades organolépticas. Muchas de estas especies además son una gran fuente de papaína, una enzima de gran importancia industrial (Guerrero & Castro, 1999). En *V. stipulata* se ha comprobado que la actividad enzimática de la papaína es 17 veces mayor a la enzima extraída de *Carica papaya* (Scheldeman, 2002).

A pesar de la importancia mencionada es muy reducido el conocimiento genético, taxonómico y filogenético que se tienen de estas especies de *Vasconcellea* (Kyndt et al., 2005). A diferencia de *Carica papaya*, una fruta tropical internacionalmente comercializada, *V. x heilbornii* a pesar de su potencial comercial, no ha sido ampliamente estudiado. En Ecuador, el babaco es nacionalmente comercializado a gran escala, sin embargo, no se conoce aún con certeza su verdadero origen y su historia evolutiva que permitan tener conocimiento de sus parentales más cercanos para el desarrollo de programas de mejoramiento (Ming & Moore, 2015).

Se presume que el babaco es un híbrido natural procedente del cruce entre *V. stipulata* y *V. pubescens*. Esto resulta en una especie estéril con un fruto partenocárpico que solo puede

propagarse vegetativamente. La mayor desventaja resulta en que al no existir una variabilidad genética en las plantas los problemas fitosanitarios aumentan e impiden que la producción a nivel nacional crezca (Alvarez & Cornejo, 2017).

V. stipulata, uno de los potenciales padres del babaco, presenta características de interés como la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp *caricae* (Freire, 2015) (principal patógeno fúngico que más daño causa en los cultivos de babaco (Garcés et al., 2001)) entre otras. No existen estudios citogenéticos aún de esta especie que podría ayudar al entendimiento del origen del babaco y sobretodo permitir realizar mejoramientos en este después de tener claro el parentesco evolutivo con *V. stipulata*.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Vasconcellea stipulata Badillo denominado “papaya de montaña” o jigacho se distribuye por las zonas del sur del Ecuador y en Perú se la encuentra en los departamentos del norte del país. No suele ser cultivada en grandes cantidades por lo que generalmente las plantas de jigacho se encuentran como árboles individuales o en pequeñas agrupaciones en las zonas agrícolas de estas tierras andinas (Foronda, 2011).

Esta especie de *Vasconcellea* tiene muchas características que deben ser ampliamente aprovechadas en el área industrial y nutritiva. En ciertos lugares, sobre todo los propios lugareños, consumen y comercializan el fruto como conservas, en almíbar o confitados aprovechando las excelentes características organolépticas que posee (Cossio, 1988). También se le puede dar una gran utilidad industrial debido a las grandes concentraciones de papaína que se pueden obtener de

estas plantas (Kyndt et al., 2007). La papaína es una enzima de gran utilidad en la industria farmacéutica para el desarrollo de medicamentos para tratar tumores, aterosclerosis, tratamiento de úlceras en el tracto digestivo, problemas de funcionamiento del hígado, entre otras. Además, al ser también un agente antiinflamatorio es usado para casos de infección y trauma (Aravin et al., 2013).

Por otro lado, *V. stipulata* aún no ha sido estudiada genéticamente con mayor detalle, pero son plantas que pueden resultar ser una gran fuente de genes para aumentar la variabilidad y productividad en otros cultivos. Esto es debido principalmente a la gran resistencia que presentan frente a problemas sanitarios que afectan a otras especies cultivadas (Coppens, 2003).

El cultivo de jigacho adicionalmente juega un papel importante en la producción de babaco en Ecuador. El babaco, fruto de *Vasconcellea x heilbornii*, es de gran importancia comercial en el país y supone una fuente de ingresos económica importante para muchos agricultores dedicados a su cultivo. Sin embargo, al tratarse de una planta infértil su propagación es vegetativa y clonal mediante esquejes o injertos (Muñoz, 1987) haciendo que todo el cultivo sea más vulnerable a enfermedades fitosanitarias.

Una de las enfermedades más dañinas para el cultivo del babaco es la fusariosis, provocada por el hongo *Fusarium oxysporum* (Garcés et al., 2001) y que resulta en grandes pérdidas económicas para los agricultores. Una gran solución para este problema es aumentar el cultivo del jigacho (*Vasconcella stipulata*) que por ser una planta resistente al ataque de *Fusarium oxysporum*, resulta en un excelente portainjertos para el babaco.

La propagación mediante injertos consiste en unir dos partes de tejido vivo que se desarrollan conjuntamente. El primer tejido se trata del portainjertos el cual es la base que

desarrollará el sistema radicular y cuya principal característica es presentar resistencia a enfermedades. En segundo lugar, está el injerto (generalmente yemas libres de enfermedades y de las cuales se quieran propagar su cultivo) que se coloca en la base del portainjerto (Valentini, 2003).

Dentro de las características que hacen del jigacho un excelente portainjertos para el babaco se encuentran en su resistencia a nemátodos y plagas en general, como el caso del perjudicial fusarium y además no necesita condiciones de suelo muy específicas para su crecimiento (Valencia, 2014). A pesar de dichas propiedades existe una escasez de plantas madre de jigacho por lo que su baja disponibilidad impide cubrir todas las necesidades para la selección y posterior propagación del babaco. Por otro lado, el jigacho es difícil de propagarlo debido a que no produce semillas viables de calidad ni cantidad. Las formas más fáciles para su propagación suele ser mediante brotes herbáceos o propagación por meristemas, siendo la primera opción la más factible técnica y económicamente (Cevallos & Ramos, 1990).

En cuanto a la historia evolutiva del babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) este se cree que es un híbrido natural entre el jigacho (*Vasconcellea stipulata*) y el chamburo (*Vasconcellea pubescens*), pero aún no se han realizado estudios comparativos de sus cariotipos para confirmarlo genéticamente (Rivera & Jadan, 2010). Llegar a conocer la genética de cada una de estas tres especies permitirá no solo confirmar esta hipótesis de la hibridización sino además iniciar programas de mejoramiento con intercambio de genes para la obtención de especies más resistentes a enfermedades y de mayor producción comercialmente (Morales & Morales, 2006).

De los pocos estudios filogenéticos y taxonómicos que se han realizado sobre las especies de *Vasconcellea* han sido principalmente por el interés de realizar mejoramientos en la papaya

común introduciendo características de sus parientes silvestres. Sin embargo, a pesar de poseer el mismo número cromosómico y un tamaño similar del cariotipo las hibridaciones entre *C. papaya* y especies del género *Vasconcellea* no se producen fácilmente (Aradhya et al.,1999).

Muchas especies del género *Vasconcellea* que se han explorado en Ecuador no han sido aún caracterizadas taxonómicamente. Una de las dificultades que se presentan es que muchas de estas especies podrían ser híbridos naturales intraespecíficos por lo que estudios sobre el genotipo y cariotipo de estas plantas podrían clarificar esas dudas taxonómicas dentro de este género (Kyndt, 2004).Es necesario profundizar los estudios en estas especies debido al gran potencial que presentan sus características de resistencia a enfermedades fitosanitarias, resistencia a climas frío o por las características de los frutos , de interés comercial.

Conocer la historia evolutiva del jigacho, chamburo y de su híbrido babaco no solo permitirá entender y esclarecer el origen del babaco. Sino que además podrían realizarse programas de mejoramiento en donde las características deseadas de los posibles parentales pueden introducirse en el babaco obteniéndose mejoras en los cultivos que se transformaría en un auge la comercialización y producción de babaco en el país.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Determinar el cariotipo de jigacho (*Vasconcellea stipulata* Badillo) mediante técnicas citogenéticas.

2.3.2 Objetivo específico

- ❖ Obtener un protocolo para la visualización de cromosomas metafásicos en *Vasconcellea stipulata*.

- ❖ Determinar el número cromosómico de *Vasconcellea stipulata* mediante observación por microscopía óptica.
- ❖ Medir la longitud total, longitud de los brazos de los cromosomas, la proporción de los brazos y el índice centromérico para su organización y clasificación.

2.4 MARCO TEÓRICO

2.4.1 Familia Caricaceae

2.4.1.1 Generalidades

La familia Caricaceae está formada por 6 géneros y un total de 35 especies (Badillo, 2000). Los géneros que conforman esta familia son *Carica* (1 especie), *Jarilla* (3 especies), *Horovitzia* (1 especie), *Cylicomorpha* (2 especies), *Jacaratia* (7 especies), y *Vasconcellea* (21 especies) (Badillo, 1971).

Cylicomorpha es el único género de la familia Caricaceae que se encuentra ubicado en bosques húmedos premontanos del continente africano. Las dos especies pertenecientes a este género son *Cylicomorpha solmsii*, (en el oeste de África) y *Cylicomorpha parviflora* (en el este del continente). Ambas especies tienen la característica de ser árboles de gran tamaño (Ming & Moore, 2015).

Los demás géneros se encuentran en Sur y Centroamérica. De ellos *Vasconcellea* es el género más grande de la familia que abarca 20 especies y adicionalmente un híbrido natural, *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo “Babaco”. La distribución de estas especies tiene una concentración elevada en zonas del noroeste de Sudamérica como Ecuador, Perú y Colombia.

Jacaratia es el segundo género más grande dentro de la familia con un total de 7 especies arbóreas situadas principalmente en las zonas bajas de los neotrópicos (Antunes & Renner, 2012).

Por último, *Horovitzia* y *Jarilla* son especies herbáceas de los bosques tropicales de México. La única especie perteneciente al género *Horovitzia* es *H. cnidoscoloides* ubicada expresamente en la Sierra Suárez en México (Lorence & Colin, 1988). Sus árboles son de contextura delgada y pueden alcanzar los 6 metros de altura. Los tallos son esponjosos y con una cobertura de pelos urticantes (Antunes & Renner, 2012).

En un inicio dentro del género *Carica* se incluían las papayas de alta montaña (*Vasconcellea*) junto con la papaya común (*Carica papaya*), sin embargo, bajo evidencia morfológica y genética (Aradhya et al., 1999) este género fue dividido en dos dejando el género *Carica* con tan solo una especie y el género *Vasconcellea* con un total de 21 especies (Badillo, 2000). Además, recientes estudios taxonómicos fueron los que mediante pruebas moleculares determinaron la existencia de distancias genéticas grandes entre la papaya y las especies silvestres del género *Vasconcellea* (Jobin-Décor, 1996).

Mediante estudios filogenéticas y moleculares se determinó que *C. papaya* tiene un clado hermano formado por especies originarias de México y Guatemala. Tres de las especies son herbáceas pertenecientes al género *Jarilla* y la última se trata de la especie *Horovitzia cnidoscoloides*. Este resultado desconcertó a los agricultores e investigadores, los que por años habían realizado sin grandes éxitos programas de mejoramiento de la papaya con especies del género *Vasconcellea* (Antunes, 2015). De este modo queda claro que, a pesar de la gran similitud morfológica entre ambos géneros, *Vasconcellea* no es el pariente más cercano de *Carica*.

Esta separación de los dos géneros ha permitido analizar el género *Vasconcellea* independientemente y descubrir que tiene un gran potencial productivo que incluso podría llegar a competir en el mercado con la papaya, no solo mediante sus frutos sino también con la producción de látex y productos de uso médico e industrial (Ming & Moore, 2015). Dichos estudios moleculares además han demostrado que el género más cercano al de *Vasconcellea* es *Jacaratia* (Van Droogenbroeck , 2006) mientras que los más cercanos a *Carica* son *Horovitzia* y *Jarilla*, mencionados anteriormente (Carvalho & Renner, 2013).

2.4.1.2 Cromosomas y polimorfismos sexuales.

En *C. papaya* el sexo de las plantas está determinado por cromosomas sexuales morfológicamente similares a los cromosomas autosómicos. Gracias a las técnicas de secuenciación ha sido posible determinar en la papaya común, la existencia de una región no recombinante asociada al sexo masculino en los cromosomas Y (Gschwend, 2012). En papaya se encuentran tres individuos diferenciados sexualmente, plantas masculinas, femeninas y hermafroditas. Las plantas femeninas presentan dos cromosomas X , las masculinas tienen un cromosoma X y uno Y, y las hermafroditas (árboles machos con flores femeninas fértiles) se han encontrado cromosomas Y con pequeñas diferencias a los cromosomas de las plantas masculinas puras, los cuales han sido denominados Yh (Liu, 2004). La región específica de los cromosomas masculinos puros comparten un porcentaje alto de similitud (98,8%) con los cromosomas de las plantas hermafroditas Yh (Zhang, 2008). Este sistema de cromosomas sexuales XY se ha encontrado en otras especies de la familia como *Vasconcellea goudotiana*, *V. pubescens* , *V. parviflora* y *V. pulchra* sin embargo, en ninguna de ellas se han reportado cromosomas hermafroditas (Wu & Wang, 2010).

Este polimorfismo sexual es de importancia a la hora de la comercialización de los frutos ya que su cantidad y la calidad están directamente influenciadas por el genotipo sexual de la planta. En general son preferidas las plantas femeninas puesto que la calidad de los frutos que producen es mayor. En el caso de *C. papaya* son preferidas las plantas hermafroditas por producir frutos con una forma comercialmente deseada (Tamaki, 2011).

En estudios de *V. pubescens*, cultivada a mediana escala en Chile, se ha visto la presencia de plantas dioicas, monoicas (que presentaban inflorescencias masculinas, femeninas y bisexuales). Se encontró que los factores que principalmente afectan a la expresión sexual de las flores de *V. pubescens* son las condiciones climáticas (Salvatierra, 2015).

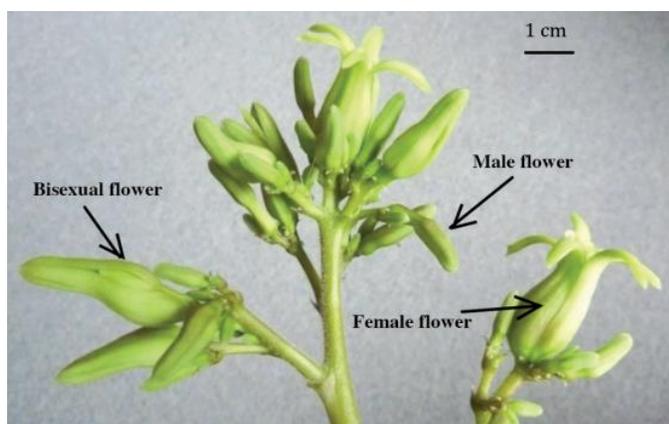


Figura 1. Inflorescencia de *V. pubescens* (chamburo) con tres tipos de flores: bisexual, masculinas y femeninas.

Fuente: (Salvatierra, 2015)

2.4.1.3 Origen y dispersión de las especies de Caricaceae.

Diversos análisis moleculares y filogenéticos se han realizado en la familia Caricaceae entre ellos los estudios de Aradhya et al. en 1999 con RFLPs, Olson en 2002 con ITS nucleares y secuencias plastídicas y Kyndt et al. en 2005 con AFLPs entre otros trabajos. A pesar de los

esfuerzos e investigaciones realizadas los estudios no abarcaban una proporción significativa de todos los géneros presentes en la familia, por lo que aún las relaciones evolutivas dentro de la familia permanecían inciertas y confusas (Antunes & Renner, 2012).

Atunes F. y Renner S. en 2013 realizaron un estudio exhaustivo de la historia evolutiva de la familia Caricaceae basándose en secuencias génicas de todos los géneros y especies. Mediante análisis bayesianos de máxima verosimilitud (ML) se pudieron estimar las relaciones evolutivas y filogenéticas entre las especies

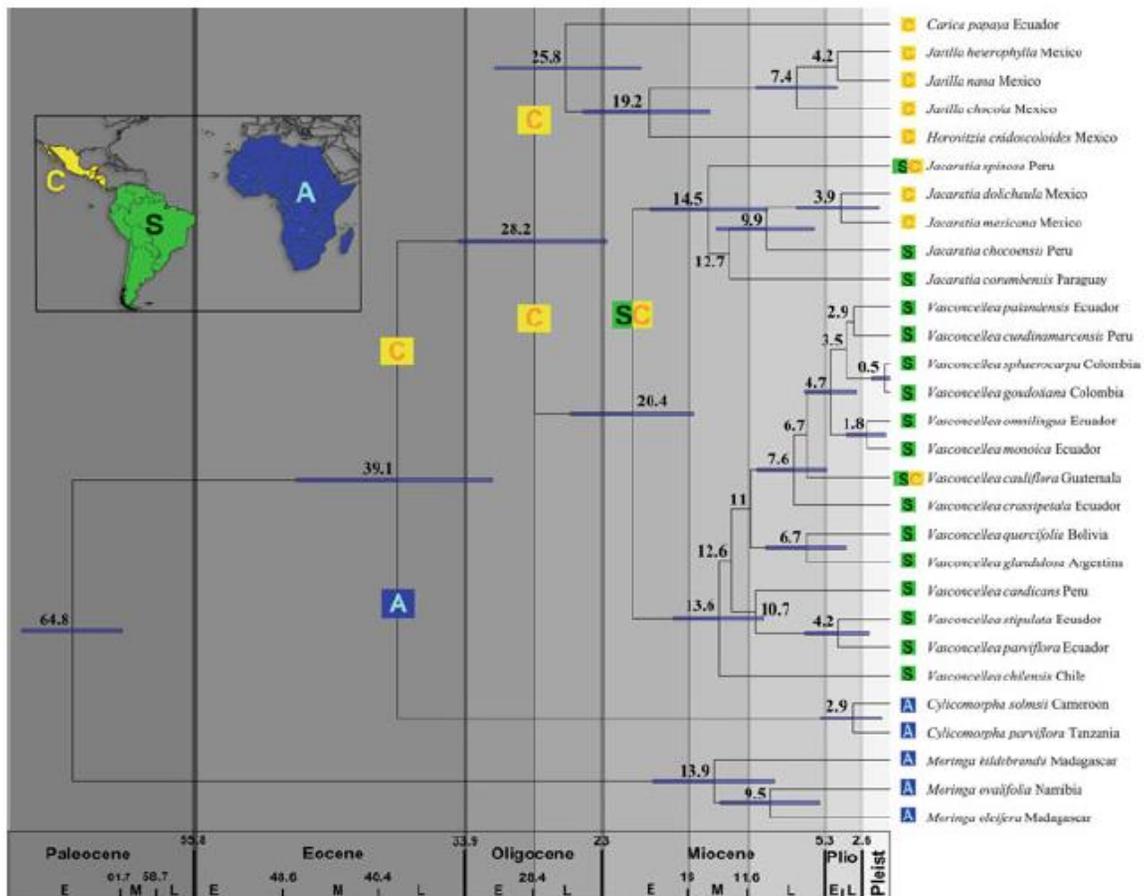


Figura 2. Cronograma de la familia Caricaceae obtenido mediante un modelo de reloj molecular aplicado a dos genes plásticos (*matK* y *rbcL*).

Fuente: (Antunes & Renner, 2012)

Mediante la aplicación de un reloj molecular se llegó a determinar que el origen de Caricaceae está en el continente africano. Este dato tiene lógica teniendo en cuenta que la familia hermana de Caricaceae, Moringaceae es una familia con 13 especies arbóreas y arbustivas distribuidas por el continente africano y parte de Asia tropical. El punto de mayor divergencia en la familia Caricaceae es la separación entre las especies africanas y el resto de especies del neotrópico, evento que tuvo lugar en el Mioceno tardío alrededor de 35,5 Ma atrás (Antunes & Renner, 2012).

Tras una reconstrucción geográfica realizada mediante análisis estadísticos se presume que el antepasado de las especies neotropicales de la familia Caricaceae llegaron primero a América Central desde donde se fueron esparciendo hasta Sudamérica hace 27 -19 Ma atrás.

La formación de los Andes tuvo lugar en dos periodos del tiempo, hace unos 23 Ma atrás y con un nuevo evento hace 12 Ma. (Hoorn & Wesselingh, 2010). Esto explica que durante este periodo el clado *Vasconcellea/Jacaratia* comenzó a tener una gran diversificación. *Jacaratia* se especió durante climas muy secos y en una vegetación menos densa, características que predominaban en el Mioceno tardío hace unos 12-7 Ma años atrás (Pound & Haywood, 2011). *Vasconcellea* por otro lado, se diversificó en los Andes nortes en latitudes entre 700 y 2600 msnm (Scheldeman & Willemen, 2007).

2.4.2 Género *Vasconcellea*

2.4.2.1 Generalidades

El género *Vasconcellea* es el más grande dentro de la familia Caricaceae conformado por 21 especies de las 35 en total pertenecientes a la familia. Hace unos años, este género era parte del género *Carica* pero recientemente fue separado como un género independiente (Badillo, 2000). Según la clasificación de Badillo 2001 dentro del género *Vasconcellea* existen 21 especies incluido un híbrido natural (*Vasconcellea x heilbornii*) que a pesar de que carece de reproducción sexual es considerado como una especie más.

2.4.2.2 Distribución geográfica

Las especies del género *Vasconcellea* se encuentran en las altas montañas andinas desde Colombia hacia Perú con una mayor concentración en el sur de Ecuador y norte de Perú. En Ecuador con gran diferencia es el país que más riqueza en especies de *Vasconcellea* presenta. El país acoge 16 de las 21 especies totales, siendo Loja la provincia donde crecen 7 de especies de las antes mencionadas (Droogenbroeck & Kyndt, 2004). En segundo lugar se encuentra Colombia y Perú con nueve especies (Scheldeman, 2006).



Figura 3. Densidad de las especies del género *Vasconcellea* en Latinoamérica.

Nota: Las celdas más oscuras representan las zonas de mayor riqueza en especies (el color más oscuro indica 12 especies en la zona).

Fuente: (Scheldeman, 2006)

En la parte noroeste de los Andes se observa una gran diversidad de especies de *Vasconcellea*. En Ecuador tan solo las provincias del sur (El Oro, Loja y Zamora-Chinchipec) tienen 12 de las 21 especies existentes (Scheldeman, 2006).

Vasconcellea es un género silvestre pero el ser humano ha sabido domesticar algunas de sus especies incluso en lugares lejanos a su punto de origen. Estas especies tienen la capacidad de retornar a su vida silvestre en cualquier momento, poblando de manera no invasiva las zonas a sus alrededores ya que no son consideradas especies invasoras (Scheldeman & Willemen, 2007). Además, cinco de las especies de este género se encuentran en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos

Naturales (UICN): *V. horovitziana*, *V. omnilingua*, *V. palandensis*, *V. pulchra* y *V. sprucei* (UICN, 2003). Según confesiones de los pobladores existen aún más especies amenazadas debido a la deforestación y destrucción del hábitat que aún no han sido reportadas (IUCN , 2004). Estudios más profundos de su distribución geográfica, diversidad y adaptación ambiental servirían en la conservación de estas especies, sobre todo las que más amenazadas se encuentran (Scheldeman, 2006).

2.4.2.3 Morfología

Las especies del género *Vasconcellea* son silvestres, algunas domesticadas o semidomesticadas. Las plantas generalmente son dioicas (19 especies) , pero en ocasiones se pueden encontrar individuos monoicos (*V. monoica*) o que presenten poligamia (*V. pubescens*) (Muñoz, 1988).

En cuanto a los tallos estos suelen ser simples, no presentan grandes ramificaciones y algunos pueden encontrarse cubiertos con estructuras espinosas en su superficie. Las hojas en la gran mayoría de las especies tienden a concentrarse en la corona terminal de la planta y suelen ser de gran tamaño, sin embargo, en cuanto a la forma pueden ser tanto compuestas como enteras. Todos los órganos de la planta se caracterizan por secretar un látex de color blanco que las caracteriza. Las flores pueden ser de varios colores (blancas, verdes, amarillas, naranjas o rosadas) y con cinco pétalos. El fruto es una baya cuyas características varían según la especie a la que pertenece (Badillo, 1993). Generalmente son de menor tamaño que los de la papaya, menos succulentos y con un sabor característico diferente (National Research Council, 1989).

Frecuentemente se denominan “papayas de montaña” o “papayas de altura” ya que las plantas son morfológicamente parecidas con la de la papaya común (*C. papaya*) pero crecen a elevadas altitudes.

2.4.2.4 Importancia económica

Existen especies como *V. cauliflora*, *V. goudotiana* y *V. quercifolia* que presentan características llamativas para ser utilizadas en mejoramientos genéticos de la papaya como que poseen frutos con una piel más suave, una pulpa más firme y sobre todo resistentes a un gran número de enfermedades (Van Droogenbroeck et al., 2004).

Gran cantidad de las especies e híbridos de la familia Caricaceae se originan y concentran en las zonas andinas. Estas presentan características de gran interés económicamente. Por un lado, presentan un alto grado de variabilidad genética de utilidad para mejoramiento vegetal. Muchas de las especies además presentan resistencia a distintos agentes fitopatógenos como los virus y se vuelven buenos candidatos para cruzamientos interespecíficos que generen híbridos resistentes. Otros miembros pueden aportar genes resistentes al frío de gran interés para ser utilizados en la expansión de áreas cultivadas en otro tipo de ambientes (SCCH, 2009).

Los programas de mejoramiento están basados en hibridación intraespecífica sin embargo, importantes estudios se han venido llevando a cabo en donde la transferencia de los genes resistentes a enfermedades desde las especies silvestres a la forma cultivada de la papaya en ninguno de los casos es posible sin un proceso posterior de rescate del embrión (Magdalita & Adkins, 1996). Por este motivo, se hace necesario conocer las distancias genéticas entre las formas silvestres y las formas cultivadas para así poder predecir el éxito o fracaso de la hibridación (Santana, Freitas, Correa, da Costa, & Messias, 2014).

Si se llegara a explotar las especies de *Vasconcellea* se abriría un importante mercado comercial en la agroindustria no solo mediante la venta de sus frutos que pueden aparecer en distintas presentaciones (frescos, jugos, conservas, mermeladas, etc.) sino también por sus enzimas proteolíticas (papaína) contenidas en el látex de sus troncos y que resultan útiles en distintas áreas desde la farmacéutica hasta la alimenticia. Además, podría exportarse como una gran fuente de genes portadores de resistencia a enfermedades a países que no poseen una variabilidad genética tan grande en sus cultivos de papaya, útiles en programas de mejoramiento genético (Copens, 2003).

Con programas de cruzamiento bien estudiados y planificados podrían ser aprovechadas muchas características de las especies de *Vasconcellea*. Entre ellas se encuentra la gran capacidad proteolítica del cruce *V. stipulata* x *V. monoica* (Horovitz & Jiménez, 1967) , alto contenido de azúcar en los frutos de *V. quercifolia* (Drew, 1998) , resistencia al frío en *V. pubescens* (Horovitz & Jiménez, 1967) y resistencia a la sequía de *V. chilensis* (Warmke, 1954).

2.4.2.5 Hibridación natural entre especies de *Vasconcellea*

La hibridación natural es un importante evento en la evolución de las plantas. Aproximadamente entre un 30-70% de todas las especies de plantas con flores han tenido procesos de hibridación en su historia filogenética (Soltis & Soltis, 2009).

El nivel de la barrera de aislamiento reproductivo entre especies influye en la probabilidad de formar un híbrido y en la integridad genética de una determinada especie (Coyne & Orr, 2004). Estas barreras reproductivas pueden estar presentes antes del apareamiento, después del apareamiento (antes de que se forme el cigoto) y después de la formación del cigoto. Para el estudio de las consecuencias de la existencia de estas barreras es importante aplicar varias ramas científicas

como la morfometría , la genética de poblaciones , la citogenética y ensayos reproductivos manuales que permitan identificar los procesos de flujo de genes intraespecíficos (Wendt, 2001).

Existe una gran diversidad en el género *Vasconcellea* que puede ser debida a la intercompatibilidad existente entre varias de las especies que lo constituyen (Jiménez & Horivitz, 1957). Esto da lugar a que en las zonas donde coexistan diferentes especies se dé la formación de híbridos con diferentes niveles de fertilidad (Badillo, 1971).

Horovitz y Jiménez (1967) y Badillo (1971) reconocieron dos híbridos naturales entre las especies de *Vasconcellea*. *V. x heilbornii* que se trata del híbrido natural más importante reconocido en el género de *Vasconcellea* cuyos parentales se presume son *Vasconcellea stipulata* Badillo y *Vasconcellea pubescens* Badillo. Por otro lado, se encuentra un híbrido que se da únicamente en ciertas ocasiones fruto de los cruces entre *V. monoica* y *V. pubescens*.

Dentro de la especie *V. x heilbornii* se conocen además algunas variedades (notomorfos) (Badillo, 1993). La más conocida es el cultivar “Babaco” y dos variedades *chrysopetala* y *fructifragrans*. Esto fue confirmado recientemente por un estudio etnobotánico de *Vasconcellea* spp. en el sur de Ecuador (Scheldeman, 2002). El autor observó una amplia variabilidad de los caracteres morfológicos entre los genotipos de *V. x heilbornii* no descritos y reportó dificultades para distinguir *V. x heilbornii* de *V. stipulata* (Scheldeman, 2002). Tales variaciones morfológicas entre los híbridos sugieren eventos de hibridación entre especies repetidos.

Se presume que existen algunas variedades más que no se han sido descritas aún. *Vasconcellea x heilbornii* cv *chrysopetala* comúnmente denominada chihualcán es una variedad del híbrido igualmente originado del cruce entre *V. stipulata* y *V. pubescens*. Como el resto de las

especies de *Vasconcellea* se encuentra en la región interandina siendo la provincia de Loja en Ecuador su lugar de origen (Yaguache, 2003).

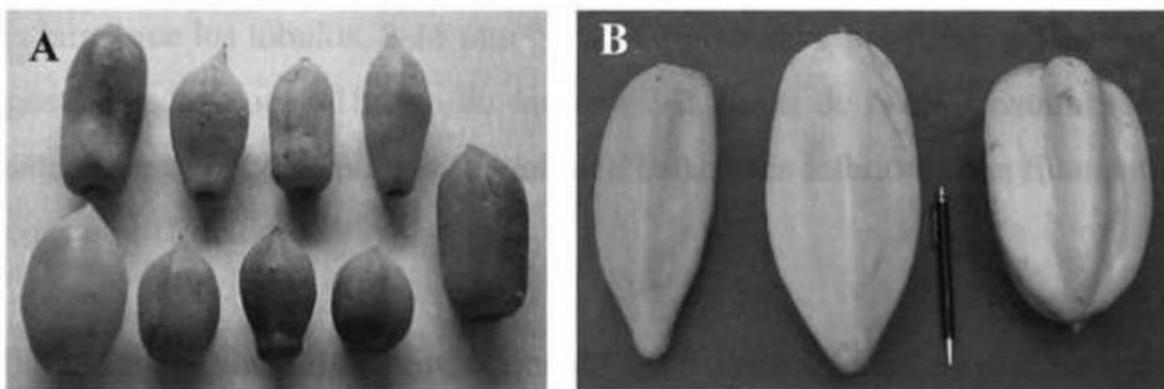


Figura 4. Diversidad en la forma de los frutos del híbrido *V. x heilbornii*.

Nota: A) Frutos de diferentes variedades de *V. x heilbornii*, B) Fruto del cultivar *V. x heilbornii* “Babaco” (Badillo) Badillo.

Fuente: (Yaguache, 2003)

2.4.2.5.1 *V. x heilbornii* (Badillo) Badillo

2.4.2.5.1.1 Progenitores.

Vasconcellea pubescens (ó *Vasconcellea cundinamarcensis*) está ampliamente extendida en las zonas templadas de los Andes yendo desde Colombia y Venezuela hasta Bolivia. En una pequeña escala es cultivado en Chile. A diferencia de la gran zona geográfica colonizada por *V. pubescens*, *Vasconcellea stipulata* tan solo se encuentra distribuido desde la parte centro sur de Ecuador (provincias de Loja y Azuay) hasta las zonas nortes de Perú en donde crece a altitudes de 1600 a 2500 m. De este modo en las zonas donde ambas especies conviven se ha reportado que se ha dado un proceso de hibridación natural intraespecífico entre *V. stipulata* y *V. pubescens* (Badillo,

1997). Además, Horovitz y Jiménez en 1967 observaron morfológicamente signos de introgresión de *V. pubescens* en *V. stipulata* en la provincia de Loja (Ecuador).

A pesar de que *V. pubescens* y *V. stipulata* son morfológicamente similares, Badillo (1993) observó diferencias claras que ayudarían a diferenciar ambas especies. Generalmente *V. pubescens* es reconocida por la pubescencia en flores y hojas y sus flores verdosas, mientras que *V. stipulata* se caracteriza por hojas glabras maduras, espinas duras y puntiagudas en cada lado del pecíolo y sus flores de naranja (Badillo, 1971). En contraste con el *V. stipulata* estrictamente dioico (como la mayoría de las otras especies en este género), se han observado formas monoicas de *V. pubescens* (Badillo, 1993).

En base a características morfológicas y a ciertos estudios genéticos observadas se presume que los parentales de *V. x heilbornii* son *V. stipulata* y *V. pubescens* (Van Droogenbroeck et al., 2004) sin embargo, en otros estudios genéticos se determina que *V. x heilbornii* es genéticamente más cercano a *V. stipulata* y algo más distanciado a *V. weberbaueri* (Kyndt et al., 2005). Por este motivo, con toda la presente información, aún es incierto el origen de *V. x heilbornii*. Se puede incluso hablar de un proceso de hibridación triple entre *V. stipulata*, *V. weberbaueri* y *V. pubescens* o la existencia de un progenitor materno común para *V. x heilbornii* y *V. weberbaueri* (Kyndt et al., 2005).

2.4.2.5.1.2 Morfología

Badillo (1967, 2000) nombró por primera vez el supuesto híbrido entre *V. stipulata* y *V. pubescens* como *Carica x heilbornii* Badillo, más tarde como *V. x heilbornii* (Badillo) Badillo y lo

describió como una planta dioica, monoica o polígama que generalmente muestra algunos grados de partenocarpia (hasta ausencia total de semillas), algo pubescente a completamente glabra y en su mayoría con espinas estipulares. Las flores son de color naranja, verde o amarillo verdoso y los lóbulos del cáliz se alternan con los lóbulos de la corola. Probablemente debido a que algunas plantas seleccionadas de *V. x heilbornii* son propagadas vegetativamente por los agricultores locales para la producción de frutos, las flores masculinas a veces son desconocidas.

El babaco es nativo de las zonas subtropicales del sur de Ecuador pero en pequeña escala puede ser encontrado en mercados de países como Australia, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Italia y España (Alvarez & Cornejo, 2017)



Figura 5. Cultivo de *V. x heilbornii* 'Babaco' en Baños de Agua Santa (Ecuador).

2.4.3 *Vasconcellea stipulata* Badillo

2.4.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del jigacho es la siguiente:

Tabla 1.
Clasificación taxonómica del jigacho (V. stipulata Badillo).
Vasconcellea stipulata

| | |
|--------------------|---------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| Subdivisión | Spermatophyta |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Dilleniidae |
| Orden | Violales |
| Familia | Caricaceae |
| Género | <i>Vasconcellea</i> |
| Especie | <i>stipulata</i> |

Fuente: (Rignanese, 2006)

Nombres comunes: toronche, jigacho, papayo de altura, papayita aromática, papayuela de los andes.

Nombre científico: *Vasconcellea stipulata* Badillo (Velázquez-Martí & Castillo, 2017).

2.4.3.2 Distribución geográfica

La especie *V. stipulata* se distribuye desde las zonas centrales de Ecuador hasta las zonas norte de Perú encontrándose sobre todo en los valles temperados Andinos a una altura de 2000-2600 metros sobre el nivel del mar. El cultivo de su fruto aún no ha sido desarrollado

comercialmente quedándose tradicionalmente como cultivo doméstico (Velázquez-Martí & Castillo, 2017).



Figura 6. Distribución geográfica de *V. stipulata* en Sudamérica (Centro y Sur de Ecuador).

Fuente: (Scheldeman & Willemen, 2007)

El desarrollo del cultivo de *V. stipulata* permitirá el crecimiento de pequeños agricultores dedicados a su producción. Además se conseguirá conservar el material genético de plantas nativas de los Andes , asegurando su preservación para futuros estudios filogenéticos, taxonómicos y genéticos con el objetivo de conocer con profundidad estas especies andinas (Morales & Morales, 2006).

2.4.3.3 Características morfológicas

Las raíces suelen presentar un crecimiento rápido pero son poco profundas, el tronco recto cilíndrico y de consistencia herbácea puede alcanzar los 3 metros de altura (Montenegro, 1968),

las hojas son palmeadas con siete y a veces con cinco lóbulos , las flores masculinas son verdes de 4 cm de largo mientras que las femeninas son sésiles de 8 cm de largo (Dodson, 1985). Los frutos que producen son bayas alargadas con uno de sus extremos puntiagudos, tienen 5 carpelos separados por unas hendiduras poco pronunciadas, su longitud esta entre los 8-10cm y el ancho entre 4-5 cm (Velázquez-Martí & Castillo, 2017).

El fruto maduro es de color amarillo, de fragancia agradable y muy jugoso que puede llegar a pesar entre 40 y 150 gramos (Fabara & Bermeo, 1985). Son sus características organolépticas que le hacen llamativo en los mercados de Europa y Norte América en donde se los puede encontrar en ciertos puntos de venta como frutos exóticos y tropicales (Velázquez-Martí & Castillo, 2017). En cuanto a la forma del fruto de *V. stipulata* existe una gran diversidad encontrándose desde frutos totalmente redondeados y lisos hasta frutos más alargados y con rugosidades y surcos longitudinales (INIAP-PROMSA, 2003) Además es un fruto que presenta pocas semillas a diferencia de otros frutos de la misma familia y se ha encontrado que las concentraciones de papaína, una enzima de gran importancia industrial, son mucho mayores que *C. papaya* de la cual se extrae normalmente. Todas estas características presentadas hacen que el fruto tenga grandes posibilidades de introducirse en el mercado mundial (Kyndt et al., 2007).

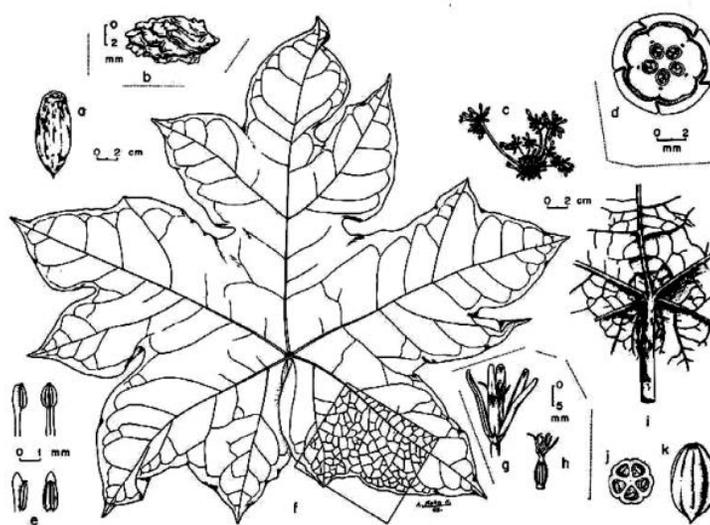


Figura 7. Morfología de *Vasconcellea stipulata* Badillo.

Nota: a) fruto, b) semilla, c) inflorescencia masculina, d) sección transversal de una flor femenina en un brote floral mostrando la corola y el ovario, e) estambres superiores e inferiores, f) hoja, h) flor femenina, gineceo o pistilo de la flor femenina, i) detalle de la conexión abscisal entre peciolo y hoja, j) corte transversal del fruto, k) vista lateral del fruto.

Fuente: (Badillo, 1993)

2.4.3.4 Factores ambientales que favorecen su crecimiento.

V. stipulata se da en las zonas templadas de los valles andinos en altitudes entre 2000 y 2600 msnm (Badillo, 1993). Se ha comprobado que los cultivos de jigacho bajo condiciones controladas de invernadero y después de procesos de poda tienen un mayor desarrollo y crecimiento. Las plantas que se desarrollan al aire libre tienen una gran cantidad de ramas y un exceso de flores que a su vez reduce el número de flores viables (Velázquez-Martí & Castillo, 2017).

2.4.4 Citogenética

2.4.4.1 Origen

La ciencia de la genética tuvo su origen en 1865 con Gregor Mendel cuando publicó los principios de segregación y su clasificación basada en siete rasgos fenotípicos y experimentos de hibridación artificial controlada con las semillas de guisantes (*Pisum sativum* L.). Más tarde en 1903 Sutton y Boveri descubrieron que los factores hereditarios (genes) se localizaban en unidades denominadas cromosomas dando inicio así a la citogenética (Singh, 2003).

2.4.4.2 Definición

La citogenética es una ciencia que combina la citología, que se dedica al estudio de los cromosomas y de los componentes celulares y la genética, el estudio de la herencia. Algunos aspectos estudiados por esta ciencia son la función y movimiento de los cromosomas (división celular), cantidad y estructura cromosómica (cariotipo) y las posibles modificaciones que los cromosomas puedan sufrir (Singh, 2002).

2.4.4.3 Importancia

Los primeros estudios del cariotipo por los años 20 se realizaban mediante cortes en el micrótopo de los tejidos a estudiar que difícilmente proporcionaban suficiente información de los parámetros cariotípicos. En los inicios de la década de los 40 se desarrolló la técnica “squash” o de aplastamiento que mediante el uso de ciertos reactivos fue posible el estudio más detallado de las características de los cromosomas dando un gran salto en la citogenética (Fedack & Kim, 2008).

Los estudios citogenéticos han permitido entender muchos aspectos genéticos, filogenéticos, taxonómicos, biológicos, reproductivos y evolutivos. Desde el comienzo del estudio de los cromosomas, el conocimiento sobre citogenética se ha ido expandiendo hasta el punto de

poder analizar todo el genoma mediante la manipulación de los cromosomas (Shahryar & Penny, 2016).

Estudiar los cromosomas es de utilidad para poder detectar el nacimiento de subespecies híbridas y conocer su impacto en la evolución de las especies. Estos estudios del cariotipo son una gran herramienta para el conocimiento de relaciones genéticas entre especies (Singh, 2002). Permiten determinar el número cromosómico de las especies para poder inferir relaciones filogenéticas entre diferentes poblaciones vegetales.

Dentro de las características cromosómicas que mayor información aportan para el estudio de procesos evolutivos es la posición del centrómero, número cromosómico, tipo de cromosoma, la posición de NORs (zonas organizadoras del nucléolo), tamaño de los cromosomas (absoluto y relativo), cantidad y distribución de la heterocromatina, composición del ADN y contenido total de ADN (Poggio et al., 2008).

Conocer las características básicas de los cromosomas además puede resultar de gran utilidad para la construcción de mapas genéticos, estudios de especiación y evolución de las especies así como tener una guía para saber hacia dónde dirigir los programas de mejoramiento de plantas (Peruzzi & Halil, 2012). Esto es debido a que en dichos programas de mejoramiento genético factores como diferencias en los niveles de ploidía entre los progenitores podrían originar descendencia estéril o genéticamente inestables (Poehlman & Allen, 2003).

Las técnicas citogenéticas consisten en la aplicación de protocolos para la determinación del número, morfología y comportamiento de los cromosomas en los procesos de división celular como la mitosis y la meiosis. En el estudio de plantas el material de partida más utilizado son los ápices radiculares o bien los botones florales (anteras). Generalmente estos procedimientos constan

de cuatro etapas básicas: pretratamiento, fijación digestión enzimática , tinción y el aplastamiento o squash del tejido vegetal (Rondón & Rache, 2012).

La citotaxonomía es una rama derivada de la citogenética utilizada para estudios comparativos de parámetros cariotípicos con el fin de realizar estudios sistemáticos y evolutivos (Siljak-Yakovlev & Peruzzi, 2012). Se puede obtener un gran número de información a partir del estudio cromosómico, un parámetro de importancia es la asimetría del cariotipo (Peruzzi & Halil, 2012).

El primero en proponer el término de asimetría fue Levitsky (1931). Se quería determinar un parámetro que permitiera determinar la variabilidad de las posiciones de los centrómeros (asimetría intracromosómica) y determinar en qué grado varían los cromosomas según sus tamaños (asimetría intercromosómica).

Un cariotipo simétrico es aquel en el que predominan los cromosomas metacéntricos (m) y submetacéntricos (sm) y todos ellos tienen un tamaño similar. Por el contrario un cariotipo asimétrico se caracteriza por presentar posiciones muy variadas de los centrómeros , habiendo desde cromosomas metacéntricos /submetacéntricos hasta cromosomas telocéntricos y además los tamaños de los cromosomas son muy heterogéneos entre ellos (Paszko, 2006).

Existen muchos parámetros que permiten comparar la asimetría entre cariotipos. La clasificación de Stebbins (1971) es uno de los métodos cualitativos más usados para determinar los parámetros de simetría de un cariotipo y utilizado además para establecer relaciones cariotípicas entre diferentes especies (Paszko, 2006).

Cuadro 1.

Niveles de asimetría en el cariotipo según Stebbins (1971).

| Ratio | Proportion of chromosomes with arm ratio <2:1 | | | |
|------------------|---|---------------|---------------|----------|
| | 1.00 (1) | 0.99–0.51 (2) | 0.50–0.01 (3) | 0.00 (4) |
| Largest/smallest | 1A | 2A | 3A | 4A |
| <2:1 (A) | 1A | 2A | 3A | 4A |
| 2:1–4:1 (B) | 1B | 2B | 3B | 4B |
| >4:1 (C) | 1C | 2C | 3C | 4C |

Se distinguen así doce tipos de cariotipos según su simetría. Para ello se toma en cuenta 3 niveles (A-C) según la relación de tamaño entre el cromosoma más grande y el más pequeño y cuatro niveles (1-4) según la proporción de cromosomas metacéntricos con una relación de brazos < 2:1.

Entre los índices de asimetría que se han utilizado para el análisis de cariotipos se encuentra el porcentaje total de forma (TF%) descrito por Huziwaru en 1962 con el objetivo de analizar el género *Aster*. Frecuentemente es utilizado para determinar la simetría del cariotipo y analizar las relaciones cariotípicas entre especies de un género (Paszko, 2006).

El índice de dispersión (ID), es un parámetro cromosómico desarrollado por Lavania y Srivastaba en 1992 que relaciona el gradiente centromérico (CG) con el coeficiente de variación (CV). Watanabe et al. en 1999 desarrollaron la índice asimetría cariotípico (A). Arano en 1963 introdujo el índice de simetría cariotípica (As K%). Este índice ha sido útil para determinar las relaciones filogenéticas entre los géneros *Pertya* y *Ainsliaea* y además para analizar la evolución

cromosómica entre especies de la familia *Umbelliferae* (Arano & Saito, 1980) así como también especies de *Hypochaeris* (Weiss-Schneeweiss & Stuessy, 2003).

Existen muchos más índices de asimetría desarrollados por otros autores que de igual manera permiten la comparación entre cariotipos según el grado de asimetría que presenten (Peruzzi & Halil, 2012).

Un ideograma consiste en una manera gráfica de presentar la longitud de los cromosomas, el índice centromérico y la relación de brazos brindando así una primera información general acerca de la estructura del cariotipo. Generalmente para obtener el ideograma son necesarias varias mediciones de cromosomas metafísicos de los cuales se obtienen resultados promedios (Ilya, 2017).

2.4.5 Softwares útiles para la caracterización cromosómica.

Muchos son los software utilizados por citogenetistas que facilitan su trabajo en la caracterización de los cromosomas en estudio (Reeves, 2001). Entre las primeras aplicaciones informáticas que aparecieron para los análisis de cariotipo se presentaban algunas limitaciones como la dificultad para utilizar el software o para incluso instalarlo. En los últimos años varios programas informáticos han sido desarrollados para facilitar los estudios citogenéticos.

2.4.5.1 MicroMeasure Version 3.3

Fue desarrollado para la comunidad científica por el Departamento de Biología de La universidad Estatal de Colorado sin ningún tipo de costo. Se trata de un software diseñado para obtener datos de estudios citogenéticos a partir de imágenes digitales. Es un programa fácil de

manejar, libre para su instalación y con un gran número de parámetros o análisis para obtener información completa de la investigación que se esté realizando (Reeves, 2001).

2.4.5.2 Karyotype Analysis 2.0

Es un programa diseñado para el análisis de cromosomas en plantas, pero puede ser utilizado también en el estudio de cromosomas de otros organismos. La función principal de este software es permitir mediciones eficientes de los cromosomas, el análisis del cariotipo incluyendo datos como el número cromosómico, tamaños, relación de brazos, índice centromérico longitudes relativas y la fórmula cariotípica. Además, Karyotype permite el análisis de un gran número de parámetros o índices de asimetría. Es un programa de uso libre que puede ser encontrado en la página oficial de la universidad de Sichuan (Altınordu & Peruzzi, 2016).

2.4.5.3 DRAWID v0.26

Se trata de un software de uso libre que se utiliza para realizar análisis de cariotipo y la construcción de ideogramas. Se utilizan archivos de imágenes o tablas en Excel previamente generadas por DRAWID como archivos de entrada y los resultados de las mediciones son devueltos en tablas Excel (índice centromérico, relación de brazos, longitud relativa, longitud absoluta de los cromosomas y de los brazos de los cromosomas) y la imagen de un ideograma (Ilya, 2017).

2.5 HIPÓTESIS

El cariotipo de *V. stipulata* presenta un número cromosómico $2n=18$ donde todos los cromosomas son metacéntricos cuyos tamaños se encuentra en el rango entre 1-4 micras.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

El presente trabajo de investigación fue desarrollado por Lissette Marianela Mariño Robalino, con la colaboración de María Claudia Segovia PhD, como directora del proyecto y con Mónica Jadán PhD como asesora científica.

3.2 FASE DE CAMPO-OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas de jigacho (*V. stipulata*) utilizadas fueron obtenidas del vivero localizado en las coordenadas 1°18'10.06" S y 78°31'08.68" a una altura de 2081 msnm, ubicado en el cantón Patate de la Provincia de Tungurahua (Ecuador).



Figura 8. Vivero de Patate (Tungurahua, Ecuador) de donde se adquirieron las plantas de jigacho (*V. stipulata*) para el desarrollo de la presente investigación.

3.3 FASE PRELIMINAR

3.3.1 Instalación del material vegetal en condiciones de invernadero.

Un total de 25 plantas de jigacho de hasta aproximadamente unos 50 cm de altura (de 2 a 4 meses de edad) fueron trasplantadas en fundas de plástico negras de 2 litros de capacidad. Cada funda fue numerada con la finalidad de llevar un registro del muestreo de cada planta. El sustrato utilizado fue una mezcla de humus, tierra negra y cascarilla de arroz en iguales proporciones. El objetivo de este proceso fue proporcionarles un sustrato que aumente el desarrollo de las raíces.



Figura 9. Plantas de jigacho mantenidas bajo condiciones de invernadero con su respectivo etiquetado para su registro y monitoreo.

Con el mismo objetivo cada 3 semanas las plantas fueron regadas con soluciones enraizantes para estimular la formación de meristemos radiculares jóvenes.

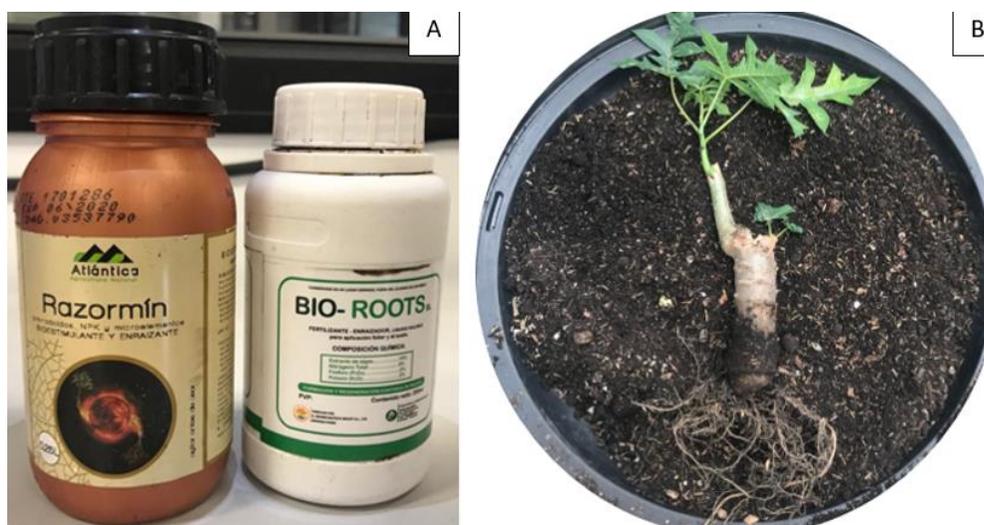


Figura 10. Estimulación del enraizamiento.

Nota: A) Enraizantes utilizados en soluciones para el riego de las plantas de jigacho, B) Planta de jigacho con un gran volumen radicular después de la aplicación de los enraizantes.

Las plantas que mejor reaccionaron a los procesos de enraizamiento fueron utilizadas para los análisis citogenéticos, tomando los meristemos radiculares más jóvenes (de tonalidad blanquecina con los ápices amarillentos oscuros).

3.3.2 Muestreo en el invernadero

3.3.2.1 Instrumental

Previo a la toma de las muestras se preparó todo el material necesario para ello.

Tabla 2.

Material necesario para proceder a la toma de muestras (meristemos radiculares a partir de plantas jóvenes aclimatadas en invernadero).

| Insumos | Reactivos |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Cooler • Vaso de precipitación de 100 ml • Pinzas de punta fina • Papel filtro • Par de guantes • Bloques refrigerantes • Vidrio de reloj | <ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiquinoleína 2mM • Agua destilada • Colchicina 0.1 % |



Figura 11. Material preparado para el muestreo en el invernadero de los meristemos radiculares de jigacho (bloques de hielo, cooler, agua destilada, guantes, pinzas, bisturí, vidrio reloj, frasco vacío, papel toalla).

La 8-hidroxiquinoleína y colchicina, utilizadas para el pretratamiento de las raíces, se transportaron en tubos eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados, tantos cuantos fueron necesarios según el muestreo realizado. Aproximadamente en cada tubo se introdujeron 8

meristemas (o menos) con el fin de que la solución se distribuya equitativamente entre los meristemas y tenga el efecto deseado.

Los bloques refrigerantes fueron de importancia para conservar las soluciones de 8-hidroxiquinoleína y colchicina a una temperatura adecuada. Además, estos pretratamientos al ser soluciones fotosensibles tuvieron que ser expuestas a la luz el menor tiempo posible.

3.3.2.2 Procedimiento

Una vez en el invernadero para proceder con el muestreo se escogió la planta numerada que más tiempo haya llevado sin ser muestreada. Con cuidado se suavizó la tierra de la funda donde se encontraba e igualmente con delicadeza se extrajo la planta tratando de arrancar la menor cantidad de raíces (proceso que lastima a la planta).

Las raíces tomadas no debían presentar daños en su estructura. Las elegidas para el muestreo fueron aquellas raíces jóvenes (totalmente blancas y flexibles) de aproximadamente 1 mm de grosor, con un ápice libre de laceraciones y de color amarillento. Los cortes se realizaron con la ayuda de unas pinzas de punta fina dejando las raíces con una longitud final de unos 2 cm aproximadamente.

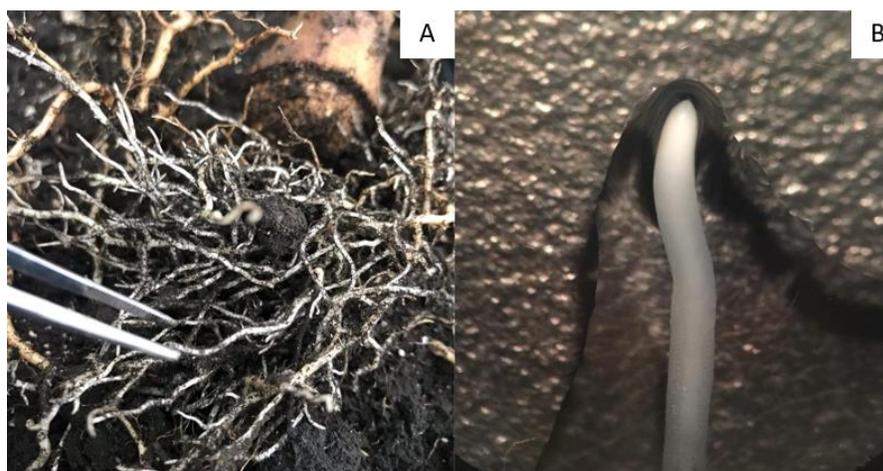


Figura 12. Raíces tomadas para los análisis citogenéticos. A) Raíces cortadas de la planta con la ayuda de unas pinzas de punta fina. B) Raíz con características óptimas para los análisis posteriores (observada bajo un estereoscopio).

Las raíces cortadas se pasaron al vaso de precipitación donde se lavaron con agua destilada hasta que toda la tierra se desprendió de su superficie. Una vez limpias, con la ayuda de unas pinzas se secaron sobre papel toalla para retirar el exceso de agua que pudo haber quedado (para evitar diluir la solución del pretratamiento). Finalmente se introdujeron los meristemas en los tubos con 8-hidroxiquinoleína 2mM o colchicina 0.1% y fueron transportados inmediatamente al laboratorio.

3.4 FASE DE LABORATORIO

Esta fase del trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura en la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, en Sangolquí ubicado en la dirección Av. General Rumiñahui, de la

provincia de Pichincha (Ecuador) y con las coordenadas: latitud 0°18'53, 891'' (Sur), longitud 78°26'46,562 (Oeste), altura elipsoidal 2 518,640 m.

3.4.1 FASE I: Estandarización de un protocolo para la observación de células radiculares metafásicas.

Bajo revisión bibliográfica se seleccionan los posibles mejores reactivos químicos para cada una de las fases del tratamiento de los meristemas con el objetivo de determinar la mejor combinación de dichas sustancias químicas que en conjunto permitan finalmente visualizar cromosomas metafásicos con una buena resolución y adecuadamente teñidos. Se obtuvieron doce tratamientos a evaluar, los cuales se muestran a continuación:

Tabla 3.

Tratamientos a evaluar para la obtención del mejor protocolo que permita la visualización de células metafásicas de buena calidad a partir de meristemas radiculares de jigacho (V. stipulata).

| Pretratamiento | 8HQ | | | | | | C | | | | | |
|----------------|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| Fijación | EA | | | EP | | | EA | | | EP | | |
| Tinción | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO |
| # Tratamiento | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmin, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

3.4.1.1 Pretratamiento

Se usaron dos reactivos químicos en la primera etapa del tratamiento de los meristemas; 8-hidroxiquinoleína 2 mM y colchicina 0.1%. Ambos son útiles para detener la división celular. Se dejaron los tubos por 4 horas a 4°C para el caso de la 8-hidroxiquinoleína y 3 horas a 4°C para el caso de la colchicina 0.1%.

Tabla 4.

Preparación de soluciones para el pretratamiento de los meristemos radiculares.

| Hidroxiquinoleína 2 mM | Colchicina 0.1% |
|---|---|
| Añadir 0.5 g de 8-hidroxiquinoleína por cada litro de agua destilada. | Añadir 0.1 g de colchicina por 100 mL de agua destilada |
| En ambas soluciones los reactivos tienen que estar bien diluidos antes de guardarlos en refrigeración. | |

3.4.1.2 Fijación

Se realizaron 3 lavados de los meristemos con agua destilada después del pretratamiento. Las raíces luego de secarlas con papel filtro se pasan a los tubos llenos de fijador: etanol: ácido acético (3:1) ó etanol: ácido propiónico (3:1) y se dejaron en refrigeración (4° C) por 24 h.

3.4.1.3 Tratamiento enzimático

Las raíces después del tratamiento de fijación fueron bien lavadas con agua destilada (3 lavados intensos) y se allí se dejaron reposar unos minutos en (con el objetivo de que las células se hinchen). La solución enzimática utilizada fue una mezcla en iguales cantidad de pectinasa 20% y celulasa al 2% en buffer citrato. Los meristemos son secados en papel filtro y pasados a tubos eppendorf con la mezcla enzimática. Se verificó que los ápices estuvieran en contacto con la solución enzimática. Dos horas se dejaron las muestras en incubación a 37°C.

Tabla 5.
Preparación de la solución enzimática.

| Solución enzimática | |
|---|--------------------------------|
| Pectinasa | 20% |
| Celulasa | 2% |
| Buffer | 75mM KCl (pH=7) 7.5 mM EDTA |
| Mezclar todos los reactivos y homogenizar bien antes de almacenar la solución enzimática dispensada en tubos de 1mL. | |

3.4.1.4 Tinción

Los meristemas (aproximadamente 5 por cada tubo) se depositaron en un tubo eppendorf (con unos 300 ul de tinte) con la respectiva solución de tinción: aceto-orceína, aceto-carmín y lacto-propiono-orceína, por 24 horas (no es necesario refrigeración).

Tabla 6.
Preparación de los diferentes tintes para la coloración de los cromosomas.

| Soluciones de tinción | |
|--|--|
| Aceto-carmín | 1 g carmín 45 ml ácido acético 55 ml agua destilada |
| Aceto-orceína | 1 g orceína 45 ml ácido acético 55 ml agua destilada |
| Lacto-propiono-orceína | 2 g de orceína 50 mL ácido láctico 50 ml de ácido propiónico |
| Todas las soluciones deben agitarse hasta que no existan grumos .Es necesario filtrar las solución y almacenarlas en frascos ámbar en refrigeración | |

3.4.1.5 Squash

Previamente se prepararon placas portaobjetos limpias sobre las cuales se colocaron con cuidado uno de los meristemas teñidos. Se procedió a cortar únicamente el ápice (de unos 2 mm a aproximadamente). Se depositó encima un cubreobjetos y con la ayuda del borrador de un lápiz o el dedo se presionó bien el cubreobjetos para expandir en lo posible el tejido vegetal. Se tuvo cuidado de no romper el cubreobjetos.

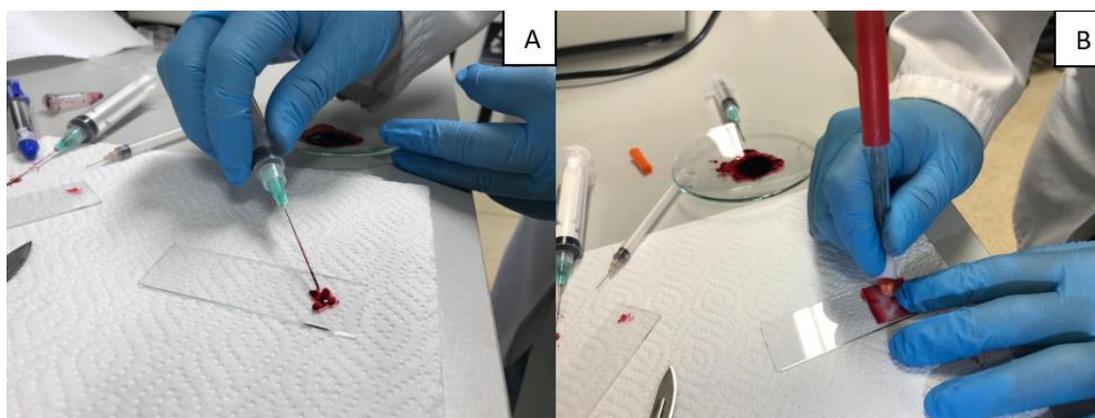


Figura 13. Preparación del squash con los meristemas ya teñidos.

Nota: A) Corte del ápice del resto de la raíz, B) aplastamiento del tejido meristemático con la ayuda de un borrador de un lápiz.

3.4.1.6 Observación

Se utilizó un microscopio óptico Olympus CX21 ® con el máximo aumento de 1000X. La observación de la placa se realizó de forma ordenada y metodológica para evitar visualizar y contabilizar las mismas células. En primer lugar, con el objetivo de 4X se observó la distribución general de las células en la placa. A 10x se pudo observar si las células se esparcieron adecuadamente. Con el objetivo de 40X se determinó si las células se encontraban en mitosis. Finalmente, con el objetivo de 100X se observaron los cromosomas. Se estableció una guía

preliminar para facilitar la identificación y apreciación de las distintas fases de mitosis para no obtener resultados erróneos.

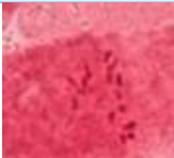
3.4.1.7 Evaluación

Un total de 20 células metafásicas fueron analizadas en cada uno de los tratamientos. Dos variables fueron evaluadas en cada caso:

- Resolución: permitió evaluar la nitidez y los detalles observados en los cromosomas. Se asignaron valores de 1 a 5 para cuantificar el grado de resolución en los cromosomas metafásicos.
- Tinción: permitió evaluar la tinción de los cromosomas para poder distinguirlos del resto del citoplasma celular. Se estableció una escala de valores del 1 al 5 para cuantificar el grado de tinción de los cromosomas metafásicos.

Tabla 7.

Parámetros para la evaluación cuantitativa y cualitativa de la variable resolución y de la variable tinción analizadas.

| Resolución | | | Tinción | | |
|------------|------------|---|---------|------------|---|
| Valor | Valoración | Imagen | Valor | Valoración | Imagen |
| 1 | Muy baja |  | 1 | Muy baja |  |
| 2 | Baja |  | 2 | Baja |  |

CONTINÚA

| | | | | | |
|---|------------------|---|---|------------------|---|
| 3 | Regular |  | 3 | Regular |  |
| 4 | Buena |  | 4 | Buena |  |
| 5 | Excelente |  | 5 | Excelente |  |

3.4.1.8 *Análisis estadístico*

Después de la toma de datos la normalidad de los resultados de cada una de las variables estudiadas (resolución y tinción) fue evaluada bajo una prueba inferencial. De cumplirse con la normalidad los tratamientos serían comparados con una prueba ANOVA y una prueba Tukey para comparación de medias, caso contrario se pensó aplicar las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn para comparación de medias. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R-Studio.

3.4.2 **FASE II: Cálculos del índice mitótico y de la hora de mayor índice mitótico.**

Para determinar la hora de mayor índice mitótico se realizaron estudios en distintas horas del día comenzando a las 6 de la mañana hasta las 6 de la tarde con intervalos de media hora. En cada una de las horas se muestrearon meristemos radiculares (entre 5 y 10) y se les aplicó el protocolo previamente encontrado.

En cada uno de los tiempos evaluados se contabilizaron un mínimo de 1500 células (que estén en buen estado) bajo un microscopio óptico con una magnificación final de 1000X. Para

facilitar el conteo se utilizó un contador manual. Además, se fueron registrando las células observadas en cada una de las fases de la mitosis celular: profase, metafase, anafase y telofase.

Los cálculos se realizaron con las siguientes fórmulas parciales (observaciones por cada hora):

$$IF(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ células en cada fase}}{N^{\circ} \text{ total de células}} * 100$$

Donde IF (%): índice de fases

$$IM(\%) = IFp + IFm + IFa + IFt$$

Donde IM: índice mitótico, p: profase, m: metafase, a: anafase y t: telofase

3.4.3 FASE III: Caracterización cromosómica

3.4.3.1 Parámetros para la caracterización del cariotipo

Para determinar los distintos parámetros que permitieron caracterizar el cariotipo se obtuvieron un total de 35 fotografías de células con cromosomas metafásicos perfectamente dispersos que facilitaron las mediciones. Las imágenes fueron capturadas con la cámara de un celular iPhone 7 Plus con cámara de 12 MP y aumento digital de 3x en un microscopio Olympus BX41® con ocular de 16X y objetivo máximo de 100X. La magnificación final de las imágenes fue de 4600X.

En este proceso se utilizaron tres softwares: MicroMeasure 3.0, Karyotype Analysis 2.0 y DRAWIDv0.26.

Las 35 células metafásicas fueron en primer lugar analizadas con el software MicroMeasure al ser el programa de más fácil manejo y se pudieron obtener mediciones tales como la longitud total de cada cromosoma, longitud del brazo largo, longitud del brazo corto, relación de brazos, índice centromérico, porcentaje relativo de la longitud de cada cromosoma y la longitud total del set cromosómico.

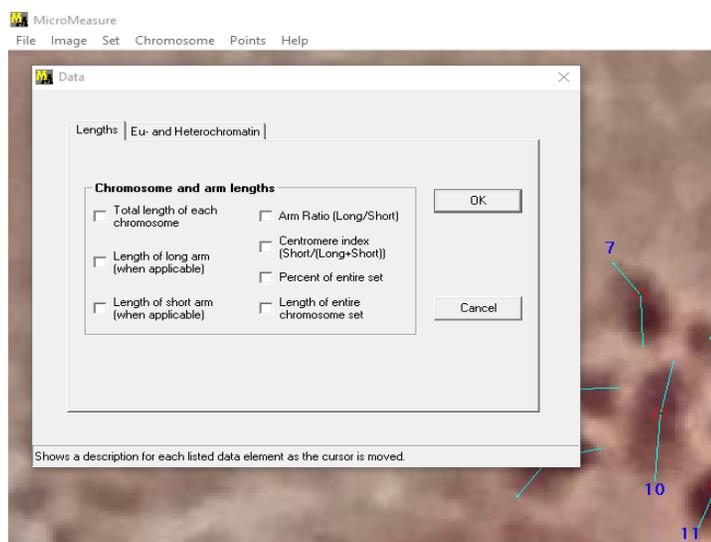


Figura 14. Ventana de trabajo de MicroMeasure 3.0 donde se señalan las mediciones que el software puede proporcionar tras haber realizado las mediciones de los cromosomas metafísicos (por placa).

Sin embargo, Karyotype Analysis 2.0 fue un software que proporcionó mayor cantidad de información del cariotipo. Por lo que fue utilizado para obtener otros parámetros de importancia además de los ya obtenidos con MicroMeasure (útiles para comparación de datos).

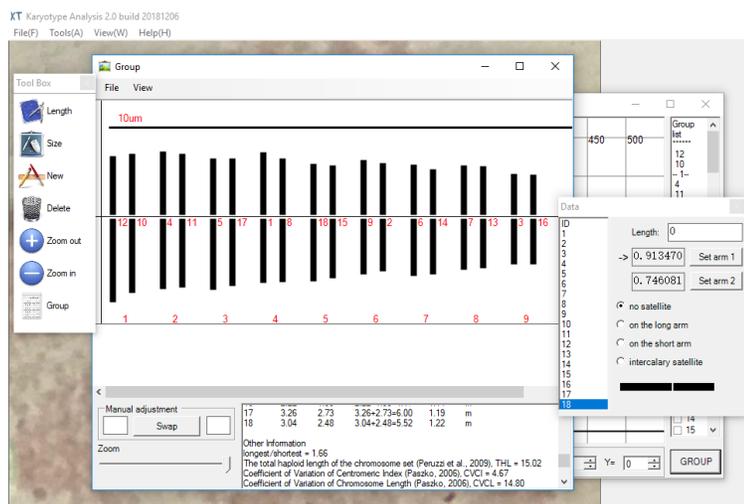


Figura 15. Ventana de trabajo de Karyotype Analysis 2.0 donde se señalan los resultados y datos que el software puede proporcionar tras haber realizado las mediciones de los cromosomas metafísicos (por placa).

Los resultados de las mediciones con Karyotype Analysis proporcionaron los siguientes datos:

- Grado de asimetría del cariotipo (Stebbins, 1971).
- Fórmula cariotípica.

Para la determinación de la morfología y el tipo de cromosomas se utilizó la clasificación propuesta por Levan et al. (1964).

Cuadro 2.

Clasificación de los cromosomas según Levan et al. (1964).

| Posición | bl/bc | IC | Clasificación |
|---------------------------|--------------|-----------|------------------------|
| Punto medio | 1.0 | 50 | Metacéntrico (M) |
| Región media | 1.0-1.7 | 47.5-37.5 | metacéntrico(m) |
| Región submedia | 1.7-3.0 | 37.5-25 | submetacéntrico(sm) |
| Región subterminal | 3.0-7.0 | 25-12.5 | subtelocéntrico(st) |
| Región terminal | 7.0-∞ | 12.5-2.5 | telo o acrocéntrico(t) |
| Punto terminal | ∞ | 0 | Telocéntrico(T) |

Nota: bl: brazo largo, bc: brazo corto, IC: índice centromérico

- Longitud brazo largo de cada cromosoma, q , μm .
- Longitud brazo corto de cada cromosoma, p , μm .
- Suma de brazo largo y brazo corto de cada cromosoma, μm .
- Diferencia de longitud de brazo largo y brazo corto de cada cromosoma, $q-p$, μm .
- Relación longitud del brazo largo con la longitud del brazo corto, r , μm .
- Longitud brazo largo del par homólogo, p , μm .
- Longitud brazo corto del par homólogo, q , μm .
- Suma de brazo largo y brazo corto del par homólogo, $q+p$, μm .
- Diferencia de longitud de brazo largo y brazo corto de cada par homólogo, μm .
- Relación en porcentaje de la longitud del brazo corto con la longitud total de cada par homólogo, μm .
- Índices de asimetría, calculados con las siguientes fórmulas:

$$\checkmark \text{ TF}\% = \frac{\sum \text{longitud de los brazos cortos de todos los cromosomas del set}}{\text{Longitud total de los cromosomas del set}} * 100$$

$$\checkmark \text{ ID} = \frac{\text{CG} * \text{CV}}{100}$$

$$\text{CG} = \frac{\text{Longitud media de los brazos cortos}}{\text{Longitud media de los cromosomas}} * 100$$

$$\text{CV} = \frac{S_{\text{CL}}}{X_{\text{CL}}} * 100$$

Donde : S_{CL} = desviación estándar de la longitud cromosómica

X_{CL} = media de la longitud cromosómica

$$\checkmark \text{ As K}\% = \frac{\sum \text{longitud de los brazos largos de todos los cromosomas del set}}{\text{Longitud total de los cromosomas del set}} * 100$$

$$\checkmark \text{ As K}\% = \frac{\sum \text{longitud de los brazos largos de todos los cromosomas del set}}{\text{Longitud total de los cromosomas del set}} * 100$$

$$\checkmark \text{ A} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{p_i - q_i}{p_i + q_i}}{n}$$

Donde:

p_i = longitud del brazo largo del cromosoma i

q_i = longitud del brazo corto del cromosoma i

n = número cromosómico haploide

3.4.3.2 Obtención del cariotipo

Para la obtención del cariotipo de jigacho (*V. stipulata*) se utilizó la mejor célula metafásica encontrada, es decir, donde los cromosomas se encontraron bien teñidos, dispersos y en un solo

plano. La imagen fue editada con Adobe Photoshop CC 2019 donde se recortaron los cromosomas para finalmente agruparlos de mayor a menor tamaño. Los centrómeros de los cromosomas se alinearon a la misma altura dejando los brazos más cortos hacia arriba. Cada cromosoma fue numerado secuencialmente y se le otorgó una letra de acuerdo con su morfología.

3.4.3.3 Obtención del ideograma

El ideograma fue obtenido mediante el software DRAWID v 0.26 en el cual de nuevo las 35 células metafásicas fueron medidas para obtener un ideograma promedio de todas las mediciones.

Cada cromosoma fue representado como una barra en el que se dibujó la posición de su centrómero indicando además la desviación estándar de este y de la longitud de los brazos.

CAPITULO 3: RESULTADOS

4.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBSERVACIÓN DE CÉLULAS RADICULARES METAFÁSICAS.

Para la determinación del mejor protocolo destinado a la observación de cromosomas metafásicos en células del tejido meristemático de ápices de raíces de jigacho, se evaluaron dos variables cualitativas: resolución y tinción de los cromosomas.

Con el objetivo de abreviar los nombres de los reactivos usados en cada uno de los tratamientos se impusieron las siguientes abreviaciones: 8HQ: 8-hidroxiquinoleína 0.002M y C: colchicina 0.1% como reactivos para el pretratamiento, EA: etanol-ácido acético (3:1), EP: etanol-ácido propiónico (3:1) como fijadores, AC: aceto-carmín, AO: aceto-orceína y LPO- lacto-propiono-orceína como tintes. En las tablas 8 y 9 se presenta los valores obtenidos para la variable resolución y tinción respectivamente tras el conteo de 20 células metafásicas en cada uno de los doce tratamientos estudiados.

Tabla 8.

Valores de los niveles de resolución observados en los cromosomas metafásicos de 20 células en los doce tratamientos propuestos (1=muy baja, 2=baja,3=regular, 4= buena y 5= excelente).

| N° Células | Tratamiento | 8HQ | | | | | | C | | | | | |
|---------------|-------------|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| | | EA | | | EP | | | EA | | | EP | | |
| | | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO |
| 1 | 1 | 2 | 4 | 1 | 1 | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 | 5 | |
| 2 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 5 | 1 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | |
| 3 | 2 | 3 | 5 | 1 | 3 | 5 | 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 | |
| 4 | 1 | 3 | 5 | 1 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 5 | |
| 5 | 2 | 3 | 5 | 1 | 2 | 5 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 4 | |
| 6 | 3 | 3 | 5 | 1 | 2 | 5 | 3 | 2 | 4 | 2 | 3 | 5 | |
| 7 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 4 | 4 | |
| 8 | 1 | 3 | 5 | 2 | 2 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | |
| 9 | 1 | 4 | 4 | 2 | 3 | 5 | 3 | 4 | 4 | 1 | 3 | 4 | |
| 10 | 1 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 4 | |

CONTINUÁ

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 11 | 1 | 3 | 4 | 3 | 1 | 5 | 2 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 |
| | 12 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| | 13 | 1 | 3 | 5 | 2 | 2 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| | 14 | 1 | 2 | 5 | 2 | 5 | 5 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 5 |
| | 15 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 5 |
| | 16 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 |
| | 17 | 1 | 2 | 5 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 5 |
| | 18 | 1 | 2 | 4 | 3 | 4 | 5 | 2 | 4 | 5 | 3 | 2 | 5 |
| | 19 | 1 | 3 | 4 | 3 | 2 | 5 | 2 | 2 | 3 | 4 | 1 | 5 |
| | 20 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 |

Nota: 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmín, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

Tabla 9.

Valores de los niveles de tinción observados en los cromosomas metafásicos de 20 células en los doce tratamientos propuestos (1=muy baja ,2= baja, 3=regular ,4=buena 5= excelente).

| N° Células | Tratamientos | 8HQ | | | | | | C | | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| | | EA | | | EP | | | EA | | | EP | | |
| | | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO | AC | AO | LPO |
| 1 | | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 2 | | 2 | 4 | 3 | 2 | 4 | 5 | 1 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 |
| 3 | | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 2 | 3 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| 4 | | 2 | 4 | 3 | 2 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 5 | | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 3 | 2 | 4 | 5 |
| 6 | | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 5 |
| 7 | | 4 | 4 | 5 | 2 | 3 | 5 | 2 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| 8 | | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 5 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| 9 | | 1 | 3 | 5 | 2 | 3 | 5 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 10 | | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 11 | | 1 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 12 | | 2 | 4 | 5 | 2 | 4 | 5 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| 13 | | 1 | 4 | 5 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| 14 | | 2 | 3 | 5 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 | 3 | 5 |
| 15 | | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 5 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 5 |
| 16 | | 1 | 3 | 4 | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 5 |
| 17 | | 3 | 2 | 5 | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 5 |
| 18 | | 3 | 3 | 5 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 |
| 19 | | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 5 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 5 |
| 20 | | 2 | 4 | 5 | 3 | 3 | 5 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 |

Nota: 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmín, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

En primer lugar, se evaluó si para las dos variables los datos obtenidos seguían una distribución normal mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk. De todos los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos se observó que ninguno seguía una distribución normal. A modo de resumen del análisis de normalidad, a continuación, solo se presentan los resultados del primer tratamiento (8QH-EA-AC) para cada una de las variables:

- Normalidad en la variable resolución:

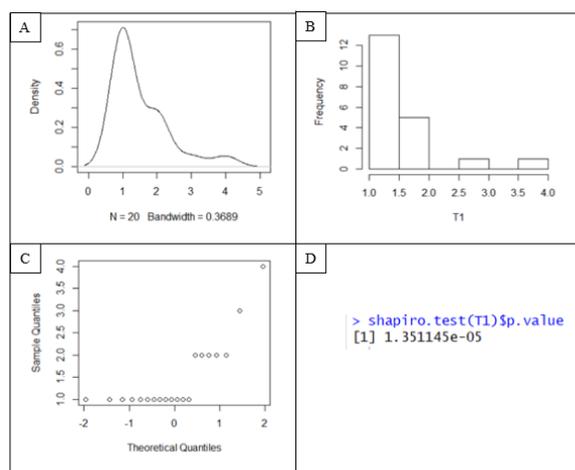


Figura 16. Análisis estadístico de la normalidad de la variable resolución.

Nota: A) gráfico de densidad, B) histograma, C) gráfico Q-Q normal, D) Valor-p de la prueba de normalidad con Shapiro-Wilk.

Tanto el gráfico de densidad como el histograma tienden hacia la izquierda, diferente a los gráficos centrados cuando existe normalidad, el gráfico Q-Q normal no sigue una línea recta y el

valor-p obtenido con el test Shapiro-Wilk es menor de 0.5 por lo que se rechaza la hipótesis nula en la que se asumía distribución normal para los datos de la variable resolución.

- Normalidad en la variable Tinción:

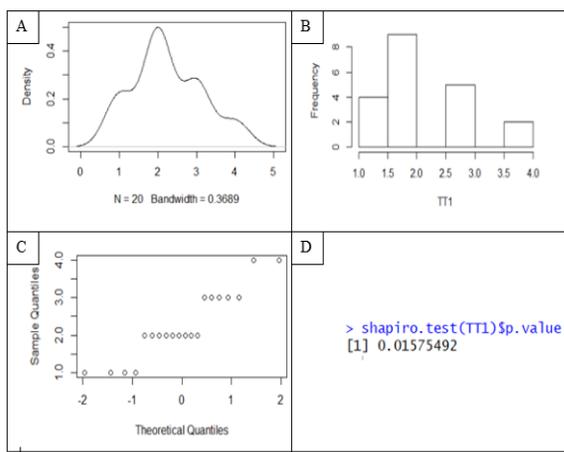


Figura 17. Análisis estadístico de la normalidad de la variable tinción.

Nota: A) gráfico de densidad, B) histograma, C) gráfico Q-Q normal, D) Valor-p de la prueba de normalidad Shapiro-Wilks

Tanto el gráfico de densidad como el histograma tienen un acercamiento a estar centrados, el gráfico Q-Q normal no sigue una línea recta y el valor-p obtenido con el test Shapiro-Wilk es menor de 0.5 por lo que igualmente se rechaza la hipótesis nula en la que se asumía distribución normal para los datos de la variable tinción.

Debido a la falta de normalidad en los datos para determinar si los tratamientos son diferentes significativamente en cada una de las variables se aplicó una prueba no paramétrica

similar al análisis ANOVA denominada Kruskal-Wallis. Una de las condiciones para aplicar esta prueba no paramétrica es que exista homogeneidad en las varianzas de los tratamientos. Para comprobar si se cumple este requisito se aplicó la prueba de Barlett (cuya hipótesis nula es varianzas iguales en los tratamientos).

Los resultados obtenidos con R-Studio confirmaron que se cumplía con la homogeneidad de las varianzas para los datos de ambas variables (con valores-p mayores a 0.05)

Cuadro 3.

Resultados de la prueba de Barlett (para la variable resolución).

```
> bartlett.test(Resolucion~Tratamiento, data = data) A
```

Bartlett test of homogeneity of variances

data: Resolucion by Tratamiento
Bartlett's K-squared = 22.399, df = 11, p-value = 0.06146

```
> bartlett.test(Tincion~Tratamiento, data = data2) B
```

Bartlett test of homogeneity of variances

data: Tincion by Tratamiento
Bartlett's K-squared = 17.331, df = 11, p-value = 0.09846

Nota: (A) y la variable tinción (B), obtenidos con RStudio.

Aplicando la prueba de Kruskal Wallis en los datos de cada una de las variables se obtiene un valor-p menor de 0.05 por lo que la hipótesis nula que propone que los tratamientos son iguales queda rechazada.

Cuadro 4.

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis (para la variable resolución).

```
> kruskal.test(Resolucion~Tratamiento,data=data)
Kruskal-Wallis rank sum test

data: Resolucion by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 140.14, df = 11, p-value < 2.2e-16
```

```
> kruskal.test(Tincion~Tratamiento,data=data2)
Kruskal-Wallis rank sum test

data: Tincion by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 153.75, df = 11, p-value < 2.2e-16
```

Nota: (A) y la variable tinción (B) obtenidos con RStudio.

A continuación, para evaluar las diferencias entre los tratamientos se aplicó la prueba de Dunn (una prueba homóloga a la prueba Tukey) que permite realizar comparaciones de múltiples poblaciones. Los valores-p fueron ajustados con el método de Bonferroni.

Cuadro 5.

Prueba Dunn aplicada en RStudio para la comparación entre todos los tratamientos realizados para la variable de resolución. Resultados de las 10 primeras comparaciones.

```
> dunnTest(Resolucion~Tratamiento, data = data,method = "bonferroni")
Dunn (1964) Kruskal-Wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.
```

| | Comparison | Z | P.unadj | P.adj |
|----|------------------------|------------|--------------|--------------|
| 1 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EA-AO | -3.1079207 | 1.884086e-03 | 1.243497e-01 |
| 2 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EA-LPO | -7.0896524 | 1.344493e-12 | 8.873653e-11 |
| 3 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EA-LPO | -3.9817317 | 6.841498e-05 | 4.515389e-03 |
| 4 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EP-AC | -1.4174638 | 1.563474e-01 | 1.000000e+00 |
| 5 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EP-AC | 1.6904569 | 9.094059e-02 | 1.000000e+00 |
| 6 | 8HQ-EA-LPO - 8HQ-EP-AC | 5.6721886 | 1.409847e-08 | 9.304988e-07 |
| 7 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EP-AO | -2.7742625 | 5.532701e-03 | 3.651583e-01 |
| 8 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EP-AO | 0.3336582 | 7.386375e-01 | 1.000000e+00 |
| 9 | 8HQ-EA-LPO - 8HQ-EP-AO | 4.3153899 | 1.593215e-05 | 1.051522e-03 |
| 10 | 8HQ-EP-AC - 8HQ-EP-AO | -1.3567987 | 1.748452e-01 | 1.000000e+00 |

Cuadro 6.

Prueba Dunn aplicada en RStudio para la comparación entre todos los tratamientos realizados para la variable de tinción. Resultados de las 10 primeras comparaciones.

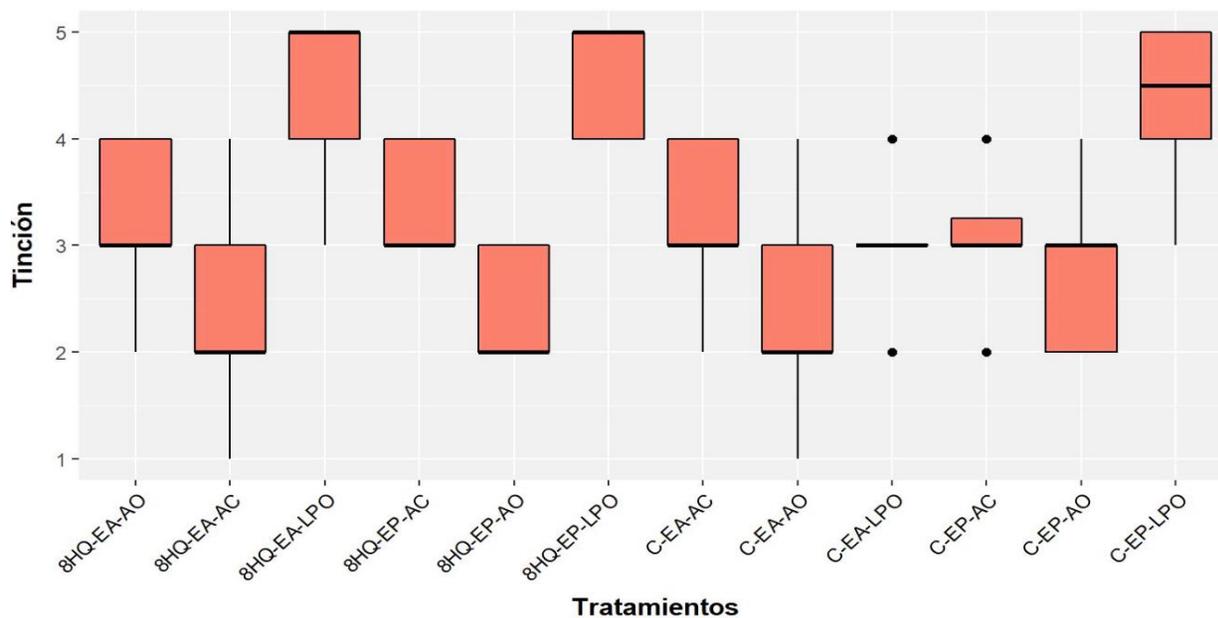
```
> dunnTest(Tincion~Tratamiento, data = data2,method = "bonferroni")
Dunn (1964) Kruskal-Wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.
```

| | Comparison | Z | P.unadj | P.adj |
|----|------------------------|-------------|--------------|--------------|
| 1 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EA-AO | -3.51877294 | 4.335476e-04 | 2.861414e-02 |
| 2 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EA-LPO | -6.60572892 | 3.955661e-11 | 2.610736e-09 |
| 3 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EA-LPO | -3.08695598 | 2.022175e-03 | 1.334636e-01 |
| 4 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EP-AC | -3.32962997 | 8.696147e-04 | 5.739457e-02 |
| 5 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EP-AC | 0.18914297 | 8.499808e-01 | 1.000000e+00 |
| 6 | 8HQ-EA-LPO - 8HQ-EP-AC | 3.27609895 | 1.052517e-03 | 6.946611e-02 |
| 7 | 8HQ-EA-AC - 8HQ-EP-AO | 0.09992459 | 9.204042e-01 | 1.000000e+00 |
| 8 | 8HQ-EA-AO - 8HQ-EP-AO | 3.61869753 | 2.960895e-04 | 1.954190e-02 |
| 9 | 8HQ-EA-LPO - 8HQ-EP-AO | 6.70565351 | 2.005070e-11 | 1.323346e-09 |
| 10 | 8HQ-EP-AC - 8HQ-EP-AO | 3.42955456 | 6.045729e-04 | 3.990181e-02 |

En las comparaciones en las que el valor-p es menor que 0.05 se concluye que existe diferencia en dichos tratamientos. Mientras que aquellos con un valor-p mayor de 0.05 son tratamientos estadísticamente muy similares (en relación a la variable que se esté estudiando).

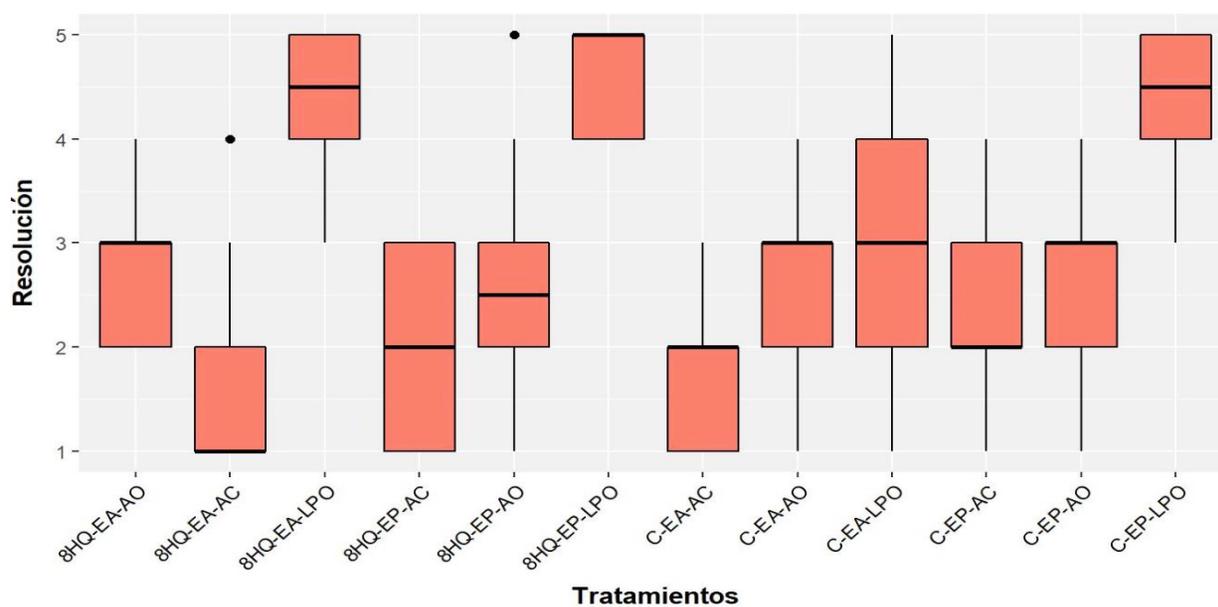
Con el objetivo de visualizar gráficamente los resultados de este análisis estadístico se obtuvo un gráfico de cajas para discriminar los mejores tratamientos obtenidos.

Figura 18. Diagrama de cajas obtenido con los datos de la variable resolución.



Nota: 8HQ: 8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmín, AO: aceto- orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

Figura 19. Diagrama de cajas obtenido con los datos de la variable tinción.



Nota: 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmin, AO: aceto-orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

Con el gráfico de cajas de los resultados de la variable de resolución de los tratamientos se aprecia que el tratamiento con la media más alta (un valor máximo de 5 en la escala establecida) fue aquel en el que el pretratamiento se realizó con 8-hidroxiquinoleína 2mM, fijación con etanol: ácido propiónico (3:1) y tinción con lacto-propiono-orceína.

En el gráfico de cajas para la variable tinción, dos son los tratamientos con el máximo valor en la escala de tinción “8HQ-EA-LPO” y “8HQ-EP-LPO”, sin embargo teniendo en cuenta que este último es también el mejor tratamiento para obtener una buena resolución y observando que la dispersión de los datos que se observa en la caja es menor (datos más centrados en la media) se escoge finalmente el tratamiento “8HQ-EP-LPO” como el mejor para la observación de los cromosomas con una media de 5 para la variable resolución y de 5 para la variable de tinción, siendo ambos los valores máximos en las escalas establecidas.

El protocolo básico encontrado para la observación de cromosomas metafásicos bien definidos y teñidos es el siguiente:

1. Pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína 2mM durante 4 horas en frío (4°C)
2. Fijación con etanol: ácido propiónico (3:1), 24 h, 4°C.
3. Digestión enzimática con celulasa 2% y pectinasa 20% por 2 horas a 37°C.
4. Tinción con lacto-propiono-orceína por 24h.

Tabla 10.

Células metafásicas observadas con los tres mejores tratamientos encontrados y valores promedio de la resolución y tinción de los cromosomas.

| Tratamiento | Resolución | Tinción | Imagen |
|-------------|------------|---------|--|
| 8HQ-EP-LPO | 5.0 | 5.0 |  |
| 8HQ-EA-LPO | 4.5 | 5.0 |  |
| C-EP-LPO | 4.5 | 4.5 |  |

Nota: 8HQ:8-hidroxiquinoleína, C: colchicina, EA: etanol: ácido acético, EP: etanol: ácido propiónico, AC: aceto -carmin, AO: aceto-orceína y LPO: lacto-propiono-orceína.

4.2 CÁLCULOS DEL ÍNDICE MITÓTICO Y DE LA HORA DE MAYOR ÍNDICE MITÓTICO.

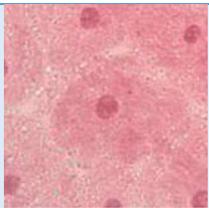
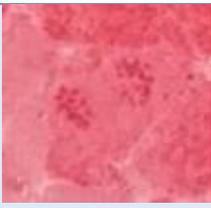
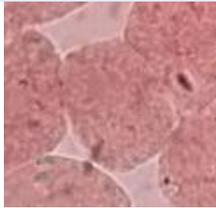
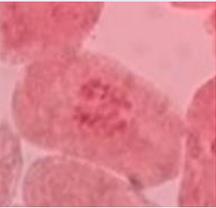
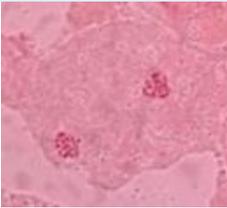
Con el protocolo básico anteriormente obtenido se determinó el índice mitótico (IM%) (Figura 20) y el índice de fases para la metafase (IFm%) (Figura 21) desde las 6 de la mañana hasta

las 6 de la tarde con intervalos de media hora. Esto se realizó con el objetivo de determinar la hora de mayor índice mitótico para trabajar posteriormente en ese periodo obteniendo un mayor porcentaje de células metafásicas que faciliten una adecuada observación de los cromosomas.

Se fotografiaron células en distintas fases del ciclo celular (Tabla 11) con el fin de establecer diferencias en las características de cada una de las fases y tener así una guía que facilitara el conteo de las células en mitosis.

Tabla 11.

Células de V. stipulata en las distintas fases de división celular. Fotografías obtenidas con ocular de 10X y objetivo de 100X (magnificación total 1000X).

| Interfase | Profase | Metafase | Anafase | Telofase |
|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

El número mínimo de células contabilizadas por cada intervalo de tiempo fue de 1500 células. En cada una de las horas estudiadas se determinó el índice de fases total de acuerdo al total de células contabilizadas. En la Tabla 12 se detallan los valores expresados en porcentaje de cada una de las fases de división celular. Quedó claro que un gran porcentaje de las células contabilizadas (más del

90%) se encontraban en interfase en cualquiera de los intervalos de tiempo analizados siendo el porcentaje restante las células que se encuentran en mitosis.

Tabla 12.

Evaluación de los Índices de Fases (IF%) e Índices Mitóticos (IM%) desde las 6:00 hasta las 18:00 con intervalos de media hora.

| Hora | Células contadas | Interf. IF(%) | Prof. IF(%) | Metaf. IF(%) | Anaf. IF(%) | Telof. IF(%) | IM(%) |
|--------------|---------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|
| 06:00 | 1545 | 97.09 | 1.55 | 1.11 | 0.19 | 0.06 | 2.91 |
| 06:30 | 1669 | 95.87 | 3.06 | 0.72 | 0.3 | 0.06 | 4.14 |
| 07:00 | 1594 | 94.79 | 2.63 | 1.26 | 0.5 | 0.56 | 4.95 |
| 07:30 | 1654 | 90.74 | 5.5 | 2.90 | 0.54 | 0.32 | 9.26 |
| 08:00 | 1609 | 93.78 | 3.42 | 1.68 | 0.37 | 0.75 | 6.22 |
| 08:30 | 1548 | 97.03 | 1.03 | 1.42 | 0.06 | 0.46 | 2.97 |
| 09:00 | 1559 | 96.67 | 1.60 | 1.41 | 0.26 | 0.06 | 3.33 |
| 09:30 | 1564 | 97.36 | 1.09 | 0.90 | 0.51 | 0.13 | 2.64 |
| 10:00 | 1560 | 98.33 | 0.71 | 0.77 | 0.13 | 0.06 | 1.67 |
| 10:30 | 1506 | 96.82 | 1.79 | 1.00 | 0.33 | 0.07 | 3.19 |
| 11:00 | 1510 | 97.82 | 1.26 | 0.66 | 0.26 | 0 | 2.18 |
| 11:30 | 1515 | 96.15 | 1.6 | 1.85 | 0.33 | 0.07 | 3.85 |
| 12:00 | 1535 | 97.26 | 1.37 | 1.11 | 0.13 | 0.13 | 2.74 |
| 12:30 | 1500 | 95.66 | 2.17 | 1.88 | 0.11 | 0.18 | 4,34 |
| 13:00 | 1501 | 98.06 | 1.13 | 0.67 | 0.07 | 0.07 | 1.94 |
| 13:30 | 1511 | 98.21 | 0.86 | 0.66 | 0.2 | 0.07 | 1.79 |
| 14:00 | 1505 | 96.02 | 2.13 | 1.59 | 0.13 | 0.13 | 3.98 |
| 14:30 | 1522 | 97.96 | 1.12 | 0.72 | 0 | 0.2 | 2.04 |
| 15:00 | 1550 | 97.61 | 1.42 | 0.84 | 0 | 0.13 | 2.39 |
| 15:30 | 1511 | 96.95 | 1.39 | 1.13 | 0.40 | 0.13 | 3.05 |
| 16:00 | 1512 | 97.42 | 1.06 | 0.99 | 0.40 | 0.13 | 2.58 |
| 16:30 | 1528 | 97.43 | 1.51 | 0.92 | 0.07 | 0.07 | 2.57 |
| 17:00 | 1509 | 95.69 | 1.86 | 1.92 | 0.40 | 0.13 | 4.31 |
| 17:30 | 1510 | 95.96 | 1.72 | 1.79 | 0.33 | 0.2 | 4.04 |
| 18:00 | 1521 | 95.81 | 0.97 | 2.17 | 0.66 | 0.39 | 4.19 |

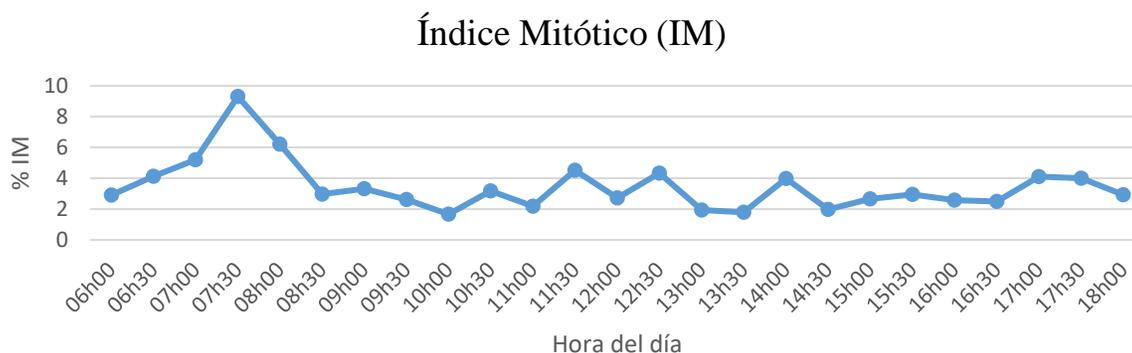


Figura 20. Índice mitótico parcial (% IM) de células del tejido meristemático radicular en jigacho calculado a diferentes horas del día.

La hora de mayor índice mitótico fue a las 07h30 de la mañana en donde el índice mitótico fue de 9,31% y el valor del índice de metafase en relación a la mitosis de 31,17%. Una vez obtenida esta hora, la toma de muestras posteriores se realizó a las 07h30 de la mañana para obtener mayor número de células en división (y por ende más células en metafase).

Se determinó además que la metafase representa alrededor del 40% de las células que se encuentran en mitosis (Figura 21).

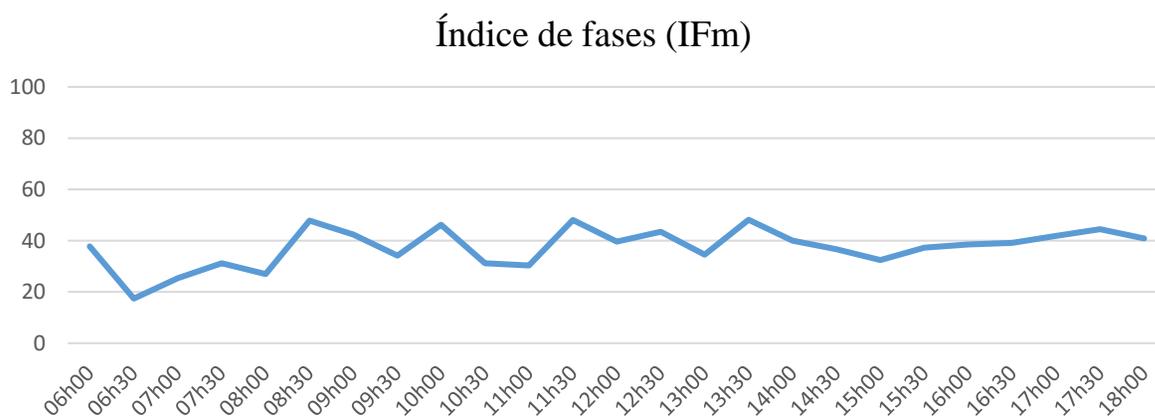


Figura 21. Índice de fase para metafase (% IFm) de células del tejido meristemático radicular en jigacho calculado a diferentes horas del día.

Se observó además que la fase de metafase dura aproximadamente un 40% del tiempo que dura la mitosis en el ciclo de división celular (Figura 21).

4.3 NÚMERO CROMOSÓMICO

Con el protocolo obtenido las células metafásicas presentaron cromosomas bien teñidos, claros y dispersos que permitió el conteo de los mismos y así determinar la existencia de 18 cromosomas metafásicos. El jigacho como el resto de las especies de *Vasconcellea* es diploide por lo que se determinó un número cromosómico de $2n=2x=18$ tras el conteo de 35 células metafásicas.

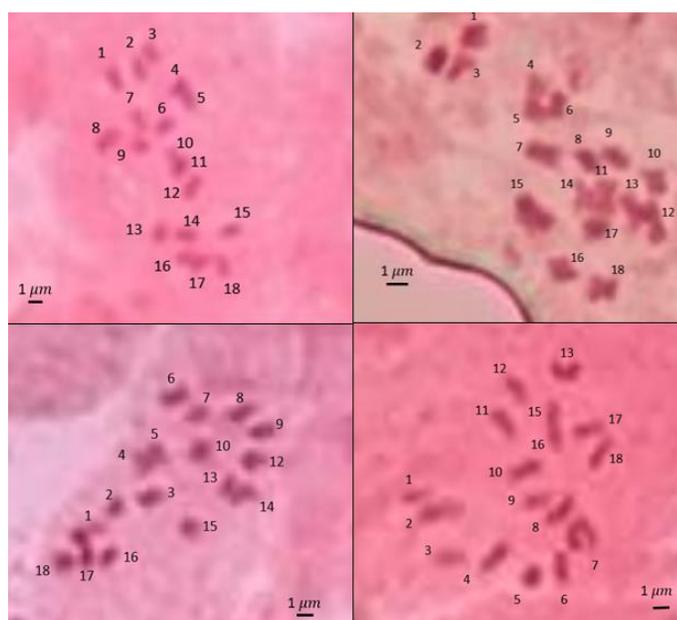


Figura 22. Células metafásicas de meristemos radicales de jigacho donde se observa que el número cromosómico de la especie es de $2n=2x=18$.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

4.4.1 Modificaciones en el protocolo básico para una mejor observación de cromosomas metafásicos para la obtención del cariotipo.

Para la caracterización de los cromosomas metafásicos del jigacho partiendo del protocolo básico anteriormente encontrado, se fueron realizando modificaciones que permitieron mejorar la observación de los cromosomas con una mayor calidad. Todos los cambios realizados en el protocolo se hicieron en base a revisiones bibliográficas.

Los cambios realizados fueron los siguientes:

- Aumento de las horas de digestión enzimática de 2 horas a 4-5 horas.

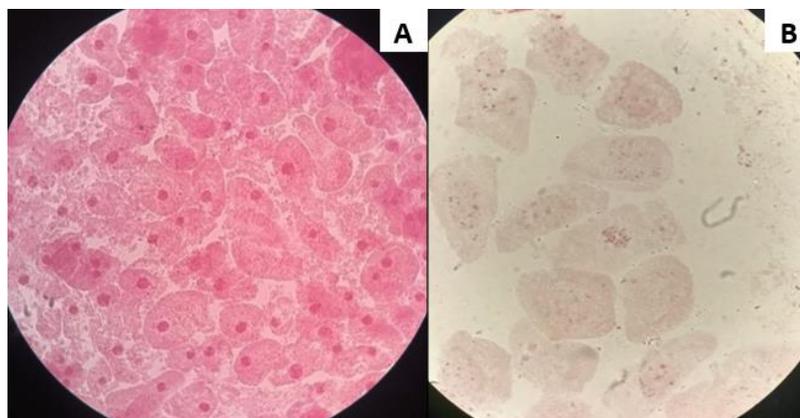


Figura 23. Diferencias en las células meristemáticas al variar las horas de digestión enzimática.

Nota: A) Tratamiento con 2 horas en enzimas (37°C), B) células tratadas con 4 horas de digestión enzimática (37°C).

- Tratamiento hipotónico por 30 minutos con KCl 75 mM después de la digestión enzimática.

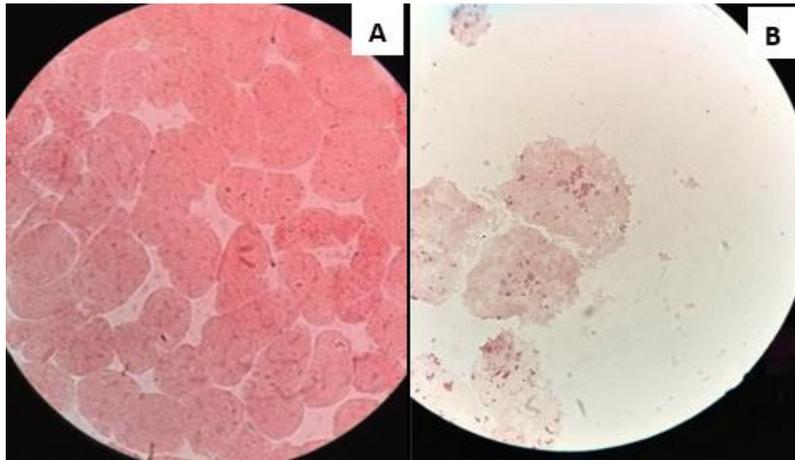


Figura 24. Diferencias en las células al añadir un tratamiento hipotónico después de la digestión enzimática.

Nota: A) Células sin tratamiento hipotónico, B) células con tratamiento hipotónico (KCl 75 mM, 30 min).

- Preparación de las placas mediante la técnica por goteo y vapor.

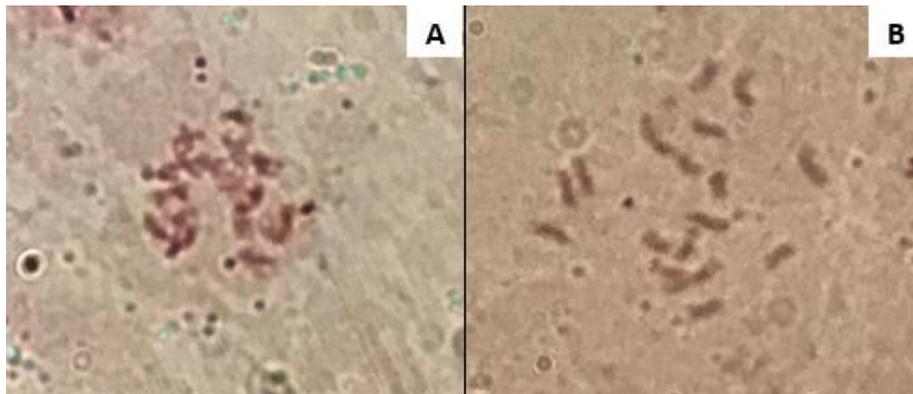


Figura 25. Diferencias en la dispersión de los cromosomas metafásicos.

Nota: A) Placa realizada sin aplicación de vapor, B) placa realizada con la adición de vapor por 10s, B).

4.4.2 Parámetros para la caracterización del cariotipo.

Con la ayuda del software MicroMeasure versión 3.3 se pudieron realizar las mediciones de distintos parámetros de los cromosomas. Se tomaron un total de 35 fotografías de células metafásicas con la cámara de un celular iPhone 7 Plus con cámara de 12 MP y aumento digital de 3x en un microscopio Olympus BX41 con ocular de 16X y objetivo máximo de 100X. La magnificación final de las imágenes fue de 4600X.

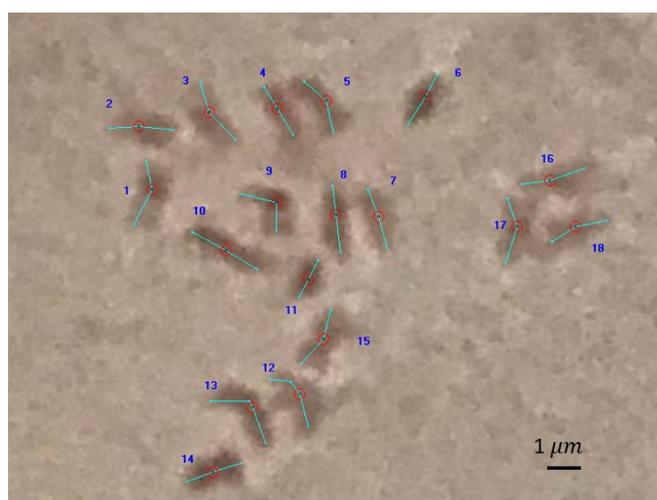


Figura 26. Primera célula metafásica analizada en MicroMeasure versión 3.3.

Nota: (Los círculos rojos marcan el centrómero observado en los cromosomas mientras que las líneas azules marcan la longitud de ambos brazos de los cromosomas).

MicroMeasure es un software que arroja los resultados finales por cada placa metafásica analizada en formato de una hoja de cálculo Excel. Los datos proporcionados para cada placa metafásica medida fueron agrupados. Para la obtención de la media y del intervalo de confianza

para cada uno de los parámetros analizados se utilizó el software RStudio. Finalmente se construyó la tabla siguiente donde se recogió toda la información.

Tabla 13.

Parámetros proporcionados por el software MicroMeasure tras la medición de 35 células metafásicas.

| N° cromosoma | LT(μm) | q(μm) | p(μm) | R | CI | LR(%) | Tipo |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|------------|-------------|---------------|------|
| 1 | 2.44±0.056 | 1.37±0.037 | 1.07±0.047 | 1.30±0.073 | 0.441±0.012 | 7.36±0.146 | m |
| 2 | 2.30±0.058 | 1.26±0.048 | 1.03±0.037 | 1.25±0.068 | 0.441±0.014 | 6.91±0.099 | m |
| 3 | 2.18±0.058 | 1.19±0.043 | 0.99±0.036 | 1.22±0.067 | 0.453±0.012 | 6.55±0.103 | m |
| 4 | 2.12±0.061 | 1.16±0.044 | 0.96±0.030 | 1.22±0.050 | 0.452±0.009 | 6.34±0.079 | m |
| 5 | 2.05±0.055 | 1.13±0.037 | 0.93±0.032 | 1.23±0.054 | 0.451±0.010 | 6.15±0.060 | m |
| 6 | 2.00±0.055 | 1.07±0.036 | 0.92±0.039 | 1.17±0.057 | 0.462±0.011 | 6.00±0.049 | m |
| 7 | 1.97±0.055 | 1.12±0.049 | 0.845±0.039 | 1.36±0.105 | 0.430±0.017 | 5.89±0.050 | m |
| 8 | 1.93±0.052 | 1.06±0.038 | 0.851±0.033 | 1.25±0.061 | 0.446±0.012 | 5.77±0.050 | m |
| 9 | 1.88±0.055 | 1.04±0.037 | 0.844±0.033 | 1.25±0.062 | 0.448±0.011 | 5.64±0.057 | m |
| 10 | 1.84±0.053 | 1.03±0.038 | 0.817±0.037 | 1.29±0.094 | 0.443±0.015 | 5.52±0.055 | m |
| 11 | 1.79±0.055 | 1.00±0.046 | 0.787±0.040 | 1.30±0.113 | 0.442±0.018 | 5.37±0.060 | m |
| 12 | 1.75±0.055 | 0.95±0.032 | 0.805±0.034 | 1.19±0.050 | 0.459±0.010 | 5.24±0.058 | m |
| 13 | 1.70±0.057 | 0.97±0.067 | 0.755±0.038 | 1.29±0.121 | 0.444±0.017 | 5.08±0.068 | m |
| 14 | 1.62±0.049 | 0.88±0.035 | 0.741±0.029 | 1.21±0.071 | 0.457±0.013 | 4.86±0.068 | m |
| 15 | 1.56±0.044 | 0.85±0.029 | 0.707±0.028 | 1.22±0.072 | 0.453±0.012 | 4.68±0.082 | m |
| 16 | 1.51±0.044 | 0.83±0.032 | 0.681±0.032 | 1.25±0.100 | 0.451±0.015 | 4.52±0.092 | m |
| 17 | 1.43±0.047 | 0.79±0.032 | 0.645±0.026 | 1.23±0.063 | 0.451±0.012 | 4.30±0.108 | m |
| 18 | 1.27±0.041 | 0.71±0.029 | 0.568±0.024 | 1.26±0.073 | 0.446±0.013 | 3.83±0.126 | m |
| Longitud total del set cromosómico (TCL)(μm): | | | | | | 33,38 ± 0.803 | |

Nota: LT: longitud total del cromosoma, q: longitud del brazo largo, p: longitud del brazo corto, r: relación de brazos, CI: índice centromérico, LR: longitud relativa.

Las mismas 35 fotografías obtenidas de las células metafásicas fueron analizadas con el software Karyotype Analysis 2.0 obteniéndose los datos que se presentan a continuación:

- Grado de asimetría del cariotipo(Stebbins,1971): 1 A
- Fórmula cariotípica: $2n = 2x = 18m$

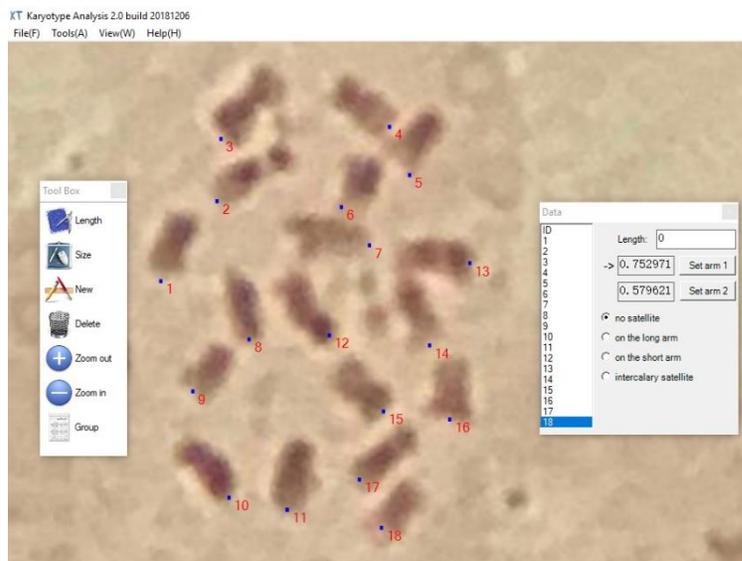


Figura 27. Primera célula metafásica analizada en Karyotype Analysis 2.0.

Nota: Los círculos rojos marcan el centrómero observado en los cromosomas mientras que las líneas azules marcan la longitud de ambos brazos de los cromosomas.

Al igual que MicroMeasure, Karyotype Analysis proporciona información promedio y con el intervalo de confianza de la longitud del brazo largo (q) y brazo corto (p), longitud total (q+p), diferencia en la longitud de los brazos (q-p) y la relación de brazos de cada cromosoma (r). La ventaja de este software resultó en que después de la medición de los cromosomas de cada placa metafásica los datos fueron almacenados y posteriormente agrupados automáticamente para obtener el valor promedio de todos los parámetros analizados. En la tabla 14 se detallan los valores obtenidos para cada uno de los cromosomas.

Tabla 14.

Mediciones promedio de las 35 células metafásicas de los 18 cromosomas totales. q: longitud brazo largo, p: longitud brazo corto, q+p: longitud total del cromosoma, q-p: diferencia longitud brazo largo y brazo corto, r: relación de longitudes de brazos.

| Crom. | q (µm) | p(µm) | q+p (µm) | q-p (µm) | r | Par Hom. |
|--------------|---------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|
| 1 | 1.24±0.15 | 1.09±0.13 | 2.33±0.22 | 0.16±0.17 | 1.14±0.20 | 1 |
| 2 | 1.25±0.13 | 1.10±0.12 | 2.36±0.23 | 0.15±0.11 | 1.14±0.12 | 1 |
| 3 | 1.14±0.13 | 1.01±0.10 | 2.15±0.20 | 0.13±0.11 | 1.13±0.11 | 2 |
| 4 | 1.13±0.12 | 0.97±0.11 | 2.11±0.18 | 0.16±0.13 | 1.16±0.18 | 2 |
| 5 | 1.05±0.09 | 0.93±0.10 | 1.98±0.17 | 0.12±0.08 | 1.13±0.10 | 3 |
| 6 | 1.07±0.11 | 0.94±0.11 | 2.01±0.19 | 0.13±0.10 | 1.14±0.12 | 3 |
| 7 | 1.01±0.12 | 0.87±0.11 | 1.89±0.18 | 0.14±0.14 | 1.16±0.22 | 4 |
| 8 | 1.02±0.13 | 0.89±0.10 | 1.91±0.19 | 0.14±0.12 | 1.16±0.16 | 4 |
| 9 | 0.97±0.10 | 0.84±0.10 | 1.81±0.16 | 0.13±0.11 | 1.15±0.15 | 5 |
| 10 | 0.97±0.11 | 0.86±0.10 | 1.83±0.18 | 0.11±0.11 | 1.13±0.14 | 5 |
| 11 | 0.92±0.08 | 0.82±0.08 | 1.74±0.13 | 0.11±0.10 | 1.13±0.14 | 6 |
| 12 | 0.91±0.09 | 0.81±0.09 | 1.72±0.17 | 0.10±0.08 | 1.12±0.11 | 6 |
| 13 | 0.87±0.09 | 0.76±0.09 | 1.63±0.15 | 0.11±0.10 | 1.14±0.15 | 7 |
| 14 | 0.87±0.08 | 0.77±0.08 | 1.64±0.14 | 0.10±0.08 | 1.13±0.11 | 7 |
| 15 | 0.82±0.09 | 0.72±0.09 | 1.54±0.16 | 0.10±0.08 | 1.13±0.13 | 8 |
| 16 | 0.80±0.08 | 0.69±0.10 | 1.49±0.16 | 0.10±0.09 | 1.15±0.19 | 8 |
| 17 | 0.76±0.10 | 0.64±0.10 | 1.40±0.18 | 0.12±0.08 | 1.18±0.14 | 9 |
| 18 | 0.71±0.09 | 0.60±0.07 | 1.30±0.14 | 0.11±0.08 | 1.18±0.16 | 9 |

Tabla 15.

Mediciones promedio de las 35 células metafásicas de los 9 pares de cromosomas homólogos. q: longitud brazo largo, p: longitud brazo corto, q+p: longitud total del cromosoma, q-p: diferencia longitud brazo largo y brazo corto, r: relación de brazos y CI (%): índice centromérico.

| Par homólogo | q | P | q+p | q-p | r | CI(%) |
|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|--------------|
| 1 | 1.25±0.12 | 1.10±0.11 | 2.34±0.19 | 0.15±0.11 | 1.14±0.11 | 46.74±2.30 |
| 2 | 1.14±0.12 | 0.99±0.09 | 2.13±0.17 | 0.14±0.12 | 1.15±0.13 | 46.60±2.54 |
| 3 | 1.06±0.09 | 0.94±0.10 | 2.00±0.17 | 0.12±0.08 | 1.13±0.09 | 46.88±1.99 |
| 4 | 1.02±0.12 | 0.88±0.09 | 1.90±0.18 | 0.14±0.12 | 1.16±0.16 | 46.36±3.05 |
| 5 | 0.97±0.10 | 0.85±0.08 | 1.82±0.15 | 0.12±0.10 | 1.14±0.13 | 46.72±2.62 |
| 6 | 0.92±0.08 | 0.81±0.08 | 1.73±0.14 | 0.10±0.08 | 1.13±0.12 | 47.00±2.47 |
| 7 | 0.87±0.08 | 0.77±0.08 | 1.64±0.13 | 0.10±0.08 | 1.13±0.12 | 46.91±2.52 |
| 8 | 0.81±0.07 | 0.71±0.08 | 1.52±0.14 | 0.10±0.07 | 1.14±0.13 | 46.71±2.53 |
| 9 | 0.73±0.07 | 0.62±0.07 | 1.35±0.12 | 0.11±0.07 | 1.18±0.13 | 45.83±2.63 |

Tabla 16.

Mediciones promedio de las longitudes relativas de las 35 células metafásicas en los 18 cromosomas totales: q (%): longitud relativa del brazo largo, p (%): longitud relativa del brazo corto, q+p (%): longitud relativa total de cada par cromosómico, Tipo: clasificación de cada cromosoma según la posición de su centrómero (m= metacéntrico).

| Longitudes relativas de cada cromosoma metafásico | | | | |
|--|-------------|-------------|----------------|-------------|
| Cromosoma | q(%) | p(%) | q+p (%) | Tipo |
| 1 | 3.78 | 3.31 | 3.78+3.31=7.10 | m |
| 2 | 3.82 | 3.36 | 3.82+3.36=7.17 | m |
| 3 | 3.47 | 3.07 | 3.47+3.07=6.54 | m |
| 4 | 3.44 | 2.97 | 3.44+2.97=6.41 | m |
| 5 | 3.19 | 2.84 | 3.19+2.84=6.03 | m |
| 6 | 3.26 | 2.86 | 3.26+2.86=6.12 | m |
| 7 | 3.08 | 2.66 | 3.08+2.66=5.75 | m |
| 8 | 3.12 | 2.70 | 3.12+2.70=5.82 | m |
| 9 | 2.95 | 2.56 | 2.95+2.56=5.51 | m |
| 10 | 2.96 | 2.62 | 2.96+2.62=5.58 | m |
| 11 | 2.81 | 2.49 | 2.81+2.49=5.30 | m |
| 12 | 2.77 | 2.46 | 2.77+2.46=5.23 | m |
| 13 | 2.65 | 2.33 | 2.65+2.33=4.98 | m |
| 14 | 2.65 | 2.36 | 2.65+2.36=5.01 | m |
| 15 | 2.50 | 2.20 | 2.50+2.20=4.70 | m |
| 16 | 2.43 | 2.11 | 2.43+2.11=4.54 | m |
| 17 | 2.30 | 1.95 | 2.30+1.95=4.25 | m |
| 18 | 2.15 | 1.82 | 2.15+1.82=3.96 | m |

Tabla 17.

Mediciones promedio de las longitudes relativas en las 35 células metafásicas de los 9 pares de cromosomas homólogos.

| Longitudes relativas de los pares homólogos | | | | | |
|--|-------------|-------------|-----------------|----------|-------------|
| Par homólogo | q(%) | p(%) | q+p (%) | R | Tipo |
| 1 | 7.60 | 6.67 | 7.60+6.67=14.27 | 1.14 | m |
| 2 | 6.92 | 6.04 | 6.92+6.04=12.96 | 1.15 | M |
| 3 | 6.46 | 5.70 | 6.46+5.70=12.15 | 1.13 | m |
| 4 | 6.20 | 5.36 | 6.20+5.36=11.56 | 1.16 | m |
| 5 | 5.91 | 5.18 | 5.91+5.18=11.09 | 1.14 | m |
| 6 | 5.58 | 4.95 | 5.58+4.95=10.53 | 1.13 | m |

CONTINÚA

| | | | | | |
|---|------|------|----------------|------|---|
| 7 | 5.30 | 4.68 | 5.30+4.68=9.98 | 1.13 | m |
| 8 | 4.92 | 4.32 | 4.92+4.32=9.24 | 1.14 | m |
| 9 | 4.45 | 3.76 | 4.45+3.76=8.21 | 1.18 | m |

Nota: *q*: longitud relativa del brazo largo, *p*: longitud relativa del brazo corto, *q+p*: longitud relativa total de cada par cromosómico, *r*: relación brazo largo y brazo corto de cada par cromosómico, Tipo: clasificación de cada par cromosómico según la posición de su centrómero (*m*= metacéntrico).

Tabla 18.

Índices de asimetría promedio de las 35 células metafísicas analizadas proporcionadas por el software Karyotype Análisis 2.0

| Índices de asimetría | | |
|---|-------------|--------------|
| Parámetro | Abreviación | Valor |
| Coefficiente de variación del índice centromérico (Paszko, 2006) | CVCI | 5.02 ± 0.57 |
| Coefficiente de variación de la longitud cromosómica (Paszko, 2006) | CVCL | 17.36 ± 0.75 |
| Promedio de la asimetría centromérica (Peruzzi and Eroglu, 2013) | MCA | 6.75 ± 0.68 |
| Índice de asimetría cariotípica (Arano, 1963) | AsK% | 53.37 ± 0.34 |
| Porcentaje de la forma total (Huziwara, 1962) | TF% | 46.66 ± 0.35 |
| Índice de simetría del cariotipo (Greilhuber and Speta, 1976) | Syi | 87.54 ± 1.21 |
| Índice de semejanza cromosómica de tamaño (Greilhuber and Speta, 1976) | Rec | 74.89 ± 1.35 |

CONTINÚA

| | | |
|--|----|-------------|
| Índice de asimetría intracromosomal (Romero Zarco, 1986) | A1 | 0.12 ± 0.01 |
| Índice de asimetría intercromosomal (Romero Zarco, 1986) | A2 | 0.17 ± 0.01 |
| Grado de asimetría del cariotipo. (Watanabe et al., 1999) | A | 0.07 ± 0.01 |
| Índice de dispersión (Lavana and Srivastava, 1992) | DI | 8.10 ± 0.35 |
| Índice de asimetría (Paszko, 2006) | AI | 0.88 ± 0.11 |

Tabla 19.

Información adicional proporcionada por el software Karyotype Analysis 2.0

| Otra información | | |
|---|--------------------|--------------|
| Parámetro | Abreviación | Valor |
| Cromosoma más largo/cromosoma más corto | - | 1.99 ± 0.09 |
| Longitud haploide total del set cromosómico (Peruzzi et al., 2009) | THL | 16.42 ± 0.40 |

En cada una de las células metafásicas que se analizaron además de los datos de las distintas mediciones se pudieron obtener otros gráficos como el gráfico de agrupación de los cromosomas homólogos y el ideograma en cada uno de los sets cromosómicos analizados.

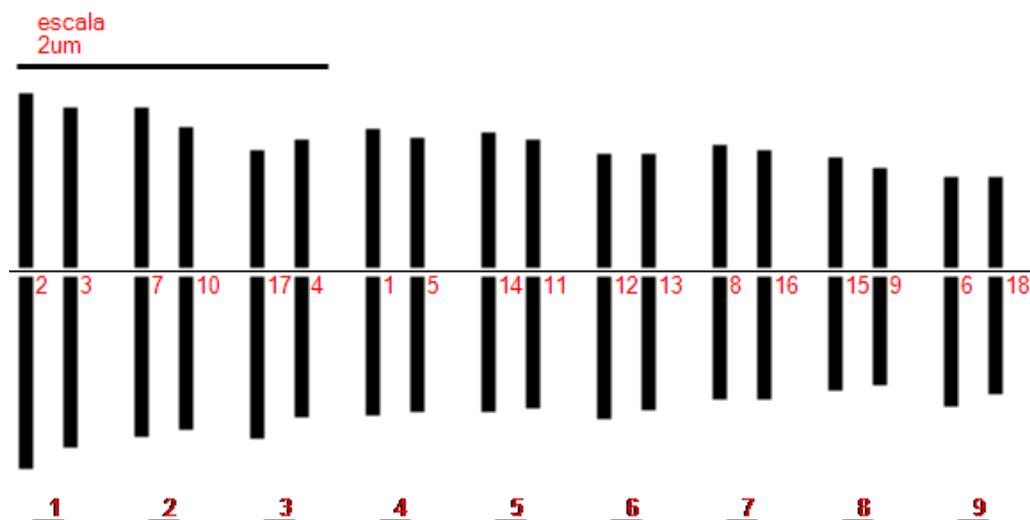


Figura 28. Ideograma obtenido con el software Karyotype Analysis 2.0 después realizar las mediciones de los cromosomas de unas de las fotos de las células metafásicas obtenidas.

4.4.3 Obtención del cariotipo

La mejor placa metafásica fotografiada (Anexo A: foto 28) permitió obtener el cariotipo de *V. stipulata*:



Figura 29. Placa metafásica con cromosomas altamente condensados utilizada para la elaboración del cariotipo.

El cariotipo obtenido (Figura 31) representa los 18 cromosomas metafásicos de *V. stipulata*, ordenados de mayor a menor en pares homólogos y centrados en su centrómero. Cada par homólogo fue numerado secuencialmente (en total 9 pares homólogos). Todos los cromosomas fueron metacéntricos por lo que se les representó con la letra “m” en cada uno de los pares homólogos.

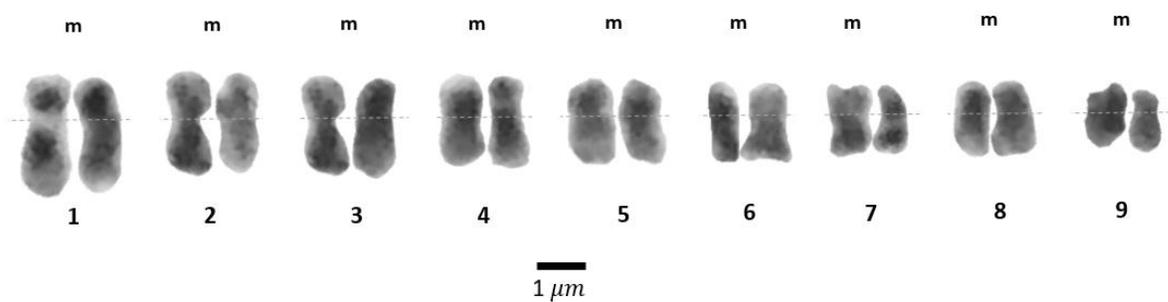


Figura 30. Cariotipo del jigacho (*V. stipulata*) con los pares homólogos cromosómicos ($2x=2n=18$).

4.4.4 Obtención del ideograma

Mediante el programa computacional Drawid se realizaron las mediciones de las 35 células metafísicas con las que automáticamente se obtuvieron los ideogramas promedio, el primero representando los 18 cromosomas totales (Figura 33) y el segundo agrupando los pares de cromosomas homólogos (Figura 34).

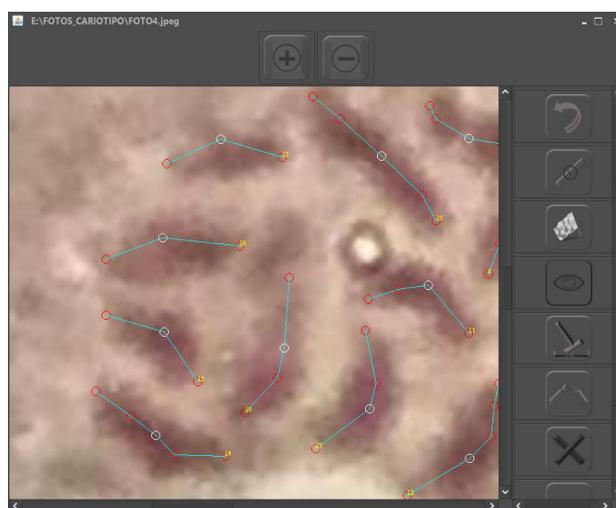


Figura 31. Ventana de trabajo del programa computacional DRAWID con las herramientas que ofrece para la medición de los cromosomas y la elaboración del ideograma.

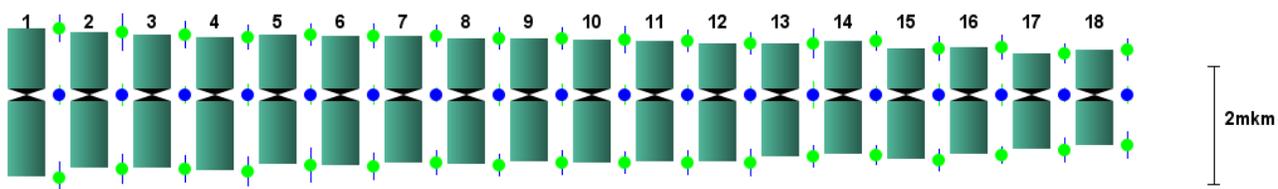


Figura 32. Ideograma del jigacho (*V. stipulata*) representado por los con 18 cromosomas totales del set (barra=2 µm).

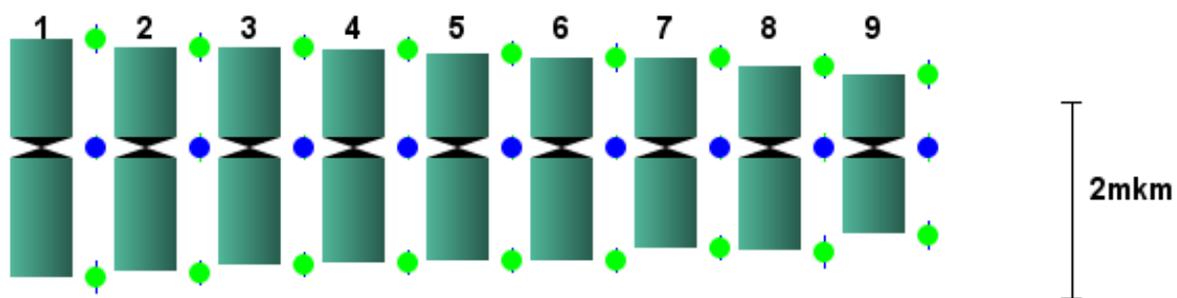


Figura 33. Ideograma del jigacho (*V. stipulata*) representado por los nueve pares de cromosomas homólogos (barra= 2 μ m).

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.5 FASE PRELIMINAR

4.5.1 Instalación del material vegetal en condiciones de invernadero

V. stipulata es una especie que se cultiva en pequeña escala en zonas del sur de Ecuador. Los frutos son consumidos por los pobladores bien sea en almíbar, conservas o guisos (Medina & Villafuerte, 2005). El cultivo de estas plantas bajo condiciones de invernadero y sobre todo a elevadas altitudes permite aumentar la producción y mantener plantas de mejor calidad bajo condiciones controladas (Velázquez-Martí & Castillo, 2017). Por esta razón, todas las plantas utilizadas en el presente estudio fueron mantenidas en el interior de un invernadero, disminuyendo la influencia de factores externos en el estado de las plantas.

El suelo donde se desarrolla el jigacho son suelos con una elevada cantidad de materia orgánica con un pH entre 5.5 y 6.8 (Remuzgo, 2011). Además los mejores sustratos para enraizamiento son aquellos que presentan una mezcla de distintos materiales como arena, pomina, tierra negra y turba (Cholota, 2013). Por ello, para el enraizamiento de las plantas jóvenes de jigacho se utilizó una mezcla de tierra negra, humus y cascarilla de arroz en proporciones 1:1:1 que permitió obtener un mayor volumen radicular además de un aumento del área foliar. Es decir, que el sustrato utilizado cumplía con las funciones principales que un medio debe tener para el desarrollo y crecimiento de la planta: punto de apoyo estable, capacidad de retener humedad, porosidad suficiente para un buen contacto raíz-atmósfera y sobretodo buena disponibilidad de nutrientes (VIFINEX, 2002).

Con el uso adicional de enraizantes se puede conseguir que la planta tenga un sistema radicular denso y fuerte para el desarrollo de la planta. Generalmente, estos productos proporcionan

potasio y fósforo que agilizan el crecimiento de raíces externas así como también contienen aminoácidos que facilitan una mejor producción de proteínas para la plantas (Flores, 2014). La función de dichos enraizantes es estimular el crecimiento de las raíces y mejorar sus niveles de absorción de nutrientes y agua (grupo IÑESTA, 2019). Con el mismo objetivo de aumentar el volumen radicular se aplicaron vía suelo cada 3 semanas dos enraizantes orgánicos, Razormín® y BIO-ROOTS® de acuerdo a las cantidades indicadas en cada uno de los productos obteniendo raíces abundantes y de calidad.

4.5.2 Muestreo en el invernadero

Los ápices de las raíces jóvenes presentan tejido meristemático con un alto nivel de división celular (Paniagua, 2007). Además, este tejido es más fácil de obtener de cualquier tipo de planta en cantidades considerables para ser estudiado. En un estudio realizado por Rondón en 2013 se utilizaron ápices de raíces jóvenes de 1 a 3 cm de longitud que garantizaron la presencia de células meristemáticas con una elevada actividad metabólica y un alto nivel de división celular. Siguiendo esta metodología en este estudio, aproximadamente unos 2 cm de las raíces más jóvenes que no presentaban tejido dañado fueron tomados como muestra. Para eliminar cualquier resto de tierra o de contaminantes se lavaron con agua destilada hasta dejarlas completamente limpias. Posteriormente y a la brevedad posible se transfirieron a la solución de pretratamiento para ser transportadas al laboratorio.

4.6 FASE DE LABORATORIO

4.6.1 FASE I: Estandarización de un protocolo para la observación de células radicales metafásicas.

El método denominado “squash” o aplastamiento que se utilizó en este trabajo es uno de los procedimientos citogenéticos clásicos que mediante la tinción de los cromosomas presentes en tejidos meristemáticos en plantas permite de forma sencilla, rápida y sin necesidad de equipos especializados estudiar los cromosomas de la especie de interés (Mártonfiováa, 2013). Por esta razón se eligió este procedimiento para la observación y caracterización de los cromosomas de *V. stipulata*.

La gran mayoría de estudios citogenéticos necesitan que los cromosomas se encuentren completamente condensados y lo más dispersos posibles para su observación, por tal motivo las distintas mediciones se realizan en las mejores placas donde se observaron cromosomas con un adecuado nivel de condensación y bien dispersos entre ellos permitiendo que la caracterización de los mismos presente el menor número de errores posible (Mártonfiováa, 2013).

Con el fin de conseguir que las células se detengan en metafase y que los cromosomas mantengan su estructura sin pegarse entre ellos es necesario aplicar una serie de pasos y procedimientos donde se utilizan diferentes reactivos, cada uno con una finalidad específica (Tapia, 2014). Los pasos básicos para los procedimientos citogenéticos constan de un pretratamiento, fijación, digestión enzimática (en el caso de células vegetales) y tinción (Darlington & La Cour, 1969). Estos mismos procedimientos fueron los que se siguieron con el fin de visualizar cromosomas metafásicos de calidad en *V. stipulata*.

Es de importancia elegir adecuadamente los reactivos que se van a utilizar en cada uno de los procedimientos citogenéticos puesto que su acción depende de lo que se vaya a estudiar. Por ejemplo, la media de la longitud total de los cromosomas (TCL), unos de los parámetros más importantes en la caracterización del cariotipo, puede variar significativamente según los agentes químicos de pretratamiento utilizados y el tiempo de exposición aplicado (Mártonfiováa, 2013).

Los tejidos meristemáticos (con elevado nivel de división celular) en primer lugar son pretratados con sustancias que impiden la formación del huso mitótico como colchicina y 8-hidroxiquinoleína con el objetivo de aumentar el número de células en metafase, permitir la dispersión de los cromosomas en el interior del citoplasma y provocar un alto grado de condensación de ellos (Levitus & Echenique, 2010).

Tjio y Levan (1950) fueron los primeros en descubrir la utilidad de la 8-hidroxiquinoleína en el estudio de los cromosomas. Se recomienda utilizarla en concentración de 0,002 M por 3 a 5 horas a temperaturas entre 16 -18 °C. Por otro lado, la colchicina también utilizada como pretratamiento se recomienda usarla en bajas concentraciones entre 0.1-0.5% por 1 -2 horas a temperatura ambiente (Singh, 2003). Para determinar que pretratamiento mostraba mejores resultados tanto la colchicina como la 8-hidroxiquinoleína fueron estudiadas siguiendo las condiciones recomendadas bibliográficamente. Finalmente, tras el estudio realizado se obtuvieron los mejores resultados con 8-hidroxiquinoleína 0.002M por 4 horas en frío (4°C).

El siguiente paso que se siguió fue la fijación donde se utilizan reactivos que conservan la estructura de los tejidos sin provocar daños importantes en ellos (Castañeda & Santacruz, 2012). Otras de las funciones de la fijación es evitar la formación del huso mitótico, arrestar en metafase a los cromosomas y contraer los cromosomas (Singh, 2003). Una de las sustancias más utilizadas

es la solución fijadora Farmer que está compuesta por etanol y ácido acético glacial en proporciones 3:1 (Delgado & Lastra, 2010). También se utilizó un fijador compuesto por etanol (95-100%) y ácido propiónico en proporciones 3:1. Esta solución tal como menciona Singh (2003) es adecuada para plantas con cromosomas pequeños. Por esta razón el mejor protocolo obtenido para la visualización de células metafásicas fue con etanol: ácido propiónico 3:1 por 24 horas en refrigeración (4-5°C).

En la fase de digestión enzimática se eligió un coctel enzimático formado por una mezcla en proporciones iguales de pectinasa 20% y celulasa al 2%, mismo utilizado en algunos estudios citogenéticos realizados en especies de *Vasconcellea* por Santa y Freitas (2014) y por Caetano et al. (2008). Sin embargo, el tiempo de incubación utilizado por estos estudios no fue suficiente para digerir las paredes celulares de jigacho, por lo que se aumentó a 2 horas la digestión enzimática a la misma temperatura de incubación de 37°C, con la que sí se consiguió una mayor dispersión celular. La composición de las enzimas utilizadas dió grandes resultados debido a que la mayoría de las paredes celulares están compuestas principalmente por celulosa que le confieren rigidez y pectina que proporcionan a su vez porosidad, permeabilidad y elasticidad (Salazar & Gamboa, 2013).

El último paso para el tratamiento de las células fue la tinción de los cromosomas con colorantes específicos. Los colorantes que se probaron fueron aceto-carmín, aceto-orceína y lacto-propiono-orceína los mismos que Singh (2002) propone por ser adecuados para cromosomas de plantas. La tinción que mejores resultados proporcionó fue con lacto-propiono-orceína, que como se menciona en bibliografía tiñe intensamente los cromosomas y mantiene el citoplasma claro para

que haya un buen contraste (Singh, 2003). Según Dyer (1963) esta tinción es útil para especies con cromosomas de pequeño tamaño motivo por el cual fue el que mejor funcionó para *V. stipulata*.

Para la preparación de la placa se colocó un único ápice teñido previamente sobre un cubreobjetos y se colocó una gota del tinte para impedir que se seque la muestra. Los autores Talledo y Escobar (1995) mencionan que usar un único ápice permite que la presión ejercida sobre él haga que se expanda por toda la superficie disponible formando únicamente una monocapa de células. Tras el aplastamiento o *squash* pueden darse algunos problemas como que no se dispersen las células, rompimiento de estas, o que los cromosomas estén muy pegados entre ellos impidiendo su caracterización. Por tal motivo para cada uno de los 12 tratamientos propuestos se evaluaron los cromosomas de 20 células metafásicas.

El protocolo finalmente estandarizado para la observación de células metafásicas de *V. stipulata* consistió en un pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína 0.002M por 4 horas en frío (4°C), una fijación con etanol: ácido propiónico (3:1) durante 24 horas en frío (4°C), digestión enzimática con pectinasa 20% y celulasa 2% por 2 horas a 37°C y finalmente una tinción con lacto-propion-orceína (durante una noche) a temperatura ambiente. En un estudio anterior donde se realizaron análisis citogenéticas de varias especies del género *Vasconcellea* se utilizó un protocolo muy similar al obtenido en este estudio (Caetano et al., 2008).

4.6.2 FASE II: Cálculos del índice mitótico y de la hora de mayor índice mitótico

Karp (1998) y Hickman et al.(1998) mencionan que la mitosis es un procesos que se ha dividido en 4 fases para facilitar su análisis y estudio pero que sin embargo es un proceso continuo que carece de límites diferenciados entre cada etapa En este estudio igualmente se distinguieron 4 etapas de la división celular siendo ellas: profase, metafase, anafase y telofase.

La fase metafásica de la mitosis es de utilidad para la caracterización de los cromosomas debido a que en ella los cromosomas se encuentran en su máximo grado de condensación y bien definidos estructuralmente. Por este motivo la determinación de la hora mitótica facilita el estudio de los cromosomas (Ferrer & Alcorcés, 2007). De este modo la determinación de la hora mitótica fue uno de los procesos más importantes del presente estudio.

El momento de mayor división celular en el transcurso del día depende de cada especie, pero generalmente la hora de mayor división mitótica se encuentra en las horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am (Delgado & Uribe, 2010). Esto coincide con los resultados encontrados en la especie *V. stipulata* en donde la hora de mayor división celular es a las 07:30 de la mañana con un índice mitótico de 9,31% un valor elevado considerando el resto de valores a lo largo del día (Figura 20).

La hora de mayor índice mitótico es un aspecto característico para cada una de las especies e incluso dentro de la misma puede existir un grupo genotípico específico que presente variación en la hora mitótica con respecto al resto de los individuos de la especie (Ferrer & Alcorcés, 2007). En este caso, sin embargo, la hora mitótica encontrada para *V. stipulata* coincide con la hora mitótica de *V. x heilbornii* que determinó Estrella (2019), pudiendo ser que en este género la división celular sea mayor en esas horas de la mañana.

El valor de IM (9.31%) encontrado es bajo en relación con los que se han reportado en otras especies vegetales. En cuatro especies del género *Phaseolus*, el mayor índice mitótico fue a las 10:00 am con un valor máximo de 27.23 % mientras que en las especies del género *Oxalis* fue de 25.02% (Talledo & Ecobar, 1995). Incluso en un estudio realizado por Rodríguez y Bueno (2006) para la especie *Physalis peruviana* L. el índice mitótico encontrado fue de 85% entre las 09:00 y

09:30 de la mañana. Los valores bajos encontrados del índice mitótico encontrados para *V. stipulata* dificultan los estudios citogenéticos que se realizan con cromosomas metafásicos altamente condensados.

4.6.3 FASE III: Caracterización cromosómica

A la hora de realizar las mediciones en cada una de las placas pueden existir factores que produzcan variabilidad en los datos. Uno de ellos puede ser que las placas no se encuentren exactamente en el mismo estado de metafase, es decir, en unas células metafásicas los cromosomas pueden estar más o menos condensados que en otras. Por otro lado, como las células son sometidas al proceso mecánico-físico del squash es posible que unas células se encuentren más extendidas que otras haciendo que su contenido igualmente se expanda más (Molero, 2009). Esto fue apreciable en la preparación de las placas para la observación de cromosomas metafásicos motivo por el cual se realizaron una gran cantidad de placas de las cuales 35 fueron seleccionadas como las mejores para la caracterización del cariotipo.

En estudios anteriores, las mediciones se han realizado tan solo con 20 placas metafásicas (Molero, 2009), en otro con 30 placas (Rondón & Rache, 2012) coincidiendo en todos los casos en que los cromosomas medidos son de mayor tamaño permitiendo realizar las mediciones de forma más rápida y sin errores. En el presente estudio a pesar de la dificultad debido al bajo valor del índice mitótico encontrado y el pequeño tamaño de los cromosomas, las 35 placas metafásicas contabilizadas permitieron obtener resultados de mayor confianza en la caracterización cromosómica.

Los estudios del cariotipo permiten conocer el fenotipo de los cromosomas tanto su forma, número y tamaño; características de gran utilidad para determinar los cambios cromosómicos que

se han tenido lugar en diferentes grupos poblacionales durante su proceso de especiación (Fantini, 2015). Todas estas características fueron determinadas para los cromosomas de *V. stipulata* en este trabajo de investigación. Permite además conocer las relaciones evolutivas y determinar el origen de una especie o género y conocer qué pasos se han dado en el proceso de especiación, es por ello, que es una gran ayuda para los estudios sistemáticos. Por otro lado, el cariotipo permite saber si cruces interespecíficos para el mejoramiento de las especies resultarán factibles (Molero, 2009).

En el presente trabajo se confirmó que el número cromosómico diploide de *V. stipulata* es de $2n=2x=18$ tal como Gschwend (2013) lo había determinado. Además, todos sus cromosomas son metacéntricos según la clasificación de Levan et al. (1964). Estos resultados coinciden con las especies *V. cauliflora*, *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana* las cuales igualmente son especies diploides que presentan un número cromosómico $2n=2x=18$ (Caetano, et al. 2008). Estrella (2019) determinó además que *V. x heilbornii* ('Babaco') presentó igualmente un número cromosómico de $2n=2x=18$. Este número es de importancia en los procesos de mejora genética mediante cruces interespecíficos o bien para ayudar a definir hipótesis sobre la filogenia de grupos (Poggio et al., 2008). En las especies que se fueran a cruzar para evitar que existan desbalances en la meiosis o formación de embriones no viables los números cromosómicos de ambas deben ser iguales (Molero, 2009).

Especies donde se aprecia una gran variabilidad en el número cromosómico han sufrido procesos de rearrreglos cromosómicos, deleciones, translocaciones, inversiones entre otros (Winterfeld et al., 2017). Sin embargo, en la mayoría de las especies del género *Vasconcellea* el número cromosómico se ha mantenido constante (Santana et al., 2014). Así como *V. stipulata* en el resto de especies del género el número cromosómico se ha conservado siendo $2n=2x=18$ y

quedando claro que este se trata del número cromosómico ancestral del género. Sin embargo, es importante señalar la existencia de especies de los géneros *Jarilla* y *Horovitzia* (pertenecientes a la familia Caricaceae) que presentan casos de disploidia con números cromosómicos de $2n=14$ y $2n=16$ respectivamente (Rockinger et al. 2016).

Así como para *V.stipulata* para el resto de las especies de la familia Caricaceae los mecanismos de poliploidia no han interferido en los procesos de especiación y diversificación manteniéndose constante el número cromosómico ancestral. Sin embargo, en las especies de los géneros *Jarilla* y *Horovitzia* si se han dado procesos de rearrreglos cromosómicos como fusiones originando números cromosómicos menores (Antunes, 2015).

Con los resultados obtenidos se determinó que *V. stipulata* presenta un cariotipo con una fórmula cariotípica $18m$ ya que todos sus cromosomas fueron metacéntricos. Esto coincide con los datos encontrados por un estudio de Santa et al. (2014) en donde se estudiaron las características de los cromosomas de cinco especies de *Vasconcellea* (*V. goudotiana*, *V. quercifolia*, *V. cundinamarcensis*, *V. monoica* y *V. cauliflora*) y en todas ellas a excepción de una (*V. monoica*) presentaban un cariotipo con una fórmula $18m$, con pares cromosómicos metacéntricos. Generalmente, las especies pertenecientes a un determinado género taxonómico presentan características similares en sus cariotipos (Arroyo, 2014) por lo que se explica los resultados obtenidos de *V. stipulata* respecto a otras especies del género *Vasconcellea*.

Las mediciones realizadas con dos softwares citogenéticos son coincidentes y corroboraron los datos encontrados. Mediante el software MicroMeasure el tamaño del cromosoma más grande fue de $2.44 \pm 0.056 \mu$ y el del cromosoma más pequeño de $1.27 \pm 0.041 \mu$ mientras que con el software Karyotype Analysis el tamaño del cromosoma más grande fue de $2.33 \pm 0.22 \mu$ y del

cromosoma más pequeño de $1.30 \pm 0.14 \mu$. Por otro lado, el tamaño total del set cromosómico fue de $33.38 \pm 0.803 \mu$ con MicroMeasure y de $32.84 \pm 0.28 \mu$ con Karyotype Analysis. Pueden existir diferencias en las mediciones de los cromosomas debido a diferentes grados de condensación, y a la presión ejercida sobre la muestra entre otros, que afectan sobre todo a cariotipos con cromosomas pequeños (Sybenga, 1992). Sin embargo, con las 35 mediciones realizadas se disminuyeron estos errores. Los valores encontrados de la longitud de los cromosomas en *V. stipulata* son similares a los valores encontrados en el estudio de Santana et al. (2014) con otras especies de *Vasconcellea*, incluso se asemejan al tamaño de los cromosomas de *C. papaya* en donde el cromosomas más grande y el más pequeño miden 2.29μ y 1.52μ , respectivamente.

Cabe mencionar que no se detectó la presencia de cromosomas heteromórficos que pudieran sugerir la existencia de cromosomas sexuales. Todos los pares de cromosomas homólogos presentaron similar tamaño. Esto es debido a que en la mayoría de las plantas angiospermas el sexo de las plantas está determinado por genes autosómicos y tan solo en algunos casos por la presencia de cromosomas sexuales. Además pocas especies de ciertos géneros dentro de las familias Cannabinaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae y Loranthaceae poseen cromosomas sexuales heteromórficos, mientras que la gran mayoría presentan cromosomas sexuales homomórficos (de características morfológicas similares) (Charlesworth, 1998). En el caso de *C. papaya* tampoco se han encontrado pares heteromórficos concluyendo que la determinación del sexo puede ser debida a factores citoplasmáticos que no pueden ser detectados por técnicas citogenéticas tradicionales (Datta, 1971).

El valor encontrado para la longitud total haploide (THL) fue de $16.42 \pm 0.14 \mu$ muy similar a los valores encontrados por el estudio de Santa et al. (2014) en especies de *Vasconcellea* en donde

se aproxima al valor de THL de *V. quercifolia* siendo este de 16.18 μ . Similares son también los valores encontrados del índice centromérico (CI) para *V. stipulata* que están entre el rango de 0.45 y 0.46 (Tabla 13 y Tabla 15) al igual que *V. cauliflora* (0.457), *V. quercifolia* (0.459), *V. monoica* (0.437), *V. cundinamercensis* (0.461) y *C. papaya* (0.454) (Santana et al., 2014).

Hay que tener en cuenta que el parámetro de la longitud total de los cromosomas, TCL, es con frecuencia utilizado para la comparación de especies similares (Mekki & Badr, 2007), pero en muchos de esos estudios no se tiene en cuenta que no es un parámetro estable (Jena & Sahoo, 2003), por lo que los valores encontrados para *V. stipulata* (Tabla 13) deben ser utilizados cuidadosamente en estudios posteriores.

Guerra (1986) utilizó el índice centromérico (CI) y la relación de brazos (r), para la clasificación de los cromosomas en cuatro tipos: metacéntricos (r:1.00-1.49 y CI:40.1-50.00), submetacéntricos (r:1.50-2.99 y CI:25.1-40.0), acrocéntricos (r: 3.00-7.00 y CI:0.01-25.00) y telocéntricos (r: ∞ y CI:0). Esta clasificación de acuerdo con el autor es de gran utilidad especialmente para cromosomas pequeños. Además, la clasificación de Levan et al. (1964) es la más utilizada para establecer el tipo de cromosomas. Los valores que se obtuvieron de relación de brazos y del índice centromérico determinan que los cromosomas de *V. stipulata* son metacéntricos de acuerdo con los rangos propuestos por ambos tipos de clasificación (Tablas 14, 15 y 17). Este resultado es observable también en el cariotipo e ideograma obtenido a partir de las 35 mediciones realizadas (Figuras 31, 33 y 34).

En cuanto a la simetría del cariotipo Levitsky (1931) propuso que un cariotipo simétrico es aquel en donde el centrómero de los cromosomas se encuentra centrado y el tamaño de todos ellos es homogéneo. Entre varios de los índices de asimetría se encuentran el porcentaje de la forma total

(TF%), el índice Syi y el índice Rec. El valor para el porcentaje de la forma total (TF%) encontrado para *V. stipulata* fue de 46.66 ± 0.35 que al estar próximo a 50 tal como Huziwara (1962) propone, se trata de un cariotipo altamente simétrico. El valor encontrado para el índice Syi fue de 87.54 ± 1.21 que de acuerdo a lo propuesto por Greiher y Speta (1976) es un cariotipo simétrico por que la media de los brazos cortos coincide con la media de los brazos largos. El índice Rec propuesto también por Greiher y Speta (1976) compara la media de la longitud de cada cromosoma con la longitud del cromosoma más grande expresado en porcentaje. El valor encontrado para *V. stipulata* fue de 74.89 ± 1.35 , valor que indica un alto grado de simetría cariotípica.

En las angiospermas, los cariotipos que presentan una alta simetría se dice que son más ancestrales que los cariotipos con un nivel de asimetría elevada, en donde se han dado eventos de cambios en el complemento cromosómico como la variación de la posición del centrómero, translocaciones y fusiones, entre otros. (Chiavegatto et al., 2016). Por lo tanto, con los valores de asimetría encontrados en el presente trabajo se deduce que el cariotipo de *V. stipulata* no ha sufrido grandes modificaciones en su historia evolutiva manteniéndose estable, dado que es altamente simétrico.

Existe un método de análisis de agrupamiento denominado UPGMA, el cual se basa en parámetros cariotípicos como TLH, TF%, índices Rec y Syi y longitud total del cromosoma (TCL) que fue utilizado por Santana et al. (2014) para evaluar la relación de parentesco entre cinco especies de *Vasconcellea* con *C. papaya*. Los datos obtenidos en este trabajo podrían ser utilizados igualmente para realizar análisis evolutivos que permitan evaluar el parentesco entre *V. stipulata* y sus posibles parentales.

Los estudios citogenéticos son de gran utilidad en diferentes ramas de las ciencias, por un lado, contribuyen con la taxonomía y con la biología evolutiva para conocer las diferencias entre especies y los caminos evolutivos de cada una de ellas. Por otro lado en el área de fitomejoramiento facilita la manipulación de los genotipos con el objetivo de obtener especies mejoradas y de alto rendimiento (Arroyo, 2014). Con la información presentada en este estudio se establecen las bases del cariotipo de *V. stipulata* uno de los posibles parentales de *V. x heilbornii* (babaco). Ciertos aspectos como el número cromosómico son coincidentes entre el jigacho y babaco que en principio sería suficiente para realizar cruzamientos interespecíficos entre estas especies.

Este trabajo representa un gran avance en la citogenética de *V. stipulata*. Se pudieron determinar distintos parámetros citogenéticos como un protocolo para la visualización de células metafásicas, parámetros del cariotipo tales como la longitud de los cromosomas, relación de brazos, índice centromérico, valores de distintos índices de asimetría, el cariotipo de los cromosomas y adicionalmente el ideograma (Aiassa et al., 2015). Todos estos parámetros establecen las bases para iniciar estudios de la historia evolutiva de *V. stipulata* y de las especies con un parentesco cercano.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

Se utilizó una técnica citogenética tradicional, “squash” o aplastamiento, que permitió la tinción completa de los cromosomas y una buena dispersión de los mismos evitando sobrelapamientos. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que *V. stipulata* presenta un número gamético $n=9$ y un número somático $2n=2x=18$ como la gran mayoría de las especies de la familia Caricaceae

El mejor tratamiento para la observación de cromosomas metafásicos utilizado en la determinación del número cromosómico y del índice mitótico fue con un pretratamiento de 8-hidroxiquinoleína 0.002 M por 4 horas en frío (4°C), una fijación con etanol: ácido propiónico (3:1) durante 24 horas en frío (4°C), digestión enzimática con pectinasa 20% y celulasa 2% durante 2 horas a 37°C y una tinción final con lacto-propiono-orceína durante una noche en frío (4°C).

Para la caracterización cromosómica se realizaron ciertos cambios en el protocolo básico previamente determinado para obtener mejores imágenes de los cromosomas metafásicos (digestión enzimática durante 4-5 horas, tratamiento hipotónico con 75 mM KCl y utilización de vapor para la dispersión de los cromosomas).

La hora de mayor índice mitótico encontrado fue a las 07:30 de la mañana con un índice mitótico parcial (IMp) de 9.31% y un índice de fase metafásica (IFm) de

La fórmula cariotípica encontrada fue 18m, con todos sus cromosomas metacéntricos. El tamaño de los cromosomas está comprendido entre 2.44μ y 1.27μ . El promedio de la longitud total del cariotipo (TCL) es de 33.38μ .

Los valores obtenidos en los parámetros de simetría fueron para la forma total TF(%) de 46.66 ± 0.35 , para el índice Syi $87.54 + 1.21 \pm$ y para el índice Rec 74.89 ± 1.35 , todos ellos señalando que se trata de un cariotipo simétrico.

Se determinaron las características cromosómicas de *V. stipulata*, datos que con futuros estudios morfológicos y con ayuda de la filogenia molecular permitirán entender los procesos de divergencia y especiación de esta especie dentro del género *Vasconcellea*.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Aplicar el mismo estudio a profundidad con *V. x heilbornii* y con *V. pubescens* para realizar estudios comparativos que permitan esclarecer el verdadero origen del babaco y establecer las bases para posibles programas de mejoramiento de dicho cultivo.

Es necesario continuar con el estudio de los cromosomas con técnicas citogenéticas más avanzadas como la utilización de un microscopio electrónico de barrido para el estudio más detallado de la morfología o mediante la técnica FISH para el estudio de los genes presentes.

Utilizar sustancias químicas sincronizadoras, como la hidroxiaurea, con el fin de aumentar el número de células metafásicas que faciliten la visualización de los cromosomas dado que el índice mitótico de *V. stipulata* es bajo.

Continuar los estudios citogenéticos de ser posible tratando de conseguir semillas de jigacho que presenten una elevada tasa de germinación y estandarizar un protocolo *in vitro* para obtener una fuente continua de raíces para los estudios citogenéticos las cuales además presentan un mayor índice de mitosis.

Para poder diferenciar con seguridad entre grupos poblacionales interespecíficos son necesarios además estudios a nivel genético, ya que estudios morfológicos a pesar de que pueden ayudar a explicar la diversidad intraespecífica no son estadísticamente seguras.

BIBLIOGRAFÍA

Aiassa, D., Bosch, B., Gentile, N., & Mañas, F. (2015). *CITOGENÉTICA Teoría y Practica*. Córdoba.

Altınordu, F., & Peruzzi, L. (2016). *A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType*. TAXON. doi:<http://dx.doi.org/10.12705/653.9>

Alvarez, R., & Cornejo, J. (2017). *Characterization of a not so new potexvirus from babaco (Vasconcellea x heilbornii)*. Oklahoma: PLOS ONE.

Antunes, F. (2015). *Molecular Phylogeny, Biogeography and an e-Monograph of the Papaya Family (Caricaceae) as an Example of Taxonomy in the Electronica Age*. Munich: Springer Spektrum.

Antunes, F., & Renner, S. (2012). *A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history*. Munich, Germany: ELSEVIER.

Aradhya, M. K., Manshardt, R. M., Zee, F., & Morden, W. (1999). *A phylogenetic analysis of the genus Carica L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region*. Genetic Resources and Crop Evolution.

Arano, H. (1963). Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic considerations on *Pertya* and *Ainsliaea*. Tokyo: Botanical Magazine.

Arano, H., & Saito, H. (1980). *Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae*. Kromosomo.

Aravind, G., Bhowmik, D., Duraivel, S., & G., H. (2013). *Health benefits and medicinal properties of Carica papaya*. Ann. Plant Sci.

Arroyo, H. A. (2014). *Determinación del cariotipo en tres especies silvestres de Tigridia spp.* Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México.

Badillo, V. (1971). *Monografía de la familia Caricaceae. Publicada por la Asociación de Profesores*. Maracay: Universidad Central de Venezuela.

Badillo, V. (1993). *Caricaceae, segundo esquema*. Universidad de Venezuela.

Badillo, V. (1997). *Neotipificación de Carica pubescens Lenné et Koch y de Carica quercifolia (St. Hill.) Hieron y nuevos registros de la familia para Ecuador*. Ernstia.

Badillo, V. (2000). *Carica L. vs Vasconcellea St Hil (Caricaceae): con la rehabilitación de este último*. Ernstia.

Caetano, C., Lagos, T., Sandoval, C., Posada, C., & Caetano, D. (2008). *Cytogenetics of Vasconcellea species (Caricaceae)*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.

Carvalho, F., & Renner, S. (2013). *The phylogeny of the Caricaceae*. New York: Springer Science.

Castañeda, J., & Santacruz, F. (2012). *Análisis citogenético y estomático para determinar los niveles de ploidía en camote de cerro (Dioscorea spp.)*. Jalisco: Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Cevallos, M., & Ramos, R. (1990). Evaluación de tipos de Estacas, sustratos y tres dosis de Rootone F (ácido naftalen – acético – indol butírico), para propagación de Jigacho (*Carica stipulata*, B.). Universidad Técnica de Ambato – Facultad de Ingeniería Agronómica.

Charlesworth, D. a. (1998). *Lily or billy - Y the difference*. (Vol. 14). Trends in Genetics.

Chiavegatto, R., Paula, C., Sobrinho, F., Benites, F., & Techio, V. (2016). *Karyotype asymmetry in Cynodon Rich. (Poaceae) accessions*. Brazil: Genetics and Molecular Research.

Cholota, Ó. L. (2013). *Evaluación de sustratos para el enraizamiento de plántulas de sábila (Aloe vera)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Copens, G. (2003). *Aprovechamiento de los recursos genéticos de las papayas para su mejoramiento y promoción*.

Cossio, F. (1988). *Il Babaco*. Bologna: Edagricoles.

Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Oxford University. Obtenido de <https://global.oup.com/ushe/product/speciation-9780878930890?cc=ec&lang=en&>

Darlington, C., & La Cour, L. (1969). *The Handling of Chromosomes*. (5ta ed.). George Allen & Unwin.

Datta P. C. (1971). *Chromosomal biotypes of Carica papaya L.* (Vol. 36). Cytologia.

Delgado, M., & Lastra, M. (2010). *Estandarización de la técnica citogenética "squash" para conteo de cromosomas mitóticos en Rubus glaucus Benth.* Scientia Et Technica.

Delgado, M., & Uribe, M. (2010). *Estandarización de la técnica citogenética "squash" para conteo de cromosomas mitóticos en Rubus glaucus Benth.* (Vol. 17). Scientia Et Technica.

Dodson, C. (1985). *La flora de Jauneche. Colección Florulas de las zonas de vida del Ecuador.* Quito: Banco Central del Ecuador.

Drew, R. (1998). *Development of interspecific Carica hybrids.* Acta Hortic.

Droogenbroeck, B. V., & Kyndt, T. (2004). *Phylogenetic analysis of the highland papayas (Vasconcellea) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP.* Springer.

Elorrieta-Jove, A., & Benito-Jiménez, C. (1993). *Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de Tenca.* Madrid: Universidad Complutense De Madrid.

Estrella, A. (2018). *Determinación del cariotipo de babaco (Vasconcellea x heilbornii (V.M Badillo) V.M. Badillo).* Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Fabara, J., & Bermeo, C. (1985). *Manual del cultivo de babaco.* Universidad Técnica de Ambato.: Editorial Universitaria.

Fantini, L. (2015). *Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular.* Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

Fedack, G., & Kim, N. (2008). *Tools and methodologies for cytogenetics studies of plant chromosomes*. Ottawa: Kangwon National University.

Ferrer, H., & Alcorcés, N. (2007). *Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de Gossypium hirsutum L. y dos ecotipos de Gossypium barbadense L.* (Vol. 36). Acta.

Flores. (2014). *Enraizante*. Obtenido de <https://www.flores.ninja/enraizante/>

Foronda, J. R. (2011). Cultivo de papayo de altura. *Vasconcellea stipulata*. Huanuco, Perú: Manual del cultivo de *vasconcellea stipulata*.

Freire, D. (2015). *Reproducción asexual del babaco (Vasconcellea x heilbornii cv.) Sobre portainjertos de chamburo (Vasconcellea cundinamarcensis) y toronche (Vasconcellea stipulata)*. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

GA, L. (1931). *The karyotype in systematics. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*.

Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). *FFusarium oxysporum, El hongo que nos falta conocer* (Vol. 6). Universidad Nacional de Colombia.

Greilhuber, J. ..., & Speta, F. (1976). *C-banded karyotypes in the Scilla hohenackeri Group, S. persica and Puschkinia (Liliaceae)*. Syst. Evol.

grupoIÑESTA. (2019). *Enraizantes: estimula el crecimiento natural de las raíces de tu cultivo*. Obtenido de <https://www.grupoinesta.com/enraizantes/>

Gschwend, A. (2012). *Molecular analysis of sex chromosome evolution in papaya*. Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign,.

Guerra, M. (1986). *Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al.* (741-743 ed.).
Revista Brasileira de Genética.

Guerrero, D., & Castro, S. (1999). *Cultivo de babaco en Loja*. Loja: Universidad Nacional
de Loja. Proyecto VLIR.

Hickman, C. R., & Parson, A. (1998). *Principios Integrales de Zoología* (4ta Edición ed.).
España: Mc Graw-Hill Interamerica.

Hoorn, F., & Wesselingh, C. (2010). *Amazonia through time: Andean uplift, climate
change, landscape evolution, and biodiversity*. Amsterdam: Science. doi:doi:
10.1126/science.1194585.

Horovitz, S., & Jiménez, H. (1967). *Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en
Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas*. Maracay: Agron Trop.

Huziwara, Y. (1962). *Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further
studies on the chromosome of Aster*. J. Bot. .

Ilya, K. (2017). *DRAWID v0.26 .Make karyotyping easier!.Manual* . Moscow: Russian State
Agrarian University.

INIAP-PROMSA. (2003). *Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae -
Solanaceae , fenología, usos y recolección de germoplasma en el sur de Ecuador* . Cuenca .

IUCN . (30 de Agosto de 2004). *2004 IUCN Red List of threatened species*. Obtenido de
<http://www.redlist.org>

Jena, S., & Sahoo, P. (2003). *New reports of chromosome number and genome size in eight mangroves from coastal Orissa*. Caryologia.

Jiménez, H., & Horivitz, S. (1957). *Cruzabilidad entre especies de Carica*. Agronomía Tropical.

Jobin-Décor, M. (1996). *RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between Carica papaya and wild relatives*. Genetic Resources and Crop Evolution.

Karp, G. (1998.). *Biología Celular y Molecular*. . Edición. Editorial. Mc Graw-Hill Interamerica.

Kyndt. (2004). *Molecular Genetic Analysis of the Genera Carica L. and Vasconcellea Saint Hilare (Caricaceae)*. Universiteit Gent.

Kyndt, T., Romeijn, E., B., V. D., Romero, J., G., G., & Goetghebeur, P. (2005). *Species relationships in the genus Vasconcellea (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence*. Ghent: American Journal of Botany.

Kyndt, T., Van Damme Els, J., Van Beeumen, J., & Gheysen, G. (2007). *Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of Vasconcellea spp*. FEBS J.

Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. (1964). *Nomenclature for centromeric position on chromosomes* (Vol. 52). Hereditas.

Levitus, G., & Echenique, V. (2010). *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II*. . Instituto Nacional de Tecnología. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.

Liu, Z. (2004). *A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution*. . Nature.

Lorence, D., & Colin, R. (1988). *Carica cnidoscoloides (sp. nov.) and sect. Holostigma (sect. nov.) of Caricaceae from Southern Mexico*. Syst. Bot.

Magdalita, P. M., & Adkins, S. W. (1996). *An improved embryo-rescue protocol for a Carica interspecific hybrid to ringspot virus*. Aust. J. Bot.

Mártonfiováa, L. (2013). *A method of standardization of chromosome length measurement*. Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. doi:10.1080/00087114.2013.854565

Medina, F., & Villafuerte, R. (2005). *Estudio de factibilidad para la instalación de una planta procesadora de frutas para producir babaco en almíbar*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

Mekki, L., & Badr, A. (2007). *Cytogenetic studies on nine genotypes of Phaseolus vulgaris L. cultivated in Egypt in relation to zinc efficiency* (Vol. 10). Pakistan.: J Biol Sci.

Ming, R., & Moore, P. (2015). *Genetics and Genomics of Papaya*. Illinois: Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi:10.1007/978-1-4614-8087-7

Molero, S. J. (2009). *Cariotipo y aspectos citogenéticos de Dactylopius coccus Costa, 1835: "la cochinilla del carmín"*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos .

Montenegro, H. (1968). *Cultivo de papaya en el Ecuador*. Quito: Facultad de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria.

Morales, A., & Morales, M. (2006). *Interespecific crosses breeding in Vasconcellea*. Loja, Ecuador: Universidad de Loja.

Muñoz, C. (1987). *Propagación del babaco. Uso de estacas herbáceas bajo neblina intermitente. Se obtiene cerca de un 100% de enraizamiento y sobrevivencia*. IPA La Platina.

Muñoz, M. (1988). *Nomenclatura del papayo cultivado en Chile*. Agricultura Técnica.

National Research Council. (1989). *Highlands papayas*. In: *Ruskin FR(ed) Lost Crops of the Incas: Little-known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. . Washington D.C: National Academy Press.

Paniagua, G. (2007). *Citología e histología vegetal y animal*. (4ta edición ed.). México: McGraw-Hill Interamericana;.

Paszko, B. (2006). *A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices*. Kraków: Springer-Verlag.

Peruzzi, L., & Halil, E. (2012). *Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure?* Pisa: Cytogenetics.

Poehlman, J. M., & Allen, D. (2003). *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. México D.F.: Limusa.

Poggio, L., Espert, S. M., & Fortunato, R. H. (2008). *CITOGENÉTICA EVOLUTIVA EN LEGUMINOSAS AMERICANAS*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires,.

Pound, M., & Haywood, A. (2011). *A Tortonian (Late Miocene, 11.61–7.25Ma) global vegetation reconstruction*. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*

Reeves, A. (2001). *MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data*. Fort Collins: Colorado State University.

Remuzgo, J. R. (2011). *Manual del cultivo de vasconcellea stipulata*. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP.

Rignanese, L. (2006). *Botánica Sistemática*. Obtenido de http://www.homolaicus.com/scienza/erbario/utility/botanica_sistemica/hypertext/2025.htm

Rivera, M. A., & Jadan, M. (2010). *Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (V. heilbornii(y jigacho(V.stipulata)*. Universidad Tecnología Equinoccial.

Rockinger, A., Sousa, A., A. Carvalho, F., & Renner, S. (2016). *Chromosome number reduction in the sister clade of Carica papaya with concomitant genome size doubling*. Munich: AMERICAN JOURNAL OF BOTANY.

Rodríguez, N., & Bueno, M. (2006). *Study of the cytogenetics diversity of Physalis peruviana L.(Solanaceae)*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Rondón, H. (2013). *Karyotype of Espeletopsis muiska*. Bogotá: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Rondón, H., & Rache, L. (2012). *Karyotype of Espeletopsis muiska*. Tunja: Universidad de los Andes.

Salazar, A., & Gamboa, A. (2013). *Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal*. Mexico D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.

Salvatierra, M. (2015). *Floral expression and pollen germination ability in productive mountain papaya (Vasconcellea pubescens A.DC.) orchards*. La Serena : AGRICULTURAL RESEARCH 76(2) APRIL-JUNE 2016.

Samadii, A., & Mahmudzadeh, A. (2007). *Cytogenetic studies in four species of Flax(Linum spp.)*. Azerbaijan: Agricultural Research Center of West Azerbaijan .

Santana, N., Freitas, M., Correa, P., da Costa, F., & Messias, G. (2014). *Genetic Relationship between Vasconcellea and Carica Based on Their Chromosome Features*. Brasil: Cytologia.

SCCH. (2009). *Biotechnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina: avances y problemas*. Bogotá: Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Scheldeman, X. (2002). *Distribution and potential of cherimoya (Annona cherimola Mill.) and highland papayas (Vasconcellea spp.) in Ecuador*. Belgium: Faculty of Agricultural and applied Biological Sciences.University Ghent.

Scheldeman, X. (2006). *Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (Vasconcellea spp.) in tropical and subtropical America*. Cali: Springer. doi:10.1007/s10531-006-9086-x

Scheldeman, X., & Willemen, L. (2007). *Distribution , diversity and environmental adpatation of highland papayas (Vasconcellea spp.) in tropical and subtropical America*.

Shahryar, F., & Penny, M. A. (2016). *Plant Cytogenetics :Methods and Protocols*. New York: Springer Science.

Siljak-Yakovlev, S., & Peruzzi, L. (2012). *Cytogenetic characterization of endemics: past and future*. Plant Biosystems.

Singh. (2002). *Plant Cytogenetics* (Segunda ed.). Boca Raton.

Singh, R. J. (2003). *Plant cytogenetics* . Illinois: CRC PRESS.

Soltis, P., & Soltis, D. (2009). *The role of hybridization in plant speciation*. Annual Review of Plant Biology.

Stebbins, G. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd.

Sybenga, J. (1992). *Some sources of error in the determination of chromosome length* (Vol. 10). Chromosoma.

Talledo, D., & Ecobar, C. (1995). *El ciclo celular en vegetales. Su estudio, importancia y aplicaciones*. Lima: Universidad Ricardo Palma.

Tamaki, M. (2011). *Seasonal variations in pollen germination ability, reproductive function of pistils, and seeds and fruit yield in papaya (Carica papaya L.) in Okinawa*. Journal Japanese Society Horticultural Science. Obtenido de www.jstage.jst.go.jp/browse/jjshs1 (accessed 19 April 2011).

Tapia, F. (2014). *Los rompimientos cromosómicos y translocaciones modelan el cariotipo trimodal de una población hexaploide de Milla biflora (Asparagaceae) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, México*. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.

Valencia, J. (2014). *Propagación por esquejes herbáceos de jigacho (Vasconcellea stipulata V. Badillo)*. Cevallos : Universidad Técnica de Ambato.

Valentini, G. (2003). *La injertación en frutales*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria .

Van Droogenbroeck, B. (2006). *Evidence of natural hybridization and introgression between Vasconcellea species (Caricaceae) from southern Ecuador revealed by morphological and chloroplast, chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers*. Ghent: Annals of Botany. doi:10.1093/aob/mcl038,

Van Droogenbroeck, B. T., Kyndt, I., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J., . . . Gheysen, G. (2004). *Phylogenetic analysis of the highland Papayas (Vasconcellea) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP*. Theor. Appl. Genet.

Velázquez-Martí, B., & Castillo, M. (2017). *Systems of Pruning on Jigacho (Vasconcellea stipulata Badillo) under Greenhouse Conditions*. HortScience.

VIFINEX. (2002). *Producción de sustratos para viveros*. Costa Rica.

Warmke, H. (1954). *A new interspecific hybrid in the genus Carica* . Proc Am Soc Hortic.

Weiss-Schneeweiss, H., & Stuessy, T. (2003). *Karyotype evolution in South American species of Hypochaeris (Asteraceae, Lactuaceae)*. Syst. Evol.

Wendt, T. (2001). *Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of Pitcairnia (Bromeliaceae)*. American Journal of Botany.

Willemsse. (2019). *Au coeur de votre jardin* . Obtenido de <https://www.willemssefrance.fr/carica-pentagona-c2x24645194>

Winterfeld, G., Becher, H., Voshell, S., Hilu, K., & Röser, M. (2017). *Karyotype evolution in Phalaris (Poaceae): The role of reductional dysploidy, polyploidy and chromosome alteration in a wide-spread and diverse genus*. PLOS ONE. doi:<https://doi.org/10.1371/journal>.

Wu, X., & Wang, J. (2010). *The origin of the non-recombining region of sex chromosomes in Carica and Vasconcellea*. The Plant Journal. doi:[doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04284.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04284.x)

Yaguache, B. (2003). *Diversidad genética y filogenia de los géneros Carica y Vasconcellea del sur de Ecuador*. Universidad Nacional de Loja.

Zhang, W. (2008). *DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya*. . Genome Res .