

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CITOGÉNÉTICA “SQUASH” PARA CONTEO DE CROMOSOMAS MITÓTICOS EN *Rubus glaucus* Benth.

Standardization of Cytogenetic Techniques “SQUASH” for Counting of Mitotic Chromosomes in *Rubus glaucus* Benth.

RESUMEN

La mora de castilla *Rubus glaucus*, es tal vez uno de las frutales mas apetecidos en el mercado, su diversidad de usos la han convertido en uno de los cultivos promisorios de la región. A pesar de que la especie ha sido foco de muchas investigaciones encaminadas a su propagación, existe un vacío en la información citogenética que contribuya a su caracterización. Con esta investigación se logró la estandarización de la técnica de aplastado de raíces o “squash” para el conteo de cromosomas en células somáticas. En la fase de pretratamiento se utilizó 8-Hidroxiquinolina por 4 horas a temperatura ambiente, se fijó con la solución de Farmer por 24 horas a 5°C; se realizaron dos tipos de hidrólisis: y enzimática y la tinción se llevo a cabo con Acetocarmín. El número de cromosomas encontrado para *R. glaucus* fue de 28 cromosomas (tetraploide), sin hallar diferencias con respecto a las distintas procedencias cultivadas en el Eje Cafetero.

PALABRAS CLAVES: Aplastado de raíces, conteo de cromosomas, *Rubus glaucus*, ploidía,

ABSTRACT

Rubus glaucus is, perhaps, one of the most desirable fruits in the market. their diversity of uses has become one of the promising crops of the region. Although the specie has been the focus of many investigations aimed at the spread, there is a gap in information that contributes to their cytogenetic characterization. This research was focused on the standardization of the technique of crushed roots or "squash" for the counting of chromosomes in somatic cells. For a pre-treatment, it was used 8-Hydroxyquinoline during 4 hours at room temperature. The solution was fixed with Farmer for 24 hours at 5 °C. There were two types of hydrolysis: an acidic and an enzymatic hydrolysis. The Staining was carried out with Acetocarmín. The number of chromosomes found in *Rubus glaucus* was 28 chromosomes (tetraploidy). There were not found differences between singular sources grown in the coffee belt.

KEYWORDS: Counting of chromosomes, *Rubus glaucus*, “Squash”, ploidy

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha sido notable el auge que han adquirido los frutales de clima frío moderado (mora, lulo, tomate de árbol, uchuva, aguacate, curuba, granadilla, brevo y caducifolios, entre otros), evidenciado principalmente en el aumento de las áreas destinadas a su siembra, así como se ha acrecentado el interés por su cultivo y mejoramiento.

Uno de los frutales con mayor aceptación en el mercado ha sido la mora de castilla o *Rubus glaucus* Benth, perteneciente al género *Rubus* (*Rosaceae*), que por su sabor y su diversidad de usos ha adquirido gran importancia en este campo [8]. Esta especie sobresale entre las cultivadas por la variabilidad en tamaño, color y

calidad del fruto; [5] de este modo, puede tener numerosos usos como fruta en fresco, jugos, mermeladas, postres y vinos; convirtiéndose no sólo en uno de los frutales más promisorios del país, si no también en una especie de gran interés para su mejoramiento.

Es importante tener en cuenta que cuando se hace mejoramiento genético en una especie es fundamental conocer e identificar las características que muestra cada material; ya que se pueden encontrar muchas barreras limitantes para la obtención de los objetivos. El nivel de ploidía por ejemplo, es una de ellas, Poehlman y Allen (2003) [13] mencionan que el cruzar progenitores con diferentes niveles de ploidía, puede dar como resultado progenies estériles o genéticamente inestables.

LINA MARCELA DELGADO

Bióloga
Universidad del Quindío
lina_marcelad@hotmail.com

MARCELA URIBE LASTRA

Químico, M. Sc.
Profesor Auxiliar
Universidad Tecnológica de Pereira
muribe@utp.edu.co

MARTA LEONOR

MARULANDA ANGEL

Bióloga, Ph.D
Profesora Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
mlmarulanda@yahoo.com

Es por esto que se hace necesario revisar la citogenética de la mora de castilla o *Rubus glaucus* Benth en esta región, para contribuir al planeamiento de estrategias que permitan solucionar algunos de los problemas fitosanitarios a los que se ven expuestos los cultivos.

El número básico encontrado en el género *Rubus* es universalmente 7 y, actualmente los niveles de ploidía se conoce oscilan desde 2x hasta 14x y posiblemente 18x. Los primeros estudios demostraron que la poliploidía ha jugado un papel importante en la evolución de este género [20]. En Colombia y en especial en la zona Cafetera, que puede ser considerada epicentro de diversidad para este grupo, se carece de información al respecto, por lo que resulta indispensable comenzar a evaluar esta información; que puede ser un aporte valioso a la caracterización de este germoplasma y que además puede favorecer la producción de conocimiento en torno al mejoramiento genético.

2. MATERIALES Y METODOS

Las plantas utilizadas en este trabajo fueron colectadas en varias localidades del Quindío, Risaralda y Caldas, en salidas de campo realizadas en trabajos de investigación previos; fueron llevadas y mantenidas en el Vivero perteneciente a la Universidad Tecnológica de Pereira

2.1. Obtención Del Material Vegetal

Se utilizaron varias técnicas para la obtención de material vegetal, dado que las plantas adultas, bien sea en estado silvestre, o en cultivo, no proveían el material requerido en buenas condiciones.

Se realizaron ensayos de germinación de semillas certificadas de mora de castilla, Lote 22(% germ 60, % pureza 90), suministradas por la empresa de productos agrícolas “El Semillero”. Se sembraron estacas y acodos de *Rubus glaucus* en bolsas, las cuales fueron mantenidos en vivero; con el fin de inducir la producción de raíces óptimas para los análisis citogenéticos. También se utilizó como fuente de material vegetal el método de rizogénesis foliar *In vitro*

2.2. Determinación De La Hora De Corte

Se realizaron ensayos a diferentes horas del día (6:00 a.m, 8:00 a.m, 10:00 a.m, 12:00 m.d, 2:00 p.m, 3:00 p.m) y conteos de células en actividad mitótica en un campo microscópico de 100x, para así determinar la mejor hora de corte de los ápices radiculares; y observar las células de este tejido en metafase, la cual es la fase de la mitosis en la que se observan mejor los cromosomas.

2.3. Prefijación O Pretratamiento

Para la fase de Pretratamiento se utilizaron tres agentes inhibidores de mitosis a diferentes tiempos de

exposición: colchicina 0.1%, 8-hidroxiquinolina 0.002M y agua fría (Tabla 1).

Pretratamiento	Tiempo de exposición	Temperatura
8-Hidroxiquinolina	1 hora	AMBIENTE
	2 horas	
8-HQ (en papel filtro y en oscuridad)	3 horas	
	4 horas	
Colchicina 0.1%	1 hora	
	2 horas	
	3 horas	
Agua fría	24 horas	

Tabla 1. Ensayos de pretratamiento con tres tipos de inhibidores en diferentes tiempos de exposición

2.4. Fijación

Para la fijación de los cromosomas se utilizó la Solución de Farmer (etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1) variando el tiempo y la temperatura de exposición (Tabla 2).

Fijación	Tiempo de Exposición	Temperatura
Farmer	15 minutos	60°C
	24 horas	3°C (nevera)
	24 horas	T° ambiente
Alcohol 70%	24 horas	T° ambiente

Tabla 2. Ensayos de fijación con Farmer a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

2.5. Maceración O Hidrólisis

Se emplearon dos tipos de hidrólisis: ácida y una mezcla de ácida con enzimática; en el primer caso se utilizó HCl 1N a 60°C por 10 minutos, en el segundo caso además de la ya mencionada hidrólisis ácida se empleo una mezcla de macerozima (0.2%), celulasa (0.2%) y pectinasa (0.1%) a 37°C por varios intervalos de tiempo: 10, 20 y 30 minutos, en una cámara húmeda elaborada manualmente. Se realizaron dos enjuagues con EDTA 1mM.

2.6. Tinción

Para la coloración de los cromosomas se evaluaron tres tintes: Orceína acética, Reactivo de Feulgen y Acetocarmín por un tiempo máximo de 30 minutos en oscuridad y calentando cuando fuera necesario.

2.7. Aplastado O Squash

Después del proceso de coloración, el “squash” convencional se realizó entre el porta y el cubreobjetos, para así dispersarlos y al hacerse visible se encontraron en un mismo plano. Las placas obtenidas fueron selladas

con esmalte de uñas o Euparal para una mayor preservación de la muestra.

2.8. Observación

La muestra preparada se analizó bajo un microscopio óptico, inicialmente a un aumento de 10X x 10X para buscar células contables, luego a un aumento mayor 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el objetivo de inmersión 10X x 100X para realizar el recuento

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención Del Material Vegetal

Los cromosomas de la célula de un organismo son más evidentes cuando ésta se encuentra en división mitótica, de tal forma que se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por encontrarse en constante mitosis, poseer núcleos grandes y permanecer indiferenciados [21]; en este caso se utilizaron ápices radiculares por cumplir con dichas condiciones.

Sin embargo un gran obstáculo para observar los cromosomas en *Rubus*, así como en otros géneros como *Amaranthus* [15], es que las especies tienden a tener raíces delicadas y muy pequeñas. Al remover las raíces del suelo, los ápices, que contienen el tejido meristemático a menudo se pierden; las raíces en las que los ápices no se pierden tienen pocas células, lo que decrece la probabilidad de obtener cromosomas dispersos.

Debido a esto se emplearon diversas técnicas que favorecieran la producción de raíces en buenas condiciones, aptas para su procesamiento y de este modo asegurar la disponibilidad del material vegetal.

Las semillas establecidas en cajas de petri no presentaron los resultados esperados, pues al cabo de cuatro semanas se encontró un alto grado de contaminación por ataque de hongos principalmente. Después de un seguimiento prolongado a los diferentes tratamientos no se observó emisión de radícula, o indicios de germinación en ninguno de los casos, Einset (1951) [4] plantea que las semillas de mora normalmente no germinan fácilmente hasta el segundo año después de ser plantadas.

Del mismo modo, el establecimiento de acodos y estacas de *R. glaucus* en tierra, para la obtención de ápices radiculares no produjo resultados efectivos, al cabo de 30 días del montaje se encontró una muy baja producción de raíces; además de que éstas mostraron características no aptas para los ensayos de laboratorio. Las plantas no propagadas por eso métodos no presentaron óptimo desarrollo. Bernal (1966) [3], afirma que los ensayos de propagación por estaca no tienen mucho éxito, pues al parecer en el enraizamiento y el brote de las primeras

hojas y ramas, se consumen las reservas perdiendo su vigor para poder desarrollarse, por lo cual finalmente mueren.

Las raíces obtenidas a través de cultivo In vitro no fueron la mejor herramienta durante el desarrollo de este estudio; la resolución de los cromosomas fue muy inferior a lo obtenido con plantas de vivero.

Las raíces producidas por las plantas en bolsa mantenidas en vivero fueron las que presentaron mejor color, mayor tamaño, consistencia, y por consiguiente mayor facilidad a la hora de manipularlas.



Fig. 1. Métodos de propagación utilizados para la obtención de ápices radiculares **A.** Semillas **B.** Estacas **C.** Acodos **D.** Estacas con Enraizador **E.** Cultivo In vitro **F.** Plántulas en bolsa.

3.2. Determinación De La Hora De Corte

La mayor cantidad de células mitóticas se observaron en raíces colectadas entre las 8:00 y 9:00 de la mañana. Después de esta hora, la cantidad de células en mitosis era menor por campo microscópico y en las horas de la tarde fue casi nulo, predominando las células interfásicas (Fig.4).

Esto puede ser explicado por el umbral de absorción de nutrientes y agua para suplir las necesidades en las diversas rutas metabólicas, por lo cual se incrementa la

división celular en los ápices radiculares, en ese rango horario.

Swanson *et al.* (1981) [14] indicó que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra, pero por lo general, la hora mitótica se encuentra en las horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am, lo que concuerda con lo obtenido en este trabajo.

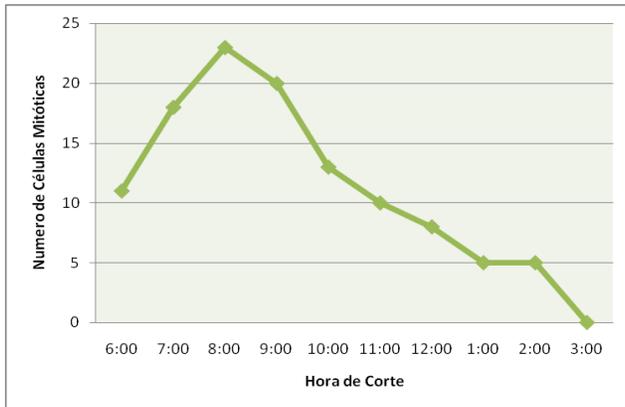


Fig. 2. Numero de células en mitosis (por campo microscópico 100X) a diferentes horas del día.

3.3. Pretratamiento O Prefijación

En esta etapa se acumula el mayor número de células metafásicas en el meristemo. En la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación, se encuentran individualizados y presentan una forma característica que permite diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente. Los inhibidores de mitosis actúan sobre el proceso de formación del huso acromático, impidiendo el paso hacia la anafase y causando el acortamiento y dispersión de los cromosomas [21].

Los dos inhibidores mitóticos utilizados en la fase de pretratamiento produjeron buenos resultados, pero fue con el uso de la 8HQ 0.002 M por 4 horas a temperatura ambiente donde se encontró mayor acumulación de células en actividad metafásica.

Ensayos citogenéticos realizados por autores tales como, Naruhashi, *et.al* (1993, 2002) [11][12] y Thompson (1993, 1995, 1997) [17][18][20] demuestran que la 8HQ es utilizada con mayor frecuencia dentro del género *Rubus*, y por lo tanto ofrece mejores resultados.

la 8 Hidroxiquinolina es muy útil en análisis cromosómicos porque permite una buena visualización de las constricciones secundarias, además permite un mejor empaquetamiento de los cromosomas; la colchicina tiende a inducir aglomeraciones cromosómicas, las cuales son muy pronunciadas después de largos tratamientos [1].

3.4. Fijación

En esta etapa se interrumpen rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además se incrementa la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser coloreada [21].

El tiempo de fijación más efectivo con Farmer es de 24 horas a 3°C. Por regla general, en citogenética es de gran interés principalmente realizar observaciones de morfología, asociación y número de cromosomas, por lo que es de gran utilidad un fijador de acción rápida y violenta; de reacción ácida y deshidratante, que conserve el nucléolo, los cromosomas y el huso acromático, uno de los fijadores más comúnmente utilizados por cumplir con estas características es el Reactivo de Farmer [6].

Se requiere un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente para fijar el material [7], sin embargo es conveniente dar de 24 a 48 horas en este proceso para facilitar la dispersión de los cromosomas en el citoplasma [6], si este tiempo es excedido y no se conserva a bajas temperaturas o se transfiere a alcohol se corre el riesgo de que el material se deteriore.

3.5. Hidrólisis

Al momento de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico, es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa de células, evitando así la superposición. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos, o mezclas de ambos [21].

Se determinó que era indispensable el proceso de hidrólisis ácida con HCl por 15 minutos a 60°C, reforzado con una hidrólisis enzimática por 20 minutos a 37°C, ya que de lo contrario la pared celular no sería suficientemente degradada.

El objetivo principal de esta hidrólisis es precisamente eliminar tejido que impida una perfecta visualización de los cromosomas, la pared celular es entonces una de las barreras más importantes durante este proceso, ésta es el resultado de un proceso evolutivo producto de las interacciones con fitopatógenos, con otros organismos y con las condiciones ambientales que se presentan como elementos seleccionadores, por lo cual, las paredes han generado resistencia a agentes químicos- enzimáticos como los empleados en la hidrólisis.

Este proceso es también utilizado para suavizar los ápices radiculares y de ese modo favorecer el squash, es muy usado antes de tinción con orceína o carmín [7].

3.6. TINCIÓN

El mejor método de tinción empleado fue calentar el reactivo de Feulgen por 5 min y luego realizar contra tinción con acetocarmín por 30 minutos en oscuridad. Haskells y Wills (1968) [7] reportan la técnica Feulgen como una técnica que produce resultados más estéticos, aunque su defecto incluye la posibilidad de que pueda ser un poco más prolongado y falla al momento de teñir pequeños cromosomas.

Por comparación, cromosomas tratados con otros colorantes pueden parecer más densos, pero el citoplasma y el contenido de la célula pueden también teñirse y producir un contraste inferior. En este caso la combinación de las propiedades de los dos colorantes permitió una mejor observación al microscopio.

3.7. Observación De Cromosomas

Debido al pequeño tamaño y a la gran cantidad de cromosomas que presenta este material, se hizo un conteo estimado del número de cromosomas.

Rubus glaucus exhibió una dotación de 28 cromosomas, teniendo el género como número básico 7, esta especie es entonces considerada tetraploide (4n).

El conteo presentado aquí para *R. glaucus* (4x), confirma previos reportes. Thompson (1997) [20] en su revisión de las especies de *Rubus*, expone la tetraploidía para esta especie; sin embargo el autor plantea que las especies que no han sido obtenidas a partir del campo, si no por el contrario de fuentes secundarias como jardines botánicos, viveros o cultivadores de plantas están probablemente identificados incorrectamente, por lo que se hace necesario realizar confirmaciones.

Adicionalmente estos resultados corroboran los niveles de ploidía propuestos por Marulanda *et al* (2007) [10], por el cual sugieren genotipos tetraploides en el germoplasma de especies silvestres y cultivadas de *Rubus glaucus*, con base en datos obtenidos a través de marcadores moleculares.

Por otro lado, es de resaltar que no se hallaron diferencias en el número de cromosomas entre las procedencias utilizadas, todos presentaron una dotación de 28 cromosomas, sin embargo para generar hipótesis acerca de su variación real o su diferenciación por ecotipos sería indispensable un estudio de la morfología de los grupos de cromosomas de cada una de las procedencias de *Rubus glaucus* del Eje Cafetero.

El análisis de los cariotipos en algunos grupos de plantas ha sido entorpecido por el pequeño tamaño de los cromosomas, o por su alto número (como en el caso de los poliploides) [2]. Heslop-Harrison en 1953 [9] reporta que *Rubus* no provee material favorable particularmente

para estudios de morfología de cromosomas a causa del pequeño tamaño de ellos (aprox. 1.5-2.0 u). Sin embargo, un apropiado trabajo de pretratamiento con inhibidores del huso mitótico y procedimientos de maceración de meristemas apicales permite el conteo del número de cromosomas en estos grupos de plantas [2].

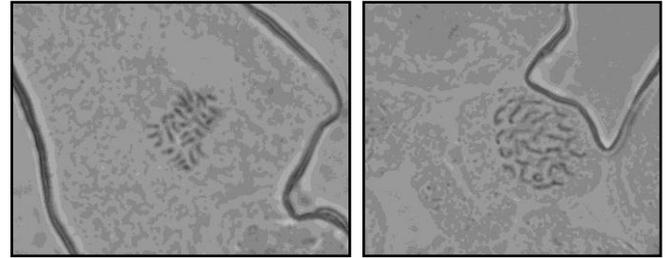


Fig. 3 Cromosomas somáticos de *R. glaucus* con 4n (28)

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los ápices radiculares obtenidos de plántulas de bolsa mantenidas en vivero fueron la mejor fuente de material vegetal para el conteo de los cromosomas.

Se estableció que la mejor hora de colecta de ápices radiculares para la observación de cromosomas se encuentra entre las 8:00 y las 9:00 de la mañana; es allí cuando se aprecia el mayor número de células en metafase.

El pretratamiento más adecuado es el uso de 8-hidroxiquinolina por 4 horas a temperatura ambiente

En el proceso de Fijación se debe utilizar Solución Farmer durante 24 horas a 3°C

Es necesario una doble digestión; primero ácida con HCl 1N durante 10 minutos a 60°C, seguida de una hidrólisis enzimática a 37°C con un coctel compuesto de celulasa 0.2, peptidasa 0.1 y macerozima 0.2. Se debe lavar en repetidas ocasiones con buffer (EDTA 1mM)

Se encontró que una combinación de dos colorantes facilitaría la observación de los cromosomas: Reactivo de Schiff o Feulgen por 5 minutos (calentar), contratinción con acetocarmín (30 min oscuridad).

Rubus glaucus presenta una dotación de 28 cromosomas, teniendo en cuenta el número base del género (7) es entonces considerada una especie tetraploide (4n), por lo que presenta 4 copias de cada cromosoma.

Las procedencias utilizadas en este trabajo no exhibieron diferencias en el número de cromosomas, todas son consideradas como tetraploides (28 cromosomas).

Se recomienda realizar una revisión citogenética de las especies silvestres que se encuentran en el Eje Cafetero:

Rubus urticifolius, *R. adenotrichos*, *R. rosifolius*, *R. bogotensis* y *R. robustus*, para la implementación de programas de mejoramiento genético.

Es de vital importancia profundizar el conocimiento sobre la meiosis en *Rubus glaucus*, realizando estudios citogenéticos en anteras para así corroborar el número cromosómico y además el tamaño, tipo y viabilidad del polen.

Realizar un estudio de Citometría de flujo para medir la cantidad de ADN presente en *Rubus glaucus* y evaluar su relación con el nivel de ploidía complementaría la información acerca de esta especie.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Quindío y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira por su apoyo y colaboración.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Aarestrup JR, Karam D, Fernandes GW. (2008).** Chromosome number and cytogenetics in *Euphorbia heterophylla* L. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): pp. 217-222.
- [2] **Aguilar SB. (2006).** Caracterización molecular de *Rubus* spp. En el Eje Cafetero-Colombia. Tesis de Maestría en Biología Vegetal. Universidad del Quindío. Universidad Tecnológica de Pereira. Universidad de Caldas.
- [3] **Bernal JH. (1966).** La mora de Castilla. *Rev. Nal. Agricultura* N° 737. Pp.29-34.
- [4] **Einset J. (1951).** Apomixis in American Polyploid Blackberries. *American Journal of Botany*, Vol. 38, No. 10. pp. 768-772.
- [5] **Erazo, B. (1983).** El cultivo de la mora en Colombia. En: *Memorias Curso Nacional de Frutales* Raúl Salazar. Instituto Colombiano Agropecuario ICA (3): 31-38
- [6] **García, V.A. (1998).** Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. 3ª ed. Universidad Autónoma de Chipango. Chipango, México. 144 pp.
- [7] **Haskell, G. Willis, A.B. (1968).** *Primer of Chromosomes Practice*. Oliver and Boy Londres. 150 pp.
- [8] **Hérendez, C A. ; Lopera, M E ; Mora, B E y Cárdenas, J F. (2001).** Desarrollo de un Protocolo para la Propagación Masiva de la Mora de Castilla Mediante la Utilización del Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. *Revista Actualidades Biológicas* No 21. 22(70):3-12
- [9] **Heslop-Harrison Y. (1953).** Cytological Studies in the Genus *Rubus* L. I. Chromosome Numbers in the British *Rubus* Flora. *New Phytologist*, Vol. 52, No. 1. pp. 22-39.
- [10] **Marulanda ML, Aguilar SB, López AM. (2007).** Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 243-253.
- [11] **Naruhashi N, Itwasubo Y. (1993).** Chromosome number of Japanese *Rubus*. *Acta Horticulturae*. 352.
- [12] **Naruhashi N, Itwasubo Y. (2002).** Chromosome number in *Rubus* (*Rosaceae*) of Taiwan. *Acta Horticulturae*. 352.
- [13] **Poehlman J M, D Allen. (2003).** *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. 2ª Edición. Limusa. México DF.
- [14] **Swanson, C., T Mertz., W.J. Young. (1981).** *The Chromosome in division, inheritance and evolution*. Segunda Edición. Prentice Hall. INC. Englewood cliffs New Jersey. USA. 304 pp
- [15] **Tatum TC, Skirvin R, Tranel PJ, Norton M, Rayburun LA. (2005).** In vitro Root induction in weedy *Amaranthus* species to obtain mitotic chromosomes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:844-847.
- [16] **Thompson MM. (1961).** Cytogenetics of *Rubus*. II. Cytological Studies of the Varieties 'Young,' 'Boysen,' and Related Forms. *American Journal of Botany*, Vol. 48 No.8. pp. 667-673.
- [17] **Thompson MM, Zhao CM. (1993).** Chromosome number of *Rubus* species in Southwest China. *Acta Horticulturae*. 352.
- [18] **Thompson MM. (1995a).** Chromosome Numbers of *Rubus* Cultivars at the National Clonal Germplasm Repository. *Hortscience* 30(7):1453-1456.
- [19] **Thompson MM. (1995b).** Chromosome numbers of *Rubus* Species at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience* 30(7) . 1447-1452.
- [20] **Thompson MM. (1997).** Survey of Chromosome number in *Rubus* (*Rosaceae*: *Rosoideae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol 84. N.1 pp.128-164.
- [21] **Valladolid A, Blas R, González R. (2004).** Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. En: Seminario J. (ed.) *Raíces Andinas. Contribuciones al conocimiento y la Capacitación. Serie: Conservación y Uso de la Biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigaciones para el desarrollo (1993-2003)*. N°6. C.I.P. agencia suiza para el desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. pp. 96-99.