

## ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS INTRA E INTERESPECÍFICOS A NIVEL DE REGIÓN ITS, ESTUDIOS DE CARIOTIPO Y APROXIMACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPECIES DE *Rhodophiala* Presl.

### INTRA AND INTERSPECIFIC POLYMORPHISM ANALYSIS AT ITS LEVEL REGION, A KARIOTYPE AND PHYLOGENETIC APPROACH AMONG *Rhodophiala* Presl. SPECIES

Muñoz, M.<sup>1</sup>, Riegel, R.<sup>2</sup>, Seemann, P.<sup>2</sup>, Schiappacasse, F.<sup>3</sup>, Peñailillo, P.<sup>3</sup>, G<sup>2</sup>, Basoalto, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Graduados, Universidad Austral de Chile,

E-mail: mamunoz@uach.cl

<sup>2</sup>Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile.

Casilla 567, Valdivia, Chile

<sup>3</sup>Departamento de Horticultura, Universidad de Talca,

Casilla 747, Talca, Chile

#### INTRODUCCIÓN

*Rhodophiala* Presl. es un género nativo del Cono Sur Americano. Sus especies han sido descritas en Chile, Argentina y Bolivia (Traub, 1956). Se trata de geófitas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae J. St.-Hill, de vistosas flores que han llamado la atención de investigadores en floricultura en el mundo, realizándose iniciativas para su domesticación con miras a su utilización como cultivo ornamental (Schiappacasse, 2002 Morgan, Seemann *et al.*, 2004, Olate y Bridgen, 2005 comunicación personal Muñoz *et al.*, 2006).

En el pasado, ha sido tratado como parte del género *Hippeastrum*, siendo la taxonomía y los límites del género controversiales. Meerow *et al.*, (2000), utilizando datos provenientes del análisis del espaciador transcrito interno de genes ribosomales (ITS) distingue a *Rhodophiala* de *Hippeastrum* teniendo un origen aparentemente polifilético, aunque sostiene que un muestreo más amplio del género es necesario.

Por otra parte, se ha obtenido descendencia viable desde cruzamientos controlados entre distintas especies de *Rhodophiala*, habiéndose

reportado también la existencia de fenotipos intermedios en la naturaleza (Schiappacasse, Universidad de Talca, comunicación personal).

Una de las formas de obtener evidencia molecular de hibridización interespecífica es a través del estudio de la secuenciación del espaciador transcrito interno de genes ribosomales (nrITS). Dado su carácter conservado intra especie, en los híbridos se espera que la secuencia de la región ITS muestre heterocigocidad en las bases en las posiciones en las cuales los dos especies parentales poseen secuencias diferentes (King *et al.*, 2001 y Pellegrino *et al.*, 2005).

Por otra parte, para los taxa relacionados, ITS ha mostrado gran utilidad para generar filogenias genéticas a nivel de familia y menores (Meerow *et al.*, 2000).

El siguiente trabajo pretende aportar información cariológica y molecular de estas especies que pueda ser usada para el estudio de las relaciones filogenéticas entre ellas.

Además, se plantea el diseño de un sistema basado en sitios de restricción polimórficos a nivel de región ITS para identificar posibles híbridos existentes en la naturaleza, como producidos a través de cruzamientos controlados.

## METODOLOGÍA

Se trabajó con 6 especies chilenas de *Rhodophiala*. Estas especies fueron recolectadas desde su ambiente natural por Patricio Peñailillo (Universidad de Talca), siendo un ejemplar de cada especie registrado en el herbario de la Universidad de Talca. *R. montana* (Phil.) Traub fue recolectada en Laguna del Maule, VII región cordillera, *R. splendens* (Rengifo) Traub en Vilches Alto VII región cordillera, *R. bagnoldii* (Herb.) Traub en Huasco, III región costa, *R. ananuca* (Phil.) Traub en Aguada de Tongoy, III región costa, *R. rhodolirion* (Baker) Traub en Los Queñes, VII región Cordillera, *R. phycelloides* (Herb.) Hunz en Huasco, III región, costa.

Para las especies mencionadas de *Rhodophiala*, a excepción de *R. phycelloides*, se realizaron preparaciones citológicas desde puntas de raíz según protocolo planteado por Grant *et al.*, (1984) y adaptado por Muñoz *et al.*, (2006) a *Rhodophiala*. Para los estudios moleculares se realizó la amplificación, previa extracción de ADN, del fragmento correspondiente a la región ITS1/5.8S/ITS2 en tres plantas por especie utilizando los cebadores ITS1-Plant-F, 5-CGCGAGAAGTCCACTG-3' e ITS C26A-R 5'GTTTCTTTTCCTCCGCT-3'. Los productos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5% mediante tinción con bromuro de etidio.

Los productos amplificados fueron secuenciados por un servidor externo, Macrogen Inc., Corea. Las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando el programa ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, con el cual se realizó la construcción de un filograma comparando las secuencias obtenidas con algunas reportadas por Merrow *et al.* (2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies muestran números cromosómicos somáticos mayoritariamente  $2n=18$ , existiendo casos de  $2n=16$ . Los índices de asimetría tienden a acercarse a 0,6 en la mayoría de las especies, a excepción de *R. rhodolirion* que es 0,46. En cuatro especies, los 2 pares de cromosomas

más pequeños son metacéntricos, los de mayor tamaño son submetacéntricos y subtlococéntricos, en *R. rhodolirion* los 2 pares más pequeños son subtlococéntrico y submetacéntrico, los de mayor tamaño son metacéntricos, submetacéntrico y subtlococéntrico.

Un filograma resultado de la comparación de las secuencias ITS de las especies estudiadas junto a secuencias reportadas por Merrow *et al.*, (2000) de *R. cipoana*, *Phycella ignea* e *Hippeastrum brasileum* entre otras, nos indica que las especies *R. ananuca*, *R. montana*, *R. phycelloides*, *R. splendens* y *R. bagnoldii*, constituyen un grupo cercanamente relacionado, alejándose de *R. rhodolirion*, que es más cercana a *P. ignea* y separándose de *R. cipoana*, que es más cercana a *H. brasileum*.

Sin embargo, a excepción de *R. rhodolirion*, la variabilidad encontrada entre las especies estudiadas fue escasa, incluso la variabilidad encontrada entre distintos individuos de *R. splendens* es mayor a la presente entre *R. bagnoldii*, *R. phycelloides* y *R. ananuca*, haciendo difícil la identificación de posibles híbridos interespecíficos a través de sitios de restricción polimórficos que permitan habilitar la técnica ITS-RFLP. Teóricamente, sería factible detectar híbridos entre *R. montana* y las especies: *R. ananuca*, *R. phycelloides* y *R. bagnoldii*. *R. rhodolirion* constituye una excepción, aunque sería difícil esperar descendencia viable de la cruce de esta especie con algún representante del resto de las especies del género.

## CONCLUSIONES

La reducida variabilidad encontrada entre un grupo de especies, el que a su vez difiere fuertemente de especies como *R. rhodolirion* y *R. cipoana*, reafirma la necesidad de revisar la taxonomía del género. Los resultados de los estudios moleculares realizados en esta oportunidad concuerdan con lo sugerido por Naranjo y Poggio (2000) y con lo propuesto por Ravenna (2003), acerca de rehabilitar el género *Rhodolirion*, sugiriendo que sería más apropiado clasificar como *Rhodolirion andinum* Phil., propuesto inicialmente (ver sinonimias en Traub, 1956), a la actual *R. rhodolirion* (Baker) Traub., basán-

dose en el hecho de que, además de diferir en número y morfología cromosómica del resto de las especies de *Rhodophiala*, se diferencia claramente a nivel de región ITS.

## REFERENCIAS

MEEROW, A., GUY, C., QIN-BAO, L.; YANG, S.

2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* 25: 708 – 726

MUÑOZ, M., RIEGEL, R.; SEEMANN, P. 2006. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. *Plant Breeding* 125: 414-416.

TRAUB, H. 1956. The genera *Rhodophiala* Presl. and *Phycella* Lindl.: key to the species and synonymy. *Plant life (Herbertia)* 12: 67 – 76.

Agro Sur 35 (2): 24-26 2007

## CULTIVO *in vitro* DE CACTÁCEAS CON FINES DE CONSERVACIÓN *ex situ*

### *In vitro* CULTURE OF CACTACEAE WITH *ex situ* CONSERVATION PURPOSES

Seemann, P., Rodríguez, C. y Jara, G.

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile

Casilla 567, Valdivia, Chile.

E-mail: pseemann@uach.cl

#### INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es de origen americano y posee una distribución desde Canadá a Tierra del Fuego, con mayor diversidad en México. Se estima que existen unos 86 géneros y alrededor de 2000 especies. En Chile, la flora cactológica está representada por unas 160 especies de las cuáles 145 son endémicas, la mayoría amenazadas (Hoffmann, 1989). Actualmente, a nivel mundial existe una demanda creciente por especies de cactáceas tanto con interés científico como para cultivo ornamental, lo cual, de no establecerse sistemas de propagación intensiva, hará disminuir enormemente las poblaciones naturales existentes debido a la acción antrópica con fines comerciales. En general, las cactáceas pueden ser multiplicadas por propagación sexual, mediante semillas, o bien por medios vegetativos empleando esquejes, rebrotes o hijuelos, trozos de frutos, injertos y aplicando técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. El objetivo del presente trabajo fue establecer cultivos *in vitro* de once especies de cactáceas nativas e introducidas, con fines de conservación *ex situ*.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron cultivos asépticos a partir de areolas apicales para la posterior propagación y conservación *in vitro* de once especies de Cactáceas (Clayton *et al.*, 1990; Rodríguez, 2006). En la investigación se incluyeron especies chilenas y exóticas, entre las cuales figuraron *Copiapoa chaniaralensis* Ritter, *Copiapoa hypogaea* Ritter, *Eriosyce sandillon* (Remy.) Phil., *Loxanthocereus aureispinus* (F. Ritter) F. Buxbaum, *Neoporteria napina* (Phil.) Bacbg., *Mammillaria elongata* DC, *Opuntia berteri* (Colla) A.E.Hoffm., *Opuntia cylíndrica* (Juss. ex Lam.) DC, *Trichocereus* sp., *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel) Lindgr. y *Cereus peruvianus* (L.) Mill. Se utilizó medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 1,0 o 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, o sin bioreguladores, gelificado con Gelrite o agar, incubando bajo condiciones de temperatura y luminosidad controladas (22±2°C, 3000 lx, 16 h luz). temperatura ambiental de 22±2°C, fotoperíodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de 50 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. La evaluación realizada entre la 4<sup>a</sup> y 12<sup>o</sup> semana de