

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes: Las hojas de *Chloraea crisper* son hipostomáticas; el tamaño y la distribución de estomas es similar en plantas cultivadas e *in vitro*, pero diferente a aquellas que crecen naturalmente en el campo; el índice estomático varía en todos los tratamientos, siendo mayor en las plantas silvestres y menor en las plantas cultivadas; la anatomía de la epidermis foliar se relaciona directamente con la cantidad y variabilidad de los estomas, la cuales se

diferencian claramente por las condiciones ambientales en las que se desarrolle.

## REFERENCIAS

- TORRES J.; LASKOWSKI L.; SANA M. 2006. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. *Bioagro* 18(2): 93-99.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION GENEVA 1998. Quality control methods for medicinal plant materials.. Geneve Eds. 123p.

Trabajo financiado por el proyecto FIA PI-C-2003-1-A-81.

Agro Sur 35 (2): 47-49 2007

## EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LAS RELACIONES INTERESPECÍFICAS EN *Rhodophiala* Presl. (Amaryllidaceae) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR

## PRELIMINARY EVALUATION OF INTERSPECIFIC RELATIONSHIPS IN *Rhodophalia* Presl. (Amarylladecae) THROUGH ISSR MOLECULAR MARKERS.

Fuentes, L.<sup>3</sup>, Schiappacasse, F.<sup>1</sup>, Herrera, R.<sup>2</sup>, Peñailillo, P.<sup>2</sup> y Vogel, H.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias,

<sup>2</sup>Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología,

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Silvoagícola (CIBS),

Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile

E-mail: lfuentes@utalca.cl

## INTRODUCCIÓN

El género *Rhodophiala* Presl (Amaryllidaceae) comprende 31 especies de geófitas distribuidas en Chile, Bolivia y Argentina (Traub, 1956). En Chile, el género se extiende desde la Región de Atacama hasta la Región de Los Lagos, con una mayor diversidad de especies en la llamada zona macrobioclimática mediterránea de Luebert y Pliscoff (2006). Las especies del género *Rhodophiala* exhiben flores de diversos colores y formas por lo que han sido investigadas como potenciales plantas ornamentales (Muñoz *et al.*, 2006).

Pese a lo anterior, la sistemática del género y la identificación de sus especies basada principalmente en caracteres morfológicos, es dificultosa y confusa. Una de las formas de obtener evidencia molecular de variabilidad entre especies y/o intraespecíficas es a través del estudio de secuencias repetitivas o ISSR, técnica que ofrece una rápida y simple opción para la obtención de perfiles genéticos, además de una alta reproducibilidad (Charters *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2006)).

El objetivo de este trabajo es evaluar las relaciones interespecíficas de 7 especies chilenas

del género *Rhodophiala* Presl, utilizando marcadores moleculares ISSR.

## MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron bulbos de poblaciones naturales de 7 especies chilenas de *Rhodophiala* (Cuadro 1). Los bulbos fueron plantados en macetas con un sustrato de tierra de hojas y turba en proporción 2:1 y crecidos en un invernadero frío con cubierta de polietileno y ventilación.

La extracción del ADN se realizó de hojas provenientes de distintos individuos de cada especie mediante el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990), con modificaciones (Herrera *et al.*, 2002). La integridad del ADN fue analizada mediante geles de agarosa y el ADN cuantificado por espectrofotometría. Se generó el patrón genético por PCR, utilizando como templado 12,5 ng de ADN de cada especie y 54 partidores ISSR. Para el análisis de fingerprinting, los productos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 2 %, visualizados en un transiluminador mediante tinción con bromuro de etidio. Con el propósito de una mejor comparación de los resultados moleculares, se agregaron al estudio dos especies del género *Phycella* Lindl. (*P. australis* Rav. y *Ph. ignea* (Lindl.) Lindl., el grupo hermano de *Rhodophiala* (Meerow *et al.*, 2000).

La variabilidad genética fue analizada por el uso de softwares: NTSYS-PC versión 2.0 (Rohlf, 1997) y FreeTree versión 0.9.1.5.0 (Pavlícek y Flegr, 2001). Para ello, se construyó

una matriz de datos, basada en los perfiles electroforéticos, donde la presencia o ausencia de una banda homóloga fue marcada como 1 o 0, respectivamente. Así, se construyó un dendrograma mediante la técnica UPGMA, de manera de reflejar el índice de similitud de las muestras. Adicionalmente, se realizó un análisis de bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) para evaluar el apoyo de las agrupaciones individuales mediante el programa FreeTree versión 0.9.1.5.0. Esta matriz binaria fue utilizada para realizar un análisis de ordenación (PCA) y así resolver los patrones de agrupamientos de los genotipos, para lo cual también se utilizó el software NTSYS-PC.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los partidores usados correspondieron a secuencias dinucleotídicas repetidas, en cuyos extremos se contenían tres nucleótidos diferentes del resto de la secuencia. De estas secuencias, las más frecuentes correspondieron a la combinación (AG)<sub>n</sub>, (TG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub>. La secuencia (CT)<sub>n</sub> presentó escasa representación, mientras que la combinación (AT)<sub>n</sub> no generó productos de amplificación.

De los 35 partidores que generaron producto de amplificación, 10 fueron polimórficos. El análisis del patrón genético mostró que todas las especies de *Rhodophiala* Presl constituyen un grupo muy relacionado, a excepción de la especie *Rhodophiala rhodolirion* que se ubica aparte.

**Cuadro 1. Listado de las especies investigadas y procedencia de la recolección.**

**Table 1. List of researched species and collect sites.**

Especie	Sitio de colecta
<i>Rhodophiala montana</i> (Phil.) Traub	Prov. de Talca. Cordillera de Los Andes
<i>Rhodophiala phycelloides</i> (Herb.) A.T.Hunz.	Prov. de Elqui. Caleta Hornos.
<i>Rhodophiala splendens</i> (Renjifo) Traub	Prov. Curicó. Parque Nacional Radal Siete-Tazas.
<i>Rhodophiala ananuca</i> (Phil.) Traub	Prov. Huasco. Aguada de Tongoy
<i>Rhodophiala bagnoldii</i> (Herb.) Traub	Prov de Elqui. Choros Bajos
<i>Rhodophiala rhodolirion</i> (Baker) Traub	Prov. Curicó. Paso Pichuantes
<i>Rhodophiala aff. berteriana</i>	Prov. Talca. Putú

## CONCLUSIONES

Hasta el momento, los resultados de los marcadores moleculares ISSR confirman lo sugerido por Naranjo y Poggio (2000) y por Ravenna (2003), sobre la base de estudios citológicos y morfológicos, respectivamente; acerca de rehabilitar el género *Rhodolirion Phil.*

## REFERENCIAS

- CHARTERS Y.M., ROBERTSON, A., WILKINSON M.J., RAMSAY, G. 1996. PCR. analysis of oilseed rape cultivars using 5' anchored SSR primers. Theor. Appl. Genet. 92: 442-447.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- GE, X-Y.; YU, Y.; ZHAO, N-X.; CHEN H-S.; QI, W-Q. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica Maxim* (Zygophyllaceae). Biol. Conserv. 111: 427-434.
- HERRERA, R., ARIAS, M.; MOYA-LEON M.A.; PENAILILLO, P.; WILKINSON, M.J., CALIGARI, P. 2005. Genetic Variation in a Chilean Endangered Endemic: *Gomortega keule* (Molina) Baillon. Biodiv. Conserv. 14: 2871-2881.
- HERRERA, R.; CARES, V., WILKINSON, M.; CALIGARI, P.D.S. 2002 Characterization of the genetic variation and cultivar identification of *Vitis vinifera* cultivars using RAPD and anchored microsatellite markers. Euphytica 124:139-145.
- LUEBERT, F.; PLISCOFF, P. 2006. Sinopsis bioclimática y vegetal de Chile. Santiago, Chile, Editorial Universitaria. 318 p.
- MEEROW, A.; GUY, C., QIN-BAO, L.; YANG, S. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. Syst. Bot. 25: 708-72.
- MUÑOZ, M.; RIEGEL, R.; SEEMANN, P. 2006. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. Plant Breeding 125: 414-416.
- NARANJO, C. A.; POGGIO, L. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). Bol. Soc. Arg. Bot. 35: 335-343.
- PAVLICEK, A.; FLEGR, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. Int. J. Syst.Evol. Microbiol. 51: 731-735.
- RAVENNA, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis 2: 1-20.
- ROHLF, F.J. 1997, NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0. Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY.
- SHI, S.; QIU Y.; WU, L.; FU, Ch. 200. Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data. Scientia Hort. 110: 285-291.
- TRAUB, H. 1956. The genera *Rhodophiala* Presl and *Phycella* Lindl.: key to the species and synonymy. Plant life (Herbertia) 12: 67-76.

Proyecto financiado por FIA y Programa CONICYT de Centros Regionales-CIBS.