



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**ESTUDIO CROMOSÓMICO DE ESPECIES SILVESTRES Y  
VARIEDADES COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS**

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias  
Mención Producción de Cultivo.

**ELIZABETH NATIVIDAD SÁENZ CHÁVEZ**

Directores de Tesis:  
RICARDO PERTUZÉ CONCHA  
DANILO AROS ORELLANA

Profesores Consejeros:  
PAULETTE NAULIN GYSLING  
NATALIA PAMELA LAM PASTEN

SANTIAGO DE CHILE  
2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**ESTUDIO CROMOSÓMICO DE ESPECIES SILVESTRES Y VARIEDADES  
COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Ciencias  
Agropecuarias, Mención Producción de Cultivo.

**ELIZABETH NATIVIDAD SÁENZ CHÁVEZ**

Calificaciones

Directores de Tesis

Ricardo Pertuzé Concha, Ing. Agr., PhD Aprobado

Danilo Aros Orellana, Ing. Agr., PhD Aprobado

Profesores Consejeros

Paulette Naulin Gysling, Ing. Forestal., Dr Aprobado

Natalia Pamela Lam Pasten, Ing. en Acuicultura, Dr Aprobado

Santiago, Chile  
2015

“Tu visión devendrá más clara solamente cuando mires dentro de tu corazón... Aquél que mira afuera, sueña. Quién mira en su interior, despierta”  
Carl Jung

"Siempre parece imposible hasta que se hace"  
Nelson Mandela

“Más se estima lo que con más trabajo se gana”  
Aristóteles

“Trabaja desde lo que realmente eres; y no desde lo que crees que fueron los que triunfaron”  
Cristóbal Jodorowsky

“Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. La vida, en realidad, es una calle de sentido único”  
Agatha Christie

“La mayor rémora de la vida es la espera del mañana y la pérdida del día de hoy”  
Séneca

“Todos los que pertenecemos a un país somos extranjeros. Nuestra verdadera patria es la Tierra”  
Alejandro Jodorowsky

## AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas a quienes agradecer que espero ser lo justamente capaz de no olvidar a alguien.

A la divinidad que me impulsó y acompañó a dar este paso, que en un comienzo fue motivado más bien por un dolor, que se transformó en desafío, disciplina, fortaleza, crecimiento y evolución.

A Ramón Vásquez que me impulsó, apoyó logística y domésticamente; y contuvo para tomar la decisión de realizar esta travesía. A María José Vásquez que tuvo la filantrópica voluntad de hacer todos los trámites de obtención de documentos para la postulación, sin ella, básicamente no habría podido siquiera ingresar a este postgrado. A Emilia Díaz y Raúl Vásquez, quienes me brindaron muchísimo apoyo para con mis hijos en el traslado de ciudad.

A mi madre, Matilde, que me acogió nuevamente en su hogar y me alentó cada vez que las fuerzas flaqueaban. A mis hijos, sobre todo a Martín Ignacio, que mayormente me acompañó y soportó. A mis profesores directores, en especial a Ricardo Pertuzé por su siempre excelente disposición a resolver problemas, a Natalia Lam por ser mi gurú y maestra en mi investigación, a Paulette Naulín por iluminarme en el momento y lugar indicado. A Paola Silva Candia, por ser mi consejera y guía académica y estar siempre en las buenas y en las malas. A las y los funcionaria/os administrativos con tan buena voluntad: Jeannette Piza, Marjorie Sáez, María Sonia Cousiño, Rubén Sepúlveda, María Eugenia Nuñez, Silvia Inostroza y Jacqueline Lacoste. A las maravillosas amigas que conocí y que llevo en mi corazón: Marisol Valdés, Claudia Abarca y Andrea Cerda...más que funcionarias técnicas de la U, fueron mi soporte, mis yuntas, mis guías, mis instructoras y consejeras. A Alan Zamorano por tener una voluntad maravillosa, por ayudarme con las fórmulas químicas, a realizar preparaciones y facilitarme insumos cada vez que los necesité. A Héctor Duchens, el real profe de Bioquímica que tuve. A María Paz Quezada, Daniela Aranda, Mayerly Prieto, Juan Pablo Pizarro, Aníbal Araya, Antonia Santander, Constanza Rivas, Nicolás Quiroga, exquisitas personas y que todas ellas me apoyaron y aconsejaron de alguna forma u otra. A mi amiga de la infancia, Vania Pérez quien influyó a que me desempeñara como docente en forma paralela al desarrollo de este trabajo y, que gracias a ello, pude mantenerme económicamente, pero más allá de eso ayudó a encontrar mi vocación, ¿casualidad?, no lo creo. Finalmente a Liliannette Narváez por alinear mis chacras y ser la mejor terapeuta que el destino urdió que conociera.

## **DEDICATORIA**

A uno de mis grandes motores para iniciar este proyecto: mis hijos Martín Ignacio y Valentina Paz. A mis nietos Benjamín Alonso y Renata Matilde. A mi madre que tuvo siempre esa visión y aplicación de estímulo, motivación y agasajo en cada logro que en la vida tuve; y que también me contuvo y me fortaleció en cada fracaso. Me apoyó con todo el amor y desde un comienzo en esta aventura y quien, ante mis ojos, no alcanzó a ver mi obra culminar, pero que sé que a pesar de su partida, siguió acompañándome y bendiciéndome. A Emilia Díaz, que tampoco, y desde esta dimensión, pudo enterarse que su gran ayuda tuvo frutos, es por eso que se la retribuyo con amor y dedicatoria con mis más sinceros agradecimientos.

## ÍNDICE

### ÍNDICE DE CONTENIDOS

#### CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

#### VARIACIONES CROMOSÓMICAS ENTRE ESPECIES DE SILVESTRES Y VARIEDADES COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS 1

##### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 1

##### El Género *Alstroemeria* 1

##### Origen 1

##### Característica de la especie 1

##### Importancia Económica 2

##### Citología 3

##### Definición 3

##### Procedimiento 4

##### Aplicación de los estudios citológicos 6

##### Estudios citológicos en alstroemeria 7

##### Consideraciones finales 8

##### LITERATURA CITADA 11

#### CAPÍTULO II: CAPÍTULO CIENTÍFICO

#### ESTUDIO CROMOSÓMICO DE ESPECIES SILVESTRES Y VARIEDADES COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS 18

##### RESUMEN 18

##### ABSTRACT 19

##### INTRODUCCIÓN 20

##### HIPÓTESIS 22

##### OBJETIVOS 22

##### Objetivo General 22

##### Objetivos Específicos 22

#### MATERIALES Y MÉTODOS 23

##### Material Vegetal 23

##### Metodología 26

##### Optimización de protocolo de cromosomas metafásicos 26

##### Determinación del número cromosómico en tres especies silvestres y dos variedades comerciales de alstroemeria 27

##### Estudio y comparación del cariotipo en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria 27

#### RESULTADOS 29

##### Optimización de protocolo de cromosomas metafásicos 29

##### Determinación del número cromosómico en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemerias. 35

##### Estudio y comparación del cariotipo en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria 38

##### Montaje de cariotipo 38

#### DISCUSIÓN 43

##### Optimización de protocolo de obtención de cromosomas

metafásicos	43
Determinación del número cromosómico en tres especies silvestres y dos variedades comerciales de alstroemerias	44
Estudio y comparación del cariotipo de especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria	45
CONCLUSIONES	47
LITERATURA CITADA	48
APÉNDICE	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Raicillas o brotes obtenidos de plantas de <i>Alstroemeria</i> de invernaderos.	24
Cuadro 2. Condiciones utilizadas para lograr la visualización de cromosomas metafásicos.	26
Cuadro 3. Condiciones de temperaturas y tiempos utilizados para la hidrólisis ácida..	27
Cuadro 4. Clasificación cromosómica según el índice centromérico.	28
Cuadro 5. Condiciones analizadas con inhibidores mitóticos.	29
Cuadro 6. Condiciones analizadas en la hidrólisis ácida.	29
Cuadro 7. Condiciones de tiempos de remojo en agua destilada del material Vegetal.	30
Cuadro 8. Resumen de los mejores protocolos obtenidos para visualizar placas metafásica en especies silvestres y variedades de alstroemeria.	31
Cuadro 9. Número de placas metafásicas de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal de alstroemeria var. Sweet Laura.	35
Cuadro 10. Número de placas metafásicas de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal de alstroemeria var. Snow White.	36
Cuadro 11. Número de placas metafásicas de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal de <i>Alstroemeria spathulata</i> .	36
Cuadro 12. Número de placas metafásicas de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal de <i>Alstroemeria pelegrina</i> .	36
Cuadro 13. Número de placas metafásicas de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal de <i>Alstroemeria psittacina</i> .	37
Cuadro 14. Comparación cariotípica de las variedades y especies silvestres.	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flores de Alstroemeria.	25
Figura 2. Placas metafásicas de <i>Alstroemeria psittacina</i>	30
Figura 3. Placa metafásica de <i>Alstroemeria</i> variedad Sweet Laura.	31
Figura 4. Placa metafásica de <i>Alstroemeria</i> var. Snow White.	32
Figura 5. Placa metafásica de <i>Alstroemeria spathulata</i> .	33
Figura 6. Placa metafásica de <i>Alstroemeria pelegrina</i> .	33
Figura 7. Placa metafásica de <i>Alstroemeria psittacina</i> .	34
Figura 8. Cariotipo de alstroemeria var. Snow White	38
Figura 9. Cariotipo de <i>Alstroemeria spathulata</i>	39
Figura 10. Cariotipo de <i>Alstroemeria pelegrina</i> .	40
Figura 11. Cariotipo de <i>Alstroemeria psittacina</i> .	41

Figura 12. Imágenes de núcleos celulares de raicillas de *Alstroemeria psittacina*.

52



# VARIACIONES CROMOSÓMICAS ENTRE ESPECIES DE SILVESTRES Y VARIETADES COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### El Género *Alstroemeria*

#### Origen

El nombre de *Alstroemeria* fue establecido en 1762 por Carolus Linnaeus, cuyo nombre se lo dedicó a su amigo Claus Alstroemer. Originalmente Linneo incluyó en este género tres especies, las cuales habían sido descritas en 1714 por el padre Louis Feuilleé, bajo el nombre de *Hemerocallis*. Aquél utilizó como epítetos específicos los nombres citados por Feuilleé: *Alstroemeria pelegrina*, *A. ligtu* y *A. salsilla*, esta última pertenece actualmente al género *Bomarea* (Sanso, 1996).

El género *Alstroemeria* pertenece a la familia *Alstroemeriaceae*, tiene su origen en América del Sur conforme a Hofreiter y Rodríguez (2006) y Hofreiter y Tillich (2002); y posee 82 taxones distribuidos desde Venezuela hasta Argentina y Chile (Ruiz *et al.*, 2010). La mayor cantidad de especies se encuentra en Chile central (Bayer 1987; Muñoz y Moreira 2003) y; al Este y centro de Brasil (Aker & Healy 1990).

Las especies del género *Alstroemeria* crecen desde el nivel del mar hasta los 4.500 metros de altitud (Aagesen *et al.*, 2003; Ravenna 1988, Sanso 2002). En Chile existen 49 taxones (33 especies, 8 subespecies y 8 variedades); de los cuales 40 son endémicas y 42 están en la zona central del país (28°-38° S), sólo tres especies se distribuyen al Norte de los 28° S y cuatro al Sur de los 38° S (Muñoz y Moreira 2003). El alto nivel de endemismo que presenta el género en esta zona geográfica podría deberse a la gran diversidad de ambientes que ofrece la zona central del país (Arroyo *et al.*, 1993; Lazo *et al.*, 2008). Se ha determinado que las especies silvestres de alstroemeria son diploides ( $2n = 2x = 16$ ) (Zhou *et al.*, 2003; Jara *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2006 y 2007).

#### Característica de la especie

Las alstroemerias son plantas herbáceas y geófitas que producen dos tipos de brotes: floral y vegetativo, que se originan a partir de rizomas subterráneos (Bridgen, 1997).

La alstroemeria es una planta monocotiledónea, perenne, compuesta por uno o varios tallos no ramificados, erectos o rastreros que terminan en rizomas y raíces de almacenamiento (Muñoz y Moreira, 2003). Las raíces de almacenamiento de almidón de varias especies de *Alstroemeria* son comestibles. Las hojas son sésiles, simples, enteras, generalmente

resupinadas y lanceoladas. Las hojas pueden ser membranosas o cartáceas; lineales, lanceoladas o elípticas (Bayer, 1987).

Las plantas producen grandes y hermosas inflorescencias de diferentes colores incluyendo púrpura, rojo lavanda, rosa, amarillo, damasco, naranja, blanco y bicolors (Pounders *et al.*, 2003). Dicha inflorescencia es una umbela terminal cimosa simple o ramificada de dos a más flores; rara vez las flores pueden ser solitarias y están envueltas en hojas como brácteas. Las flores son zigomorfas y bisexuales con seis tépalos libres y petaloides en dos verticilos. Los tépalos pueden ser similares o diferentes, el interior a menudo más corto, modelado y basalmente reducido en conductos nectíferos. Seis estambres libres están dispuestos en dos verticilos. Las anteras son pseudo-basifijadas longitudinalmente intra-dehiscencia. El ovario es inferior, tricarpelado, y trilocular con placentación axilar (Bayer, 1987).

La alstroemeria tiene el estilo trífido, siendo de polinización cruzada y protándrica, es decir, los estambres maduran antes que el pistilo (Suárez *et al.*, 2007); por tanto al ser de polinización cruzada, la alstroemeria cuenta con alta heterocigosidad y por ende, amplia variabilidad genética (Suárez *et al.*, 2007), presentando una reducida autofertilización. No obstante, las especies del género *Alstroemeria* también pueden reproducirse vegetativamente a través de rizomas, lo que ayudaría a mantener altos niveles de estabilidad genética, es decir, baja heterocigosidad (Ruiz *et al.*, 2010).

El fruto es una cápsula elíptica dehiscente y las semillas son globosas sin sarcotesta (capa carnosa fresca exterior) (Bayer, 1987). Todas las especies de *Alstroemeria* diseminan sus semillas por balacoría -proceso explosivo de la cápsula- (Rougier, 2005).

### **Importancia Económica**

La alstroemeria es una flor de corte importante en el norte de Europa (Breeze *et al.*, 2004), siendo introducidas en el viejo continente en el siglo XVI (Sanso *et al.*, 2005). Las variedades comerciales de alstroemeria, comenzaron a ganar popularidad en la década de 1970, principalmente como cultivo de flor de corte (Bridgen *et al.*, 2009). Es una de las pocas flores de corte comerciales que se adaptan al medio ambiente frío en el norte de Europa. Con la selección adecuada de las variedades es posible cosechar las flores de alstroemeria durante todo el año cuando se cultivan bajo condiciones de invernadero, sin la necesidad de iluminación adicional durante este período (Wagstaff *et al.*, 2001).

Tanto fue la popularidad de esta flor, que durante el 2008, en las subastas de flores de Holanda –que son un buen indicador de las especies más vendidas en la Unión Europea- la alstroemeria ocupó el séptimo lugar dentro de las principales especies con 245 millones de varas transadas (Kamminga, 2008). No obstante, según Cuenca en el 2010, este lugar fue desplazado por la freesia.

A pesar de su rica diversidad, las especies silvestres son de poco valor comercial debido a que muchas de las plantas están en estado latente gran parte del año (Bridgen *et al.*, 2009). No obstante, gracias a países como Holanda, Inglaterra, Japón y Estados Unidos que presentan programas de cultivo, mejoramiento y propagación de esta especie con fines

comerciales (Miyake 1989, De Jeu *et al.*, 1992); se ha logrado potenciar factores para su venta, tales como la durabilidad de sus flores, tamaño y arquitectura del perigonio. Además, si los híbridos comerciales de alstroemeria se cultivan adecuadamente, las plantas tienen un hábito de permanente floración (Kim *et al.*, 2002) y como flor de corte, poseen larga vida en florero (Bridgen *et al.*, 2009).

Las variedades comerciales de alstroemeria son producto de hibridaciones, mutaciones y poliploidización (Sanso 1996). La hibridación interespecífica es un método para el mejoramiento genético y que permite la introducción de alta variación en cultivos ornamentales (Zhou *et al.*, 2003); con ello se han desarrollado numerosas variedades comerciales, que actualmente son utilizadas como flores de corte y plantas en macetas, que se han propagado por todo el mundo (Hoshino *et al.*, 2006).

Entre las especies silvestres de Sudamérica, que son diploides y que se han considerado como parentales de las variedades comerciales o como excelentes candidatos para su producción, figuran *A. ligtu* L., *A. pelegrina* L., *A. aurea* Graham, *A. magenta* Bayer, *A. psittacina* J.G.C. Lehmann, *A. inodora* Herb., *A. pulchra* Sims, *A. violacea* Phil., *A. versicolor* Ruiz et Pavón y *A. caryophyllea* Jacq. (Hoshino, 2008). Sin embargo, la dificultad de crear híbridos interespecíficos aumenta junto con la distancia filogenética entre los parentales (Sharma, 1995). Por lo anterior, 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 (Delgado *et al.*, 2010). El nivel de ploidía por ejemplo, es una de ellas. En este sentido, Poehlman y Allen (2003) mencionan que el cruzar progenitores con diferentes niveles de ploidía, puede dar como resultado progenies estériles o genéticamente inestables; por lo que el estudio citológico previo es indispensable para conocer niveles de ploidía de los parentales y/o determinar si hubo cambios de tales niveles (Baeza *et al.*, 2007), evaluando la biodiversidad y dinámica de la vegetación (Arroyo *et al.*, 1993).

## Citología

### Definición

Según De Juan (1999), la citología es una disciplina científica factual, rama de la Biología, que estudia las células de todos los organismos (Células procariotas y eucariotas). Dicho estudio se realiza desde un punto de vista microscópico, en los siguientes niveles de complejidad: molecular (Biología Molecular), celular (Biología Celular General), tisular y de órganos (Biología Celular Especial o Histología). Por último y al considerar a la estructura y a la función como caras de una misma moneda, y no poder darse la segunda sin la primera, también a la Biología Celular le compete el estudio de la función (Fisiología Celular).

Por tanto y al ser su definición tan amplia, los estudios citológicos también comprenden el análisis y comparación de la morfología, simetría y tamaño de los cromosomas entre especies y/o subespecies, con la perspectiva de que el análisis detallado de los cromosomas y de los taxa relacionada, pudiendo proporcionar información valiosa relacionada con su evolución y su taxonomía (Dimitrova y Greilhuber, 2000). Similar definición tiene la citogenética: Rama de la genética que relaciona la herencia con la estructura y el funcionamiento celular con especial interés en los cromosomas (Ville *et al.*, 1998); En forma general, la citogenética agrupa un conjunto de técnicas que aplican diferentes métodos de la biología molecular directamente sobre preparaciones citológicas tales como tejidos, células, cromosomas y fibras de ADN (Herrera, 2007). El análisis del cariotipo, en tanto, radica en la comprobación exacta de los niveles de ploidías en el germoplasma de una especie y se realiza mediante el conteo de los cromosomas (Van Den Houwe *et al.*, 1995). El cariotipo de taxa se analiza para complementar los estudios citogenéticos comparativos entre especies. Al realizar comparaciones entre especies con igual número de cromosomas, pero con diferencias cariotípicas, pueden usarse aquellos cromosomas similares (por ejemplo, metacéntrica) como marcadores dentro del género (Palma *et al.*, 2007).

### **Procedimiento**

La observación de cromosomas mitóticos en la mayoría de las plantas se consigue con la aplicación de métodos y protocolos convencionales muy generalizados. De acuerdo al material a estudiar, se toman decisiones respecto del tejido que se utilizará para conseguir numerosas divisiones mitóticas y cuál será el método más adecuado para visualizar los cromosomas; se destaca que la colecta y preparación del material es fundamental (Pereira *et al.*, 2013).

En plantas, la mayor cantidad de células mitóticas se encuentra generalmente en el tejido meristemático, tejido encontrado en diferentes órganos vegetales que se caracteriza por presentar células indiferenciadas (Valladolid *et al.*, 2004). Para el análisis cromosómico mitótico el meristema más adecuado es el radical (Delgado *et al.*, 2010), debido principalmente al volumen histológico y porque absorben más fácilmente las soluciones externas, aspecto muy importante cuando se usan inhibidores mitóticos (Pereira *et al.*, 2013). La obtención de raíces para el análisis cromosómico puede realizarse a partir de semillas, bulbos, tallos y plantas adultas cultivadas en macetas (Honfi *et al.*, 1990; Hojsgaard *et al.*, 2009; Daviña *et al.*, 2009).

Si no se cuenta con raíces apropiadas, pueden ser utilizados otros meristemas, como por ejemplo, la parte más joven y central de los brotes en crecimiento, anteras y paredes del ovario de los botones florales menores y varios otros órganos de crecimiento activo (zarcillos, pétalos, embriones, óvulos, etc.) (Daviña com. pers. 2013). Otro aspecto a tener en cuenta es el horario en el que se seleccionan las raicillas, dado que en la mayoría de las especies, los horarios matutinos, entre 10:00 a 12:00 h, dan buenos resultados por tener una mayor actividad mitótica en ese período (Pereira *et al.*, 2013).

Según Delgado *et al.*, (2010) y Baeza *et al.*, (2000, 2001, 2004, 2007), el procedimiento para el recuento cromosómico y estudio cariotípico en especie de *Alstroemeria* consiste en las siguientes etapas:

1. ***Obtención del material vegetal***

Ápices radiculares o brotes de plantas colectadas entre las 10:00 y 12:00 h.

## 2. ***Prefijación o Pretratamiento***

Considerando que en la etapa de mitosis se acumula el mayor número de células metafásicas en el meristema y que en la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación y se encuentran individualizados, es el momento preciso en que 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 (Valladolid *et al.*, 2004). Dos inhibidores mitóticos son utilizados como pretratamiento, la 8HQ (8 hidroxiquinolina) y la colchicina. La 8HQ 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 (Aarestrup *et al.*, 2008).

## 3. ***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 (Valladolid *et al.*, 2004).

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 las características ya mencionadas es el Reactivo de Farmer (etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1) (García, 1998).

## 4. ***Maceración o 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 como la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos, o mezclas de ambos (Valladolid *et al.*, 2004).

En general, se usa el proceso de hidrólisis ácida con HCl, 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; siendo la pared celular una de las barreras más importantes durante este proceso, este 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 (Haskell and Willis, 1968), 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 aplastado, que es muy usado antes de tinción con orceína o carmín (Haskell and Willis, 1968).

#### 5. **Tinción**

Para la coloración de los cromosomas es posible utilizar 4 tintes: Orceína acética, Reactivo de Feulgen, Acetocarmín (Delgado *et al.*, 2010) y DAPI (1,0 ng/l de 4',6-diamidino-2-fenilindol). DAPI es una técnica de tinción con fluorescencia que en estudios citológicos permite visualizar secuencias de DNA repetitivas en el genoma de una especie vegetal (Schmidt y Heslop-Harrison 1998). En estudios cromosomales y cariotípicos de Alstromerías se usa con frecuencia Orceína Acética o DAPI (Baeza *et al.*, 2000, 2001, 2004, 2007).

#### 6. **Aplastado o Squash**

Después del proceso de coloración, se realiza un aplastado de la raicilla o brote entre el porta y el cubreobjetos, para así dispersar las células y los cromosomas que se hacen visibles al encontrarse en un mismo plano (Delgado *et al.*, 2010).

#### 7. **Observación**

La observación microscópica dependerá de la tinción usada. Si la tinción es con orceína acética la observación podrá realizarse 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 (Delgado *et al.*, 2010). Si la observación es con DAPI, debe realizarse bajo un microscopio de iguales características al del anterior, pero con rayos U.V. (Baeza *et al.*, 2006 y 2008), ambos microscopios equipados con una cámara fotográfica.

### **Aplicación de los estudios citológicos**

Uno de los mecanismos más exitosos en el reino Plantae ha sido la poliploidía como una vía significativa en la formación de especies de plantas. La poliploidía, es la presencia de más de dos genomas por célula (Stebbins, 1950). La prevalencia de poliploides en plantas probablemente refleja la ventaja evolutiva y ecológica de tener copias extras del gen (Anssour *et al.*, 2009). Al aumentar el número de copias del gen funcional y por lo tanto su redundancia, permite acumular potencialmente nuevas mutaciones y funciones que podrían mejorar la condición física de la especie (Jiang *et al.*, 1998). Por tanto, la poliploidía afecta a las redes reguladoras de genes y de expresión (Pires *et al.*, 2004; Schranz y Osborn, 2004), lo que conduce a la variación de dosificación entre los rasgos fenotípicos (proporcionalmente creciente) y/o a la aparición de nuevos fenotipos que pueden contribuir a la especiación y la explotación de nuevas zonas de nichos ecológicos (Donald, 2004). Los poliploides a menudo ocupan diferentes hábitats que sus progenitores diploides, y se ha propuesto para ser colonizadores superiores de diploides (Stebbins, 1950). En comparación con sus progenitores, los ejemplares poliploides pueden desarrollar diferentes características morfológicas, ecológicas citológicas, y fenotipos (Levin, 1983; Ramsey y Schemske, 2002; Chen, 2007; Gaeta *et al.*, 2007). Es por ello que el hombre ha utilizado la poliploidía en mejora vegetal como un medio de obtener nuevos cultivos y/o para

intercambiar material genético entre especies relacionadas con el consiguiente incremento de variabilidad (Martin *et al.*, 1988).

Cada poliploidización se caracteriza por una inmediata amplificación del número de cromosomas (Jaillon *et al.*, 2009). Todos estos pasos son relativamente largos y sobre todo debido a las pérdidas de genes diferenciales, facilitan la aparición de una nueva especie. Cada hibridación entre sub-poblaciones con diferentes pérdidas de duplicados, es una combinación genética que puede conducir a la especiación, pudiendo ser potencialmente innovadora. Considerando que la ploidía y la reproducción sexual permite una mezcla genética entre cada generación de una especie y entre cada individuo, favoreciendo la aparición de nuevas especies; la variabilidad genética, entonces, podría ser explotada entre individuos, pero también entre los linajes emergentes que son todavía interfértiles (Jaillon *et al.*, 2009).

Por otro lado, la caracterización citológica de una especie de planta con potencial ornamental constituye una valiosa contribución hacia la protección de este recurso biológico, especialmente considerando búsquedas intensivas para nuevos genotipos de importancia ornamental. En países de Europa utilizan especies chilenas en los programas de mejora genética, pero si la información citológica básica no está disponible, un mayor desarrollo puede verse obstaculizado. Desde una perspectiva nacional, la falta de información biológica puede conducir a una negligencia de una especie en particular como una parte valiosa del patrimonio natural de Chile, resultando en pérdidas de oportunidades para la participación en nuevos negocios (Baeza *et al.*, 2010).

### **Estudios citológicos en alstroemeria**

De los trabajos relacionados con estudios cromosómicos en especies de Alstroemerias (De Jeu *et al.*, 1997; Kamstra *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1997; Buitendijk *et al.*, 1998; Kuipers *et al.*, 1998; Sanso y Hunziker, 1998; Kuipers *et al.*, 2002; Sanso, 2002; Zhou *et al.*, 2003; Jara *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2006 y 2007), se puede establecer que existe una gran estabilidad en cuanto al número de cromosomas diploides ( $2n=2x=16$ ). De esta forma se pueden reconocer los siguientes grupos de especies: *A. graminea* Phil., *A. magnifica* Herb. (con un par de cromosomas metacéntricos en su cariotipo), *A. andina* Phil. var. *venustula* (Phil.) M. Muñoz, *A. aurea* Graham, *A. angustifolia* Herb. *A. pelegrina* L., *A. philippii* Baker, (dos pares de cromosomas metacéntricos) y *A. ligtu* L. ssp. *ligtu* y *A. ligtu* L. ssp. *simsii* (Sprengel) Bayer (tres pares de cromosomas metacéntricos). Sus cariotipos son muy similares en términos de tamaño relativo entre los cromosomas (Sanso *et al.*, 2005).

Respecto a los cultivares de Alstroemeria, existen variedades diploides ( $2n= 2x =16$ ) (Tsuchiya *et al.*,1987), triploides ( $2n = 3x = 24$ ) (Tsuchiya *et al.*,1987; Baeza *et al.*, 2011 y Bridgen, 2009) y tetraploides ( $2n = 4x = 48$ ) (Baeza *et al.*, 2011 y Bridgen, 2009) e Hipertriploide (Tsuchiya *et al.*,1987), que se han originado a partir de la hibridación interespecífica (Ramanna *et al.*, 2003).

Existen diferencias cariotípicas en diferentes ambientes entre especies brasileñas y chilenas. Las alstroemerias chilenas crecen en regiones con largos períodos de sequía (Muñoz y Moreira, 2003; Moreira, 2011). Las especies brasileñas en general, crecen en hábitats más húmedos y con menor estrés por sequía. Existen diferencias ecológicas entre especies del género que se podrían haber representado, según, Buitendijk *et al.*, (1997) en los cariotipos

chileno y brasileño. Es evidente que aunque los tamaños de cromosomas en *Alstroemeria* varían de especie a especie, son cariotípicamente muy similares en términos de tamaño relativo entre cromosomas (Sanso, 2002). Similar opinión tienen Chacón *et al.*, (2012), los cariotipos en *Alstroemeria* son asimétricos (Stephens *et al.*, 1993; Buitendijk y Ramanna, 1996; Kamstra *et al.*, 1997; Sanso y Hunziker, 1998; Sanso, 2002; Jara-Seguel *et al.*, 2004; Sanso *et al.*, 2005; Baeza *et al.*, 2006.; Baeza *et al.*, 2010).

En ambientes distintos para una misma especie, existen diferencias cariotípicas. Un caso especial lo constituye *Alstroemeria hookeri* que posee cuatro subespecies, de las cuales, la subespecie tipo es endémica de las regiones del Maule y Bio Bío, cuya distribución geográfica consiste en dos rangos separados por la Cordillera de la Costa, presentando diferencias entre el cariotipo de las poblaciones costeras y del interior (Cajas *et al.*, 2009, Baeza *et al.*, 2010; Baeza *et al.*, 2007). Al parecer estas diferencias cariotípicas, sustentan los altos valores de estructuración poblacional encontrados en estas poblaciones dada por un escaso número de alelos y la presencia de alelos únicos y que pudieran tener importancia selectiva frente a los cambios ambientales, y que, acompañadas por procesos microevolutivos, podrían dar paso a la divergencia de dos linajes genéticamente distintos dentro de estas subespecies separadas por la Cordillera de la Costa (Ruiz *et al.*, 2010).

Otro ejemplo de diferencias cariotípicas dentro de una misma especie se observa en las subespecies analizadas de *A. presliana*. Al comparar los tres primeros pares de cromosomas se observan diferencias notables en cuanto a la morfología, ya que el cromosoma 3 en la ssp. *presliana* es metacéntrico y en la ssp. *australis* es telocéntrico (Baeza *et al.*, 2008), similar observación tiene Cajas *et al.*, (2009); indicando que dentro de subespecies, de igual número cromosómico, que ocupan un área considerada como *hotspot* dentro de la flora chilena, la variación del cariotipo es importante no sólo por la variabilidad genética que ello representa, sino porque es un importante rasgo micromorfológico para comprender la evolución de la especie. Esta variación, en la asimetría de los cariotipos, estaría indicando translocación de segmentos cromosómicos y las diferencias en longitud total del cromosoma (LTC) entre poblaciones de la misma especie con igual número cromosómico podrían indicar duplicación o delección de segmentos (Shan *et al.*, 2003).

### Consideraciones finales

Es importante preguntarse el porqué ocurren estos cambios microevolutivos que ha ido experimentado las especies de *Alstroemeria*. Existen tres importantes factores que responden a la pregunta y que inciden sobre los niveles de diversidad genética y su distribución en poblaciones naturales de plantas, a saber:

- ✓ El sistema de reproducción,
- ✓ La dispersión de semillas y
- ✓ El aislamiento reproductivo entre poblaciones. (Hamrick & Godt 1989, 1996, Hamrick & Nason 1996).

Estos tres factores en conjunto juegan un rol fundamental en los valores de variabilidad genética y estructuración poblacional (Ruiz, *et al.*, 2010).



Respecto del primer factor, las alstroemerias tienen un modo de reproducción cruzada asistida por insectos (Cavieres *et al.*, 1998, Botto-Mahan & Ojeda-Camacho 2000, Suárez *et al.* 2009). Esto haría esperable una alta variabilidad intrapoblacional y baja variabilidad entre poblaciones (Hamrick & Godt 1996). Por otro lado, cuando hay autocompatibilidad y reproducción vegetativa, la situación es contraria, esperándose una baja variabilidad intrapoblacional y altos niveles de variabilidad interpoblacional (Hamrick & Godt 1996). Se ha documentado que la mayoría de las especies de *Alstroemeria* son parcial o completamente autocompatibles (Rougier 2005), y se reproducen vegetativamente a través de rizomas. De esta forma se favorecería una baja diversidad genética intrapoblacional y alta variabilidad entre poblaciones. Sin embargo, la autocompatibilidad no significa necesariamente que exista autopolinización, de hecho también se ha descrito que la protandria ocurre en el género, lo que resultaría clave para disminuir la autofertilización (Ruiz *et al.*, 2010).

En relación al segundo factor, todas las especies de alstroemeria diseminan sus semillas por balacoría (gravedad) de la cápsula (Rougier 2005), lo que indica que la dispersión de las semillas es relativamente restringida, si se compara con procesos de dispersión asistida por viento o animales (Ruiz *et al.*, 2010); y para el tercer factor, la separación espacial entre las poblaciones, hace que el flujo génico entre ellas se vea muy afectado dependiendo de la capacidad de vuelo de los polinizadores (Ruiz *et al.*, 2010).

No obstante, un aspecto importante a considerar es que la variabilidad genética entre las poblaciones no es explicada por la distancia geográfica, sino que está altamente influenciada por el sistema de reproducción cruzada, probablemente con autofertilización ocasional, reproducción vegetativa a través de rizomas y baja capacidad de diseminación de polen y dispersión de semillas (Ruiz *et al.*, 2010).

Por lo anterior, los estudios citológicos son indispensables para lograr una clasificación que refleje relaciones evolutivas en las diferentes especies, lo que permite una adecuada evaluación de la biodiversidad de regiones particulares y por lo tanto, facilita dilucidar el origen de la flora y comprender la estructura y dinámica actual de la vegetación; ya que establecer el nivel de ploidía de una especie, o encontrar cambios en él, puede ayudar a entender mejor la variabilidad morfológica de un taxón determinado (Baeza *et al.*, 2007; Van den Houwe *et al.*, 1995).

Y aunque todos los estudios realizados en ploidía de alstroemeria silvestre indican que es una especie diploide, según Tsuchiya *et al.*, (1987), el híbrido comercial de alstroemeria primero fue un diploide híbrido interespecífico, que dio lugar a cultivares poliploides que se originaron espontáneamente en invernaderos (Goemans, 1962).

Esta tendencia a la poliploidización espontánea parece ser un fenómeno común en alstroemeria y ha contribuido sustancialmente al desarrollo de variedades comerciales (Ramanna, 1991). No obstante, no se ha registrado eventos de poliploidización en especies silvestres, aunque existen observaciones preliminares en terreno que muestran diferencias morfológicas y de tamaño –característica de la poliploidía- entre las poblaciones costeras y las del interior, para *A. hookeri* ssp. *hookeri*, específicamente en los caracteres florales (C.

Baeza, comunicación personal) y habiéndose documentado diferencias entre el cariotipo de las poblaciones costeras y del interior (Cajas *et al.*, 2009, Baeza *et al.*, 2010); por lo cual podría existir poliploidía en especies silvestres de alstroemeria y en otras Amaryllidaceae (García *et al.*, 2014).

**LITERATURA CITADA**

- AAGESEN, L.; and SANZO, M. 2003. The phylogeny of the *Alstroemiaceae*, based on morphology, rps16 Intron, and rbcL sequence data. *Systematic Botany* 28: 47-69.
- AARESTRUP J.R.; KARAM D.; and FERNANDES G.W. 2008. Chromosome number and cytogenetics in *Euphorbia heterophylla* L. *Genetics and Molecular Research* 7: 217-222.
- AKER, S. & HEALY, W. 1990. The phylogeography of the genus *Alstroemeria*. *Herbertia* 46: 76-87
- ANSSOUR, S.; KRUGEL, T.; SHARBEL, T.F.; SALUZ, H.P.; BONAVENTURE, G.; and BALDWIN, I.T. 2009. Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*. *Annals of Botany* 103: 1207–1217.
- ARROYO, M.T.K.; ARMESTO, J.; SQUEO, F.; and GUTIÉRREZ, J. 1993. Global Change: The flora and vegetation of Chile. En H. Mooney, E. Fuentes & B. Kronberg (eds). *Earth Systems response to Global Change: Contrast between North and South America*. Academic Press, New York, pp. 239-264.
- BAEZA, C.; ESPEJO, J.; and RUIZ, E. 2011. The fundamental karyotype of *Alstroemeria versicolor* Ruiz et Pav. (*Alstroemiaceae*). *Gayana Botanica* 68: 327-329.
- BAEZA, C.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2010. Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd. (*Alstroemiaceae*) complex sensu Bayer (1987). *Genetics and Molecular Biology* 33: 119–124.
- BAEZA, C.; RUIZ, E.; and NOVOA, P. 2010. karyotype of *Alstroemeria diluta* EHR. Bayer subsp. *Chrysantha*. *Chilean journal of agricultural research* 70:667-669.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2008. *Alstroemeria presliana* Herb. (*Alstroemiaceae*) in Chile upon a cytogenetic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68 :328-333.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; TERRAB, A.; STUESSY, T.; ROSAS, M.; RUIZ, E.; NEGRITTO, M.; and URTUBEY, E. 2007. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. III. *Gayana Bot.* 64: 175-183.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2006. Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* y *A. ligtu* subsp. *simsii* (*Alstroemiaceae*) de Chile. *Darwiniana* 44: 313-318.

- BAEZA, C.; VOSYKA, M.; and STUESSY, T. 2004. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. II. Darwiniana 42: 25-29.
- BAEZA, C.; KOTTIRSCH, G.; ESPEJO, J.; and REINOSO, R. 2001. Recuentos cromosómicos en plantas chilenas. I. Gayana Botánica 58: 133-137.
- BAEZA, C.; GRAU, J.; VOSYKA, M.; STUESSY, T.; and WEISS, H. 2000. Recuentos cromosómicos en especies de *Hypochaeris* L. de Chile. Gayana Botánica 57: 105-106.
- BAYER, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung. Munchen 24: 1-362.
- BREEZE, E.; WAGSTAFF, C.; HARRISON, E.; BRAMKE I.; ROGERS H.; STEAD, A.; THOMAS, B.; and BUCHANAN-WOLLASTON, V. 2004. Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in alstroemeria petals. Plant Biotechnology Journal 2: 155-168.
- BRIDGEN, M.; KOLLMAN, E.; and CHUNSHENG, LU. 2009. Interspecific Hybridization of *Alstroemeria* for the development of new, ornamental plants. Acta Horticulturae 836: 73-78.
- BRIDGEN, M. 1997. *Alstroemeria*. Geo. J. Ball Publishing Co, W. Chicago, IL. V. Ball (ed.), Ball red book, 16th ed., p.341-348.
- BOTTO-MAHAN, C.; and OJEDA-CAMACHO, M. 2000. The importance of floral damage for pollinator visitation in *Alstroemeria ligtu* L. Revista Chilena de Entomología (Chile) 26: 73-76.
- BUITENDIJK, J. H.; PETERS, A.; JAN-QUENÉ, R.; and RAMANNA, M. 1998. Genome size variation and C-band polymorphism in *Alstroemeria aurea*, *A. ligtu* and *A. magnifica* (*Alstroemeriaceae*). Plant Syst. Evol. 212: 87-106.
- BUITENDIJK, J.H.; BOON, E.J.; and RAMANNA, M.S. 1997. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their Hybrids. Ann Bot-London 79: 343-353.
- BUITENDIJK, J.H.; and RAMANNA, M.S. 1996. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. Annals of Botany 78: 449-457.
- CAJAS, D.; BAEZA, C.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2009. Análisis citogenético en poblaciones de *Alstroemeria hookeri* lodd. spp. *hookeri* (*Alstromeriaceae*) en la región del Bío-Bío Chile. Gayana Bot. 66: 117-126.
- CAVIERES, L.A.; PEÑALOZA, A.P.; and ARROYO, M.T.K. 1998. Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (*Amaryllidaceae*). Gayana Botánica 55: 1-10

CHACÓN, J.; SOUSA, A.; BAEZA, C.; and RENNER, S. 2012. Ribosomal dna distribution and genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*). *American Journal of Botany* 99: 1501–1512.

CHEN, Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58: 377–406.

CUENCA, F. 2010. Las flores más vendidas. <http://www.floresyplantas.net/las-flores-mas-vendidas/> .[www.floresyplantas.net](http://www.floresyplantas.net) Magazine Online.

DAVIÑA, J. R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J. C.; HOJSGAARD, D. H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I. S.; and HONFI, A. I. 2009. Chromosome studies in *Orchidaceae* from Argentina. *Genet. Mol. Biol.* 32, 4: 811-821.

DE JEU, M.; LASSCHUIT, J.; KUIPERS, A.; KAMSTRA, S.; and VISSER, R. 1997. Characterisation and localization of repetitive DNA sequences in the ornamental *Alstroemeria aurea* Graham. *Theor. Appl. Genet* 94: 982-990.

DE JEU, M.J.; SASBRINK, H.; CALDERE, F.G.; and PIKET, J. 1992. Sexual reproduction biology of *Alstroemeria*. *Acta Hort.* 325: 571-575.

DE JUAN, H. 1999. ¿De qué están hechos los organismos?. Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante. 207 pp.

DELGADO, L.M.; URIBE, M.; and MARULANDA, M. 2010. Estandarización de la técnica citogenética “squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica* Año XVII. 46: 74-79.

DIMITROVA, D.; and GREILHUBER, J. 2000. Karyotype and DNA-content evolution in ten species of *Crepis* (*Asteraceae*) distributed in Bulgaria. *Bot. J. Linn. Soc.* 132: 281-297.

GAETA, R.T.; PIRES, J.C.; INIGUEZ-LUY, F.; LEON, E.; and OSBORN, T.C. 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *The Plant Cell* 19: 3403–3417.

GARCÍA, N.; MEEROW, A.; SOLTIS, D. and SOLTIS, P. 2014. Testing Deep Reticulate Evolution in Amaryllidaceae Tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany* 39: 75–89.

GARCIA, V.A. 1998. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. 3ª ed. Universidad Autónoma de Chipango. Chipango, México. 144 pp.

GOEMANS, J.A.M. 1962. Breeding of alstroemerias. *J Roy Hort Soc* 87: 282–284.

HAMRICK, J.L.; and GODT, M.J.W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *Avisé JC & JL Hamrick (eds) Conservation genetics. Case histories from nature.* Chapman and Hall, New York, USA. 281-304.

- HAMRICK, J.L.; and GODT, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. En: Brown HD, MT Clegg, AL Kahler & BS Weir (eds) Plant population genetics, breeding and germplasm resources: 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.
- HAMRICK, J.L.; and NASON, J.D. 1996. Consequences of dispersal in plants. En: Rhodes OE, RK Chesser & MH Smith (eds) Population dynamics in ecological space and time: 203-235. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- HASKELL, G.; and WILLIS, A.B. 1968. Primer of Chromosomes Practice. Oliver and Boy Londres. 150 pp.
- HERRERA, J. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*. 1: 26-35.
- HOFREITER, A.; and RODRÍGUEZ, E. F. (2006) The *Alstroemeriaceae* in Peru and neighbouring areas. *Revista Peruana Biología* 13: 5-69.
- HOFREITER, A.; and TILLICH H. 2002. The delimitation, infrageneric subdivision, ecology and distribution of *Bomarea* Mirbel (*Alstroemeriaceae*). *Feddes Repertorium* 113, 528-544.
- HOJSGAARD, D.H.; HONFI, A.I.; RUA, G.H. and. DAVIÑA, J.R. 2009. Chromosome numbers and ploidy levels of Paspalum species from Subtropical South America (Poaceae). *Gen. Res. Crop Evol.* 56: 533-545.
- HONFI, A.I.; QUARIN, C.L.; and VALLS, J.F.M. 1990. Estudios cariológicos en Gramíneas Sudamericanas. *Darwiniana*30 (1-4): 87-94.
- HOSHINO, Y. 2008. Advances in *Alstroemeria* Biotechnology. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 5: 540-547.
- HOSHINO, Y.; MURATA, N.; and SHINODA, K. 2006. Isolation of Individual Egg Cells and Zygotes in alstroemeria Followed by Manual Selection with a Microcapillary-connected Micropump. *Annals of Botany* 97: 1139–1144.
- JAILLON, O.; AURY, J-M.; and WINCKER P. 2009. Changing by doubling, the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. *C. R. Biologies* 332: 241–253.
- JARA-SEGUEL, P.; PALMA-ROJAS, C.; and VON BRAND, E. 2004. Karyotypes and C-bands in the annual Inca lily *Alstroemeria graminea*. *Belgian Journal of Botany* 137: 199–204.
- JIANG, Y.; SCARPA, A.; ZHANG, L.; STONE, S.; FELICIANO, E.; and FERRO-NOVICK, S. 1998. A high copy suppressor screen reveals genetic interactions between BET3 and a new gene. Evidence for a novel complex in ER-to-Golgi transport. *Genetics* 149(2):833-41.

- KAMMINGA, H. 2008. *Alstroemeria* may be the new eye catcher. *FlowerTECH* 11(4): 7-8.
- KAMSTRA, S.A.; KUIPERS, A.G.J.; DE JEU, M.; RAMANNA, M.; and JACOBSEN, E. 1997. Physical localisation of repetitive DNA sequences in *Alstroemeria*: Karyotyping of two species with species-specific and ribosomal DNA. *Genome* 40: 652 – 658.
- KIM, J.B.; DE JEU, M.J.; RAEMAKERS, C.J.J.; JACOBSEN, E.; and VISSER, R.G.F. 2002. The effect of hygromycin on regeneration in different *Alstroemeria* explant types after *Agrobacterium*-Mediated transformation. *Acta Horticulturae* 572: 97-103.
- KUIPERS, A.; KAMSTRA, S.; DE JEU, M.; and VISSER, R. 2002. Molecular characterisation and physical localization of highly repetitive DNA sequences from Brazilian *Alstroemeria* species. *Chrom. Res.* 10: 389-398.
- KUIPERS, A.; HESLOP-HARRISON, J.; and JACOBSEN, E. 1998. Characterisation and physical localisation of Ty1-*copia*-like retrotransposons in four *Alstroemeria* species. *Genome* 41: 357-367.
- KUIPERS, A., VAN OS, D.; DE JONG, H.; and RAMANNA, M. 1997. Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental genomes in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin. *Crom. Res.* 5: 31-39.
- LAZO, I.; GINOCCHIO, R.; COFRÉ, H.; VILINA, Y.; and IRIARTE, A. 2008. Nuestra diversidad biológica. Rovira J, J Ugalde & M Stutzin. Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos: 49-55. CONAMA, Ocho Libros Editores, Santiago, Chile.
- LEVIN, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist* 122: 1–25.
- MARTIN, A.; MILLÁN, T.; y FERNÁNDEZ-ESCOBAR, J. 1988. Morphology and cytology of the hybrid and the amphiploid *Hordeum chilense* X *Secale* cereal. *An. Aula Dei* 19: 135-142.
- MIYAKE, I.; MOBARA, S.; and CHIBA, K.. 1989. Breeding spotless *Alstroemeria* in Japan. *Herbertia* 45: 40-44.
- MOREIRA, A. 2011. Plant geography of Chile. In M. J. A. Werger [ed.], *Plant and vegetation series*, vol. 5: 1–45.
- MUÑOZ, M.; MOREIRA, A. 2003. *Alstroemerias* de Chile. Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era, Santiago. 140 pp.
- PALMA, C.; JARA, P.; and VON-BRAND E. 2007. Karyological studies in Chilean species of *Bomarea* and *Leontochir* (*Alstroemeriaceae*), *New Zealand Journal of Botany.* 45: 299-303.

- PEREIRA, C.; HONFI, A.; DEGINANI, N.; and FERRUCCI, M. 2013. Optimización de una técnica para la observación de cromosomas mitóticos de especies de *Passiflora* L. *Steviana*, Vol. 5: 69-75.
- PIRES, J.C.; ZHAO J.W.; SCHRANZ, M.E.; and et al. 2004. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (*Brassicaceae*). *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 675–688.
- POUNDERS, C.; NYOCHEMBENG L.; and BROWN, E. 2003. Breeding alstroemerias for the South. SNA RESEARCH CONFERENCE. Coastal Research and Extension Center, MS State University. 8: 481-524.
- RAMANNA, M.S.; KUIPERS, A.G.J.; and JACOBSEN, E. 2003. Occurrence of numerically unreduced ( $2n$ ) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation. *Euphytica* 133: 95-106.
- RAMANNA, M.S., 1991. Somatic versus meiotic doubling of chromosomes in plants: implications for polyploidy in breeding. In: G. Kimber (Ed.), Proc 2nd Int Symp on Chromosome Engineering in Plants, Univ. Missouri, Columbia, 1990, pp. 118–127.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 589–639.
- RAVENNA, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria*. *Phytologia* 64: 281-288.
- ROUGIER, D. 2005. Evolución de caracteres florales relacionados con el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* L. (*Alstroemeriaceae*) en Chile. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- RUIZ, E.; BALBOA, K.; NEGRITTO, M.; BAEZA, C.; FUENTES, G.; and BRICEÑO, V. 2010. Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (*Alstroemeriaceae*), endémica de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 605-616.
- SANSO, A.; CAMARGO DE ASSIS, M.; and XIFREDA, C. 2005. *Alstroemeria*: A Charming Genus. *Acta Horticulturae* 683: 63-77.
- SANSO, A. 2002. Chromosome studies in Andean taxones of *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: 451-459.
- SANSO, A.; and HUNZIKER, J.H. 1998. Karyological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (*Alstroemeriaceae*). *Hereditas* 129: 67-74.
- SANSO, A. 1996. El género *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*) en Argentina. *Darwiniana* 34: 349-382.



- SHAN, F.; YAN, G.; and PLUMMER, J. 2003. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (*Rutaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 142: 309-320.
- SCHRANZ, M.E.; and OSBORN T.C. 2004. De novo variation in life-history traits and responses to growth conditions of resynthesized polyploid *Brassica napus* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany* 91: 174–183.
- SHARMA, H. 1995. How wide can a wide cross be? *Euphytica* 82: 43–64.
- STEPHENS, J.L.; TSUCHIYA, T.; HUGHES, H. 1993. Chromosome studies in *Alstroemeria pelegrina* L. *International Journal of Plant Sciences* 154: 565-571.
- STEBBINS, G.L. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia Univ. Press, New York.
- SUÁREZ, L.H.; GONZÁLEZ, W.L.; and GIANOLI, E. 2009. Foliar damage modifies floral attractiveness to pollinators in *Alstroemeria exerens*. *Evolutionary Ecology* 23: 545-555.
- SUÁREZ L.; GONZÁLES W.; and GIANOLI E. 2007. Foliar damage modifies floral attractiveness to pollinators in *Alstroemeria exerens*. *Springer Science+Business Media* 23: 4-15.
- TSUCHIYA, T.; and HANG, A.; 1987. Chromosome studies in genus *Alstroemeria*. Department of Agronomy. Colorado State University. *New Floral Crops. Acta Horticulturae*. 205: 281-287.
- VALLADOLID, A.; BLAS, R.; and GONZÁLES, 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.
- VAN DEN HOUWE, H.; ORTIZ, R.; VYLSTEKE, D.; and SWENNEN, R. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica* 83: 117-122.
- VILLE, C.; MARTIN, D.; BERG, L.; SOLOMON, E. 1998. *Biología de Ville*. Mcgraw-Hill Interamericana. 4a Edición. 1305 pp.
- WAGSTAFF, C.; ROGERS, H.J.; LEVERENTZ, M.K.; GRIFFITHS, G.; THOMAS, B.; CHANASUT, U.; and STEAD, A.D. 2001. Characterisation of alstroemeria Flower Vase Life. *Acta Horticulturae* 543: 161-175.
- ZHOU, S.; DE JEU, M.; VISSER, R.; and KUIPERS, A. 2003. Characterisation of distant *Alstroemeria* hybrids: application of highly repetitive DNA sequences from *A. ligtu* subsp. *ligtu*. *Ann. Appl. Biol.* 142: 277-283.

## ESTUDIO CROMOSÓMICO EN ESPECIES SILVESTRES Y VARIEDADES COMERCIALES DE ALSTROEMERIAS

### RESUMEN

Las especies silvestres de alstroemeria se encuentran mayoritariamente distribuidas en Chile y Brasil siendo principalmente diploides ( $2n=2x=16$ ). En esta tesis se realizó el estudio del conteo de cromosomas y cariotipado en tres especies silvestres: *Alstroemeria spathulatta*, *pelegrina* y *psittacina*, y dos variedades: Sweet Laura y Snow White; para determinar diferencias en su cariotipo. Producto que en alstroemeria los estudios citológicos se basan en protocolos generalizados, se buscó optimizar una metodología de obtención de cromosomas a partir de puntos meristemáticos. Se analizaron raicillas y brotes de plantas en invernadero. Se usaron dos inhibidores mitóticos: 8-HQ (2mM) y colchicina 0,05%, en hidrólisis ácida dos concentraciones de HCl, y diversos tiempos de inmersión en agua destilada para provocar la hipotonía. Se analizó la época de recolección y la procedencia del meristema a estudiar. Los mejores resultados para la obtención de placas metafásicas se obtuvieron con colchicina al 0,05%, HCl a 1N y; al menos tres días de remojo en agua destilada. Las variedades comerciales Sweet Laura y Snow White presentaron 16 y 24 cromosomas respectivamente, en tanto entre las especies silvestres, *Alstroemeria spathulatta* y *pelegrina* mostraron 16 cromosomas, mientras que *psittacina* 18. No se observó poliploidización, sin embargo variabilidad cariotípica entre las especies analizadas.

Palabras Claves: *Bomarea*, cariotipo, ploidía, protocolo, meristema.

## CHROMOSOMIC STUDY OF WILD SPECIES AND COMMERCIAL VARIETIES OF ALSTROEMERIAS

### ABSTRACT

Wild species of alstroemerias are distributed mostly in Chile and Brazil, mainly being diploids ( $2n=2x=16$ ). In this study chromosome counting and karyotyping was performed in three wild species: *Alstroemeria spathulatta*, *pelegrina* and *psittacina*, and two varieties: Sweet Laura and Snow White, to determine differences in ploidy and/or in its karyotype. Due to cytology alstroemeria studies are based on generalized protocols, sought to optimize a methodology for obtaining chromosomes from meristematic points. Rootlets and shoots of greenhouse plants were analyzed. Two mitotic inhibitors were used, 8-HQ (2 mM ) and colchicine 0.05%, acid hydrolysis in two concentrations of HCl, and various immersion times in distilled water were tested to cause hypotonia. The harvest season and the origin of the meristems was considered in the study. The best results were obtained with 0.05% colchicine and 1N HCl, and at least three days soaking in distilled water. The commercial varieties Sweet Laura and Snow White showed 16 and 24 chromosomes respectively, meanwhile among the wild species, *Alstroemeria spathulatta* and *pelegrina* showed 16 chromosomes, and *A. psittacina* 18. No polyploidization was observed, however there was karyotypic variability among species.

KEYWORD: *Bomarea*, karyotype, ploidy, protocol, meristem.

## INTRODUCCIÓN

Alstroemeria, "lirio del Perú" o "lirio de los Incas", es un género de Sudamérica con alrededor de 120 especies distribuidas desde Venezuela hasta Chile y Argentina, siendo Chile y Brasil los principales centros de biodiversidad (Muñoz y Moreira, 2003). Es uno de los géneros más diversificados y numerosos de la flora vascular chilena, lo que se traduce en una amplia variabilidad morfológica y florística (Muñoz y Moreira, 2003). Es por ello, que las especies de alstroemeria han adquirido relevancia mundial como plantas ornamentales de corte y de maceta, dado a la amplia variedad de colores y larga vida de postcosecha de sus flores; lo llamativo del perigonio y su resistencia al frío (Bridgen *et al.*, 2009); lo que ha despertado gran interés en la variabilidad morfológica de las flores y la variabilidad genética en especies con potencial valor económico (Ruiz *et al.*, 2010). El estudio citológico es fundamental, además, para la obtención de nuevos genotipos con valor económico (Cajas *et al.*, 2009), permitiendo evaluar compatibilidad gamética que podrían presentar las especies silvestres y las variedades comerciales, en función de sus diferencias cromosómicas (Bridgen *et al.*, 2009).

Los cromosomas de las especies silvestres de alstroemeria son diploides ( $2n = 16$ ) (De Jeu *et al.*, 1997; Kamstra *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1997; Buitendijk *et al.*, 1998). No obstante, varias especies de *Alstroemeria* se han formado a partir de complejos de diversas subespecies o variedades que podrían tener un número distinto de cromosomas (Ruiz *et al.*, 2010).

El conteo de cromosomas permite establecer el nivel de ploidía preciso de una especie (Baeza *et al.*, 2007), en donde un estudio cariotípico permite ordenar los cromosomas por su forma y tamaño y ayuda a conocer posibles variaciones entre especies relacionadas permitiendo la evaluación de la biodiversidad y por lo tanto, se utiliza como una herramienta más para dilucidar las relaciones entre especies y comprender la estructura y dinámica actual de la vegetación (Arroyo *et al.*, 1993). El número de cromosomas  $2n$  de una especie corresponde a la moda de los números de cromosomas contados al analizar distintas placas metafásicas de uno o varios individuos representativos de la especie o cepa (Spotorno, 1991).

La caracterización cromosómica realizada en especies de alstroemerias se ha basado principalmente en el análisis de cromosomas metafásicos, como se observa en los trabajos de Baeza *et al.* (2006, 2007 y 2008). Dado que los estudios citológicos en la mayoría de las plantas se basan en la aplicación de protocolos generalizados y dependiendo sobre qué tipo de tejido meristemático se utilizará en el estudio, se toman decisiones respecto del método más adecuado para visualizar los cromosomas (Pereira *et al.*, 2013). En *Alstroemeria*, autores usaron raicillas de plantas como lo indica Baeza *et al.*, (2006, 2007 y 2008) o raicillas de semillas germinadas (Jara *et al.*, 2004), no obstante, no hay estudios sobre otro tipo de tejido, brotes por ejemplo. La metodología ha planteado numerosas dificultades tanto para el establecimiento de los números cromosómicos como para la confección de los cariotipos. La escasa respuesta que generalmente se obtiene al evaluar los protocolos

depende principalmente del tipo de agente mitogénico (inhibidores mitóticos) que se utiliza para despolimerizar los microtúbulos (Rodríguez y Seijo, 2001). Otro inconveniente es lograr la degradación de la pared celular, la unión de las pectinas celulares, que la muestra tenga una sola capa celular (Valladolid *et al.*, 2004) y que el nivel hipotónico celular sea el adecuado para que los cromosomas se visualicen separadamente (Lacadena, 1996).

Por lo anterior, es importante realizar estudios cariológicos que nos permita determinar cambios entre especies del género *Alstroemeria*. Además, las especies chilenas que presenten potencial ornamental y comercial cuyo cariotipo aún no esté estudiado y, que al determinarlo se contribuye a su protección, ya que la falta de información biológica nacional en estas especies como parte valiosa del patrimonio natural, deriva en pérdidas de oportunidades para la participación en nuevos negocios. Además, es necesario realizar el ajuste de un protocolo para visualización de placas metafásicas que facilite futuros estudios citológicos en plantas de esta especie.

## **HIPÓTESIS**

Existe variabilidad cromosómica entre individuos silvestres y variedades comerciales de alstroemerias.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estudiar el cariotipo en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemerias, para determinar si existen diferencias en la ploidía y/o en su cariotipo.

### **Objetivos Específicos**

- Optimizar un protocolo de obtención de cromosomas metafásicos a partir de tejidos meristemáticos de *Alstroemeria*.
- Determinación del número cromosómico en tres especies silvestres y dos variedades comerciales de alstroemerias.
- Estudiar y comparar el cariotipo en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemerias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se utilizaron tres accesiones de alstroemerias silvestres del banco de alstroemerias de la Universidad de Chile. *A. psittacina*, originaria del sureste de Brasil, *A. pelegrina* y *A. spathulata*, originarias de Chile y colectadas desde Los Vilos (Provincia de Choapa de la Región de Coquimbo) y Farellones (Provincia de Santiago, región Metropolitana) respectivamente. También se utilizaron dos accesiones de alstroemerias comerciales mantenidas bajo condiciones de invernadero, Sweet Laura y Snow White (Cuadro 1).

Cuadro 1. Raicillas o brotes obtenidos de plantas de *Alstroemeria* de invernaderos.

<b>Genotipos</b>	<b>Invernaderos</b>	<b>Origen</b>
<i>A. spathulata</i>	Fac. Cs Agronómicas Univ. de Chile	Especie silvestre chilena: Rizomas colectados desde Farellones S 33'20.804. W.070'18.207. Diploide 2n=16 (Baeza <i>et al.</i> , 2007).
<i>A. pelegrina</i>	Fac. Cs Agronómicas Univ. de Chile	Especie silvestre chilena: Semillas colectadas desde los Vilos S 31°53.088' W.071°30. 193'. Diploide 2n=16. (Baeza <i>et al.</i> , 2007).
<i>A. psittacina</i>	Fac. Cs Agronómicas Univ. de Chile	Especie silvestre brasileña: Diploide 2n=16. (Hunziker 1998).
*A. var. Sweet Laura	Fac. Agronomía Pontificia Univ. Católica	Variedad: Parentales: <i>A. Aurea</i> , usada como hembra. <i>A. caryophyllaea</i> , usada como macho.
	Fac. Cs Agronómicas Univ. de Chile	Diploide 2n=16 (Bridgen <i>et al.</i> , 1997).
A. var. Snow White	Fac. Cs Agronómicas Univ. de Chile	Variedad: Parentales y ploidía desconocidas

\* Se obtuvieron 3 plantas desde la Pontificia Universidad Católica y 2 desde la Universidad de Chile.





Figura 1. Flores de alstroemeria. Fig 1.1 *A. spathulata*, 1.2 *A. pelegrina.*, 1.3 *A. psittacina*, 1.4 *A.* var. Sweet Laura y 1.5 *A.* var. Snow White.

## Metodología

Este es un estudio descriptivo, el que no tiene un diseño experimental clásico. Se analizaron meristemas de 5 individuos de cada especie silvestre y variedad comercial para confirmar sus respectivas cantidades de cromosomas. Considerándose de esta manera 5 repeticiones y siendo cada individuo la unidad experimental.

Al comienzo se usaron, plantas de *Alstroemeria psittacina* hasta optimizar el protocolo para la visualización de cromosomas.

### Optimización de protocolo de cromosomas metafásicos

Se colectaron puntas de raicillas y brote de 1-2 cm de longitud. Las raicillas se colectaron durante los años 2012 a 2014. Los brotes se colectaron durante la primavera del 2014. Las muestras se obtuvieron entre las 10:00 y 12:00 h para asegurar una mayor actividad mitótica (Pereira *et al.*, 2013).

La temperatura ambiental usada en las distintas condiciones experimentales osciló entre 15 y 22°C, de acuerdo a las estaciones del año.

Para la obtención de placas mitóticas las raíces y brotes se sometieron a diversas condiciones experimentales en el protocolo. Se utilizaron dos tipos de inhibidores mitóticos, con dos temperaturas y cinco tiempos de inmersión, como se detalla en Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones utilizadas para lograr la visualización de cromosomas metafásicos.

Inhibidores mitóticos	Temperaturas (°C)	Tiempos (horas)
8-hidroxiquinolina (2mM) (Baeza <i>et al.</i> , 2007)	4°C	6, 7, 12, 14, 16 y 18
	15°C a 22°C (ambiente)	
Colchicina 0,05% (Jara <i>et al.</i> , 2004).	4°C	6, 7, 12, 14, 16 y 18
	15°C a 22°C (ambiente)	

Posteriormente, este material fue fijado en etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas (Baeza *et al.*, 2008) a 4°C.

Luego, se realizó una hidrólisis ácida con HCl para eliminar la pared celular con 2 tipos de concentraciones, a 5 temperaturas y 6 tiempos distintos que se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de temperaturas y tiempos utilizados para la hidrólisis ácida.

<b>Hidrólisis ácida (concentración)</b>	<b>Temperaturas (°C)</b>	<b>Tiempos (minutos)</b>
HCl 0,5N (Baeza <i>et al.</i> , 2007)	42, 45, 47, 50, 55	20, 25, 30, 35, 40 y 45
HCl 1N	42, 45, 47, 50, 55	20, 25, 30, 35, 40 y 45

Para eliminar los restos del ácido, se realizaron tres enjuagues en agua destilada, de acuerdo a Baeza *et al.*, (2007).

Posteriormente, se evaluaron cinco tiempos de remojo en agua destilada 0, 3, 5, 8 y 14 días, a temperatura ambiente para favorecer hipotonía celular y la separación de los cromosomas.

Las raicillas o brotes ya tratados previamente, se colocaron en un portaobjeto en donde se premaceraron con una aguja y luego se tiñeron con dos gotas de orceína acética al 1%. Posteriormente se colocó, sobre él, un cubreobjeto el que se dejó reposando 20 minutos y luego se procedió al aplastado del tejido meristemático. Los bordes del cubre objeto son sellados con esmalte de uñas incoloro para evitar la oxigenación de la muestra y prolongar su humectación en el tiempo.

### **Determinación del número cromosómico en tres especies silvestres y dos variedades comerciales de alstroemeria**

Obtenidos los cromosomas se procedió a la revisión y búsqueda de placas metafásicas en un microscopio de campo claro (ZEISS modelo ZEN 2011). Posteriormente las mejores placas metafásicas y de morfología cromosómica nítida fueron fotografiadas con cámara digital axiovisión SE64 Rel 4.8.3-drivers incluida en el microscopio ZEISS modelo ZEN 2011 PrimoStar. Posteriormente, obtenidas las imágenes, se procedió a contar los cromosomas.

### **Estudio y comparación del cariotipo de especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria**

Para la clasificación de la morfología cromosómica y la confección del cariotipo, se procedió a medir los brazos cromosómicos en las mejores placas metafásicas obtenidas de los cinco individuos (5 plantas de cada especie o variedad). Posteriormente se estimó el índice centromérico (*IC*) según Levan (1964), para lo cual se utilizó el programa MicroMeasure versión 3.3 (Reeves and Tear, 2000).

$$IC = \frac{p (\%)}{p + q}$$

En esta fórmula, *p* equivale a la longitud del brazo largo y *q* equivale a la longitud del brazo corto de cada cromosoma. Sobre la base de este índice, se clasificaron los cromosomas en

metacéntricos, sub-metacéntricos, sub-telocéntricos y telocéntricos, tal como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Clasificación cromosómica según el índice centromérico. (Levan *et al.*, 1964).

<b>Nomenclatura</b>	<b>Descripción de Morfología</b>	<b>Índice Centromérico</b>
M	Metacéntrico	50
m	metacéntrico	49,9 - 37,5
sm	submetacéntrico	37,4 – 25,0
st	subtelocéntrico	24,9 – 12,5
t	telocéntrico	12,4 – 0,5
T	Telocéntrico	0,0

## RESULTADOS

### Optimización de protocolo de cromosomas metafásicos

A continuación se presentan los cuadros 5, 6 y 7 que muestran los resultados obtenidos con las condiciones de los inhibidores mitóticos, hidrólisis ácida y tiempos de remojo o hipotonía, respectivamente. Estas distintas condiciones se utilizaron de igual forma, tanto para brotes como para raicillas.

Cuadro 5. Condiciones analizadas con inhibidores mitóticos.

Temperatura	Inhibidores Mitóticos (Horas)											
	8-hidroxiquinolina (8-HQ) 2mM						Colchicina 0,05%					
	6	7	12	14	16	18	6	7	12	14	16	18
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*Ambiental	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

(+) Resultados positivos (visualización de cromosomas). (-) Resultados negativos (sin visualización de cromosomas). \* Temperatura ambiental varió entre 15 a 22°C.

Cuadro 6. Condiciones analizadas en la hidrólisis ácida.

Tiempo de cocción en minutos	Ácido clorhídrico (HCl) (Temperatura en °C)									
	HCl a 0,5N					HCl a 1N				
	42	45	47	50	55	42	45	47	50	55
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B
30	-	R	-	-	-	-	-	-	-	B
35	-	R	R	R	-	-	-	-	-	-
40	-	R	R	R	-	-	-	-	R	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-

(R o B) Condición que logró eliminar la pared celular en R=raicilla o B=brote; y (-) condición negativo: con pared celular.

Cuadro 7.- Condiciones de tiempos de remojo en agua destilada del material vegetal.

Remojo en agua destilada (días)									
Raicillas					Brotos				
0	3	5	8	14	0	3	5	8	14
-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

(+) Visualización de cromosomas separados. (-) Visualización de cromosomas aglomerados. Estos remojos fueron a temperatura ambiental (15 a 22°C).

Inicialmente se utilizó *Alstroemeria psittacina* como planta modelo, en la Figura 2 se muestran imágenes de placas metafásicas obtenidas de *A. psittacina* tanto en raicillas, como en brote.

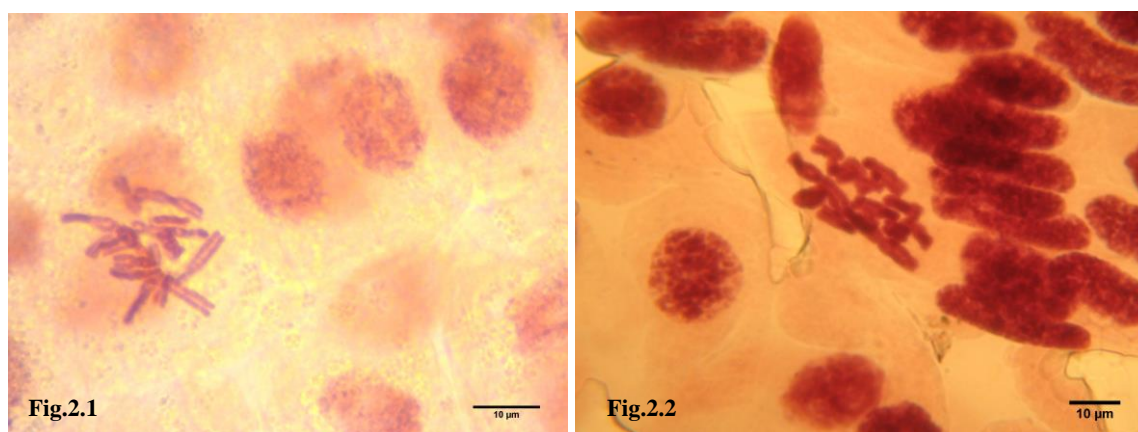


Figura 2. Placas metafásicas de *Alstroemeria psittacina*. 2.1. Raicillas. Colchicina a 0,05% por 14 horas. Fijación mitótica en etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas a 4°C. HCl 1N a 45°C por 40 minutos, tres enjuagues y 3 días de remojo en agua destilada. Material colectado el 12 de junio de 2014. Fig. 2.2. Brotos. Colchicina a 0,05% por 14 horas. Fijación mitótica en etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas a 4°C. HCl 1N a 55°C por 30 minutos, tres enjuagues y 3 días de remojo en agua destilada. Colección el 7 de octubre de 2014.

En el Cuadro 8 se detallan las condiciones con las que se logró ver cromosomas para todas las especies silvestres y variedades estudiadas. Para los casos de *A. pelegrina*, no hubo resultados en raicillas y en *A. spathulata*, no hubo resultados en brotes. Todo lo anterior, complementado con las figuras 4, 5, 6, 7 y 8.

Cuadro 8.- Resumen de los mejores protocolos obtenidos para visualizar placas metafásica en especies silvestres y variedades de *Alstroemeria*.

Genotipo	Tejido	Colección	Tiempo en horas en Colchicina 0,05% a T° amb.	HCl (Temperatura *Tiempo)		Tiempo en agua destilada a T° amb.
				0,5N	1N	
<i>A. spathulata</i>	Brote	NO				
	Raicilla	12.06.2014	12	45°C* 35 min.		3
<i>A. pelegrina</i>	Brote	07.10.2014	16		55°C*25 min.	5
	Raicilla	NO				
<i>A. psittacina</i>	Brote	07.10.2014	14		55°C*25 min.	3
	Raicilla	12.06.2014	14	45°C* 30 min.		5
A. var. Sweet Laura	Brote	07.10.2014	14		55°C*25min	8
	Raicilla	26.08.2014	16		50°C*45 min.	14
A. var. Snow White	Brote	07.10.2014	16		55°C*25 min.	8
	Raicilla	29.07.2014	16		50°C*45 min.	14

\*Desde los 15 a 22°C osciló la temperatura ambiental.

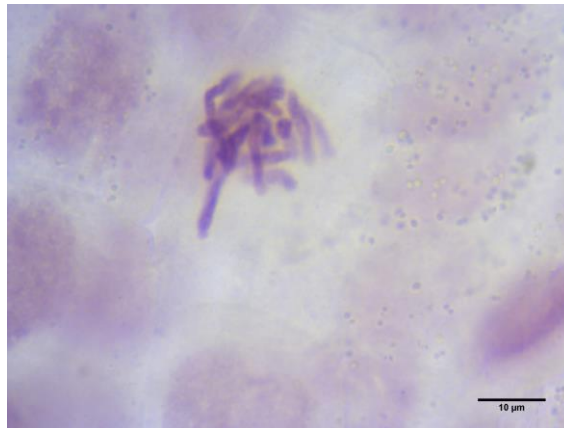


Figura 3. Placa metafásica de *Alstroemeria* variedad Sweet Laura. Corresponde a cromosomas obtenidos a partir de raicillas, colección el 26 de agosto de 2014. Colchicina a 0,05% por 16 horas. HCl 1N a 50°C por 45 minutos y 14 días de remojo en agua destilada.



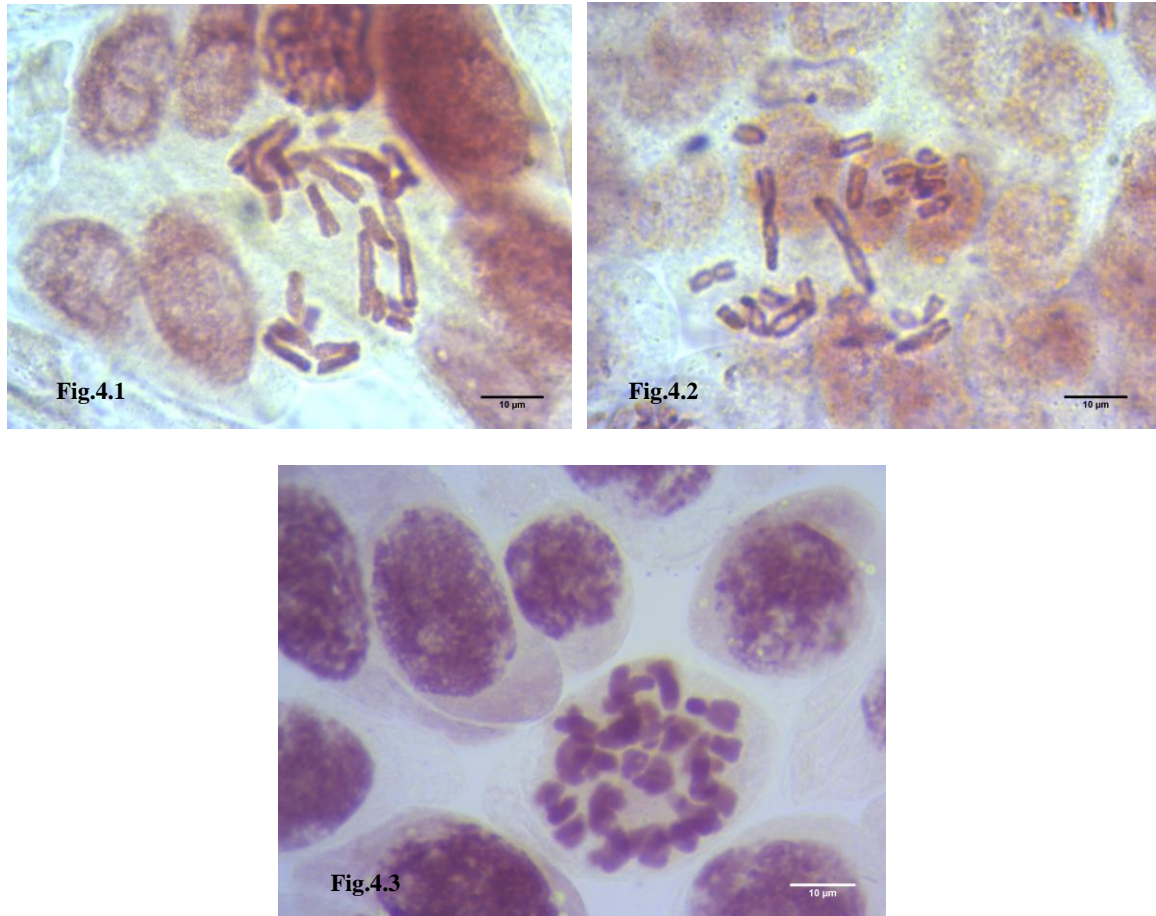


Figura 4. Placa metafásica de *Alstroemeria* variedad Snow White. Fig. 4.1 y 4.2, corresponden a cromosomas obtenidos a partir de raicillas, colección el 29 de julio de 2014. Colchicina a 0,05% por 16 horas. HCl 1N a 50°C por 45 minutos y 14 días de remojo en agua destilada. La fig. 4.3, corresponde a cromosomas obtenidos a partir de brotes colectados el 7 de octubre de 2014. Colchicina a 0,05% por 16 horas. HCl 1N a 55°C por 25 minutos y 8 días de remojo en agua destilada



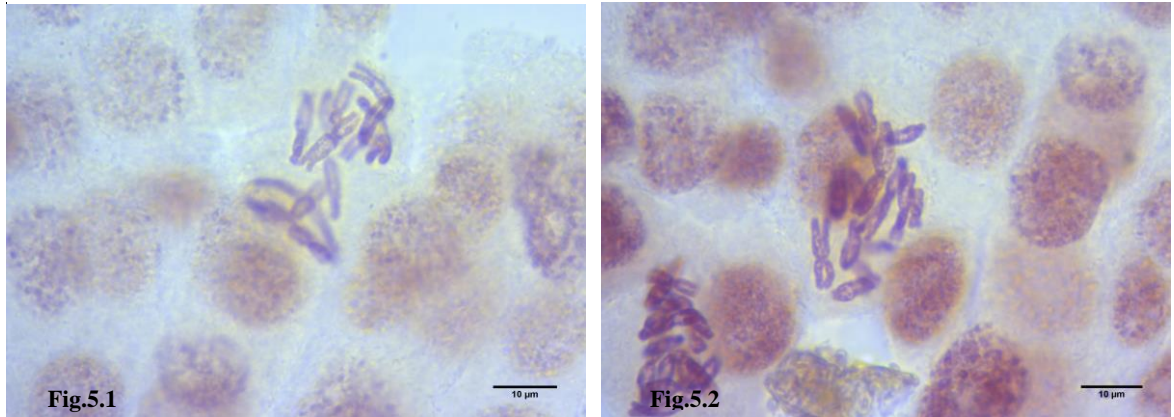


Figura 5. Placa metafásica de *Alstroemeria spathulata*. Figuras 5.1 y 5.2 corresponden a cromosomas obtenidos a partir de raicillas, colección el 12 de junio de 2014. Colchicina a 0,05% por 12 horas. HCl 0,5N a 45°C por 35 minutos y 3 días de remojo en agua destilada.

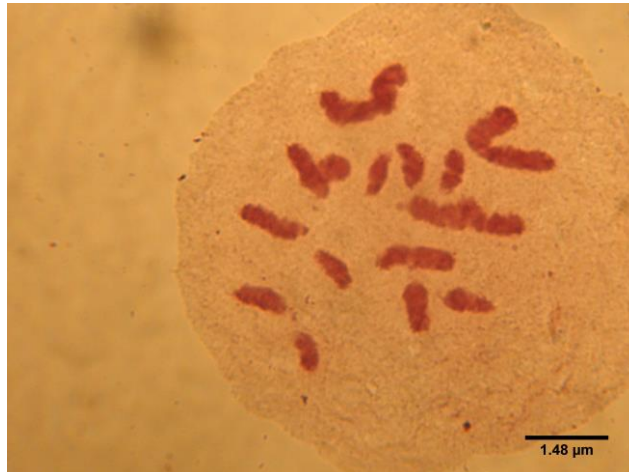


Figura 6. Placa metafásica de *Alstroemeria pelegrina*. Cromosomas obtenidos a partir de brotes, colección el 7 de octubre de 2014. Colchicina a 0,05% por 16 horas. HCl 1N a 55°C por 25 minutos y 5 días de remojo en agua destilada.

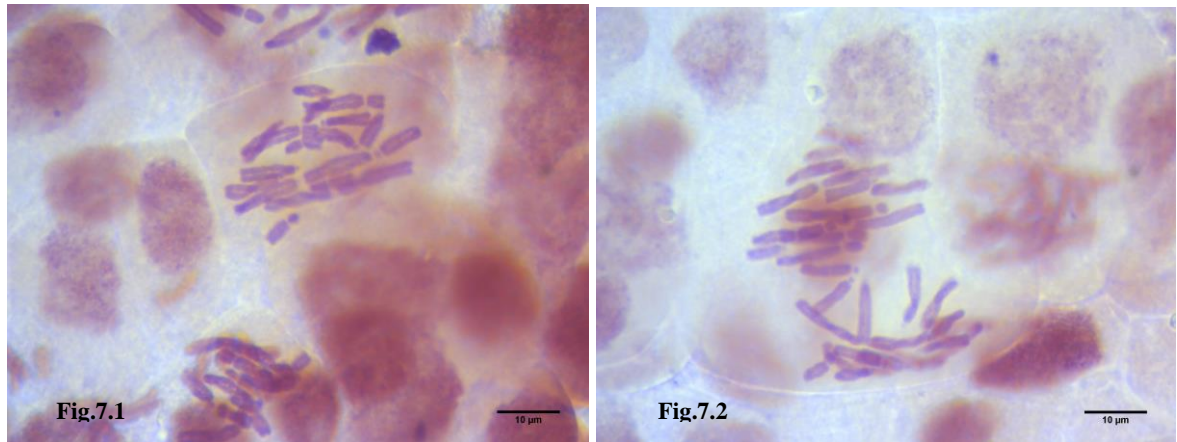


Figura 7. Placa metafásica de *Alstroemeria psittacina*. Figuras 7.1 y 7.2 corresponden a cromosomas obtenidos a partir de raicillas, colección el 12 de junio de 2014. Colchicina a 0,05% por 14 horas. HCl 0,5N a 45°C por 30 minutos y 5 días de remojo en agua destilada.

Se observó, según Cuadro 8, que durante la época de invierno, la raicilla fue más idónea como tejido con actividad mitótica, en cambio el brote fue mejor candidato en primavera.

La colchicina a una concentración de 0,05% fue el inhibidor mitótico que permitió visualizar cromosomas en los pretratamientos, siempre que estuviera a temperatura ambiente (15 a 22°C). No obstante, a mayor temperatura ambiental los cromosomas se mostraron aglomerados y bastante acortados.

Por otro lado, la hidrólisis ácida con HCl a una concentración de 1N fue la fórmula que permitió eliminar la pared celular de los meristemas. En cuanto a la cocción, tanto la raicilla como el brote requirieron similares temperaturas, la diferencia estuvo en el tiempo. La raicilla presentaba ausencia de pared celular a los 45 minutos, en cambio el brote a los 25 minutos.

Finalmente, el grado de hipotonía celular se logró a los 14 días de remojo en agua destilada con temperaturas ambientales cercanas a 15°C, resultando este proceso más rápido a temperaturas cercana a los 22°C (de 3 a 8 días).

Por lo tanto, en base a todos los ensayos realizados, se deduce que el protocolo con el que es posible ver cromosomas en todas las especies es el siguiente:

1. Utilizar ápices de raíces o brotes de 1-2 cm de longitud, obtenidos a partir de plantas cultivadas en maceta. Colectar los brotes en primavera y las raicillas en otoño-invierno.
2. En el pretratamiento, inhibir la mitosis con colchicina al 0,05% desde 7 a 16 hrs a temperatura ambiente (15° a 22°C). Si la temperatura ambiental es alta (cercana a 20°C), reducir el tiempo del meristemo en el reactivo a 7 horas, para evitar la sobre condensación y sobre posición de los cromosomas. Si la temperatura es baja (cercanas a 15°C) mantener el meristemo en el reactivo de 12 a 16 horas.

3. Realizar fijación en etanol / ácido acético (3:1) por al menos 24 horas a 4°C. Lo anterior ayuda a inhibir toda actividad vital del material vegetal.
4. Para eliminar la pared celular, realizar una hidrólisis ácida con HCl 1N durante 40 a 45 min desde a 50°C en raicillas, y durante 25 a 30 minutos a 55°C en brotes.
5. Lavar el material con agua destilada tres veces para eliminar el exceso de HCl. Con el fin de que la muestra logre hipotonía dejar remojando en agua destilada de 3 a 14 días en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (15 a 22°C). A altas temperaturas (alrededor de los 20°C), se requieren menos días de remojo (3 a 5). A bajas temperaturas, más días.
6. Premacerado, con aguja. Esto implica deslizar una aguja sobre el brote o la caliptra y a lo largo de la raicilla o brote, a modo de hacer más fácil la obtención de una sola capa celular en el aplastado.
7. Finalmente, para la tinción realizar el aplastado de la punta de la raíz o brote foliar en una gota de orceína acética al 1%, dejar reposar unos 20 minutos, para luego poner el cubre objeto y realizar el aplastado enérgicamente. Sellar los bordes con esmalte de uña, para mantener hidratada la muestra por más tiempo.

#### **Determinación del número cromosómico en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria**

De los 5 individuos de la variedad Sweet Laura analizados, se obtuvo placas metafásicas sólo en 2. El conteo de cromosomas por placa metafásica revela un número modal de 16 cromosomas presentes en un 70% de las placas analizadas, como se observa en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Número de placas metafásicas de *Alstroemeria* var. Sweet Laura de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal.

<b>Rango Cromosomal</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>Total</b>
Individuo 1	0	1	1	4	6
Individuo 2	0	0	1	3	4
Total	0	1	2	7	10

De los 5 individuos de la variedad Snow White analizados, se obtuvo placas metafásicas sólo en 3. El conteo de cromosomas por placa metafásica presenta un número modal de 24 cromosomas en un 75% de las placas analizadas, como se presenta en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Número de placas metafásicas de *Alstroemeria* var. Snow White de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal.

<b>Rango Cromosomal</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>Total</b>
Individuo 1	0	0	1	2	3
Individuo 2	0	0	1	2	3
Individuo 3	0	0	0	2	2
Total	0	0	2	6	8

De los 5 individuos para *Alstroemeria spathulata* analizados, se obtuvo placas metafásicas sólo en 3. El conteo de cromosomas por placa metafásica presenta un número modal de 16 cromosomas en un 66,67% de las placas analizadas, como se presenta en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Número de placas metafásicas de *Alstroemeria spathulata* de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal.

<b>Rango Cromosomal</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>Total</b>
Individuo 1	0	1	0	3	4
Individuo 2	0	0	0	1	1
Individuo 3	0	0	1	0	1
Total	0	1	1	4	6

De los 5 individuos para *Alstroemeria pelegrina* analizados, se obtuvo placas metafásicas sólo en 2. El conteo de cromosomas por placa metafásica presenta un número modal de 16 cromosomas en un 77,78% de las placas analizadas, como se presenta en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Número de placas metafásicas de *Alstroemeria pelegrina* de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal.

<b>Rango Cromosomal</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>Total</b>
Individuo 1	0	0	1	3	4
Individuo 2	0	0	1	4	5
Total	0	0	2	7	9

El conteo de cromosomas por placa metafásica de *Alstroemeria psittacina* (Cuadro 13) revela un número modal de 18 cromosomas presente en un 83,3% del total de placas analizadas.

Cuadro 13. Número de placas metafásicas de *Alstroemeria psittacina* de cada individuo evaluado en cada rango cromosomal.

<b>Rango Cromosomal</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>Total</b>
Individuo 1	0	0	2	5	7
Individuo 2	0	0	2	6	8
Individuo 3	0	0	0	4	4
Individuo 4	0	0	0	2	2
Individuo 5	0	0	0	3	3
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>24</b>

## Estudio y comparación del cariotipo en especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria

### Montaje de cariotipo

De las dos variedades y tres especies silvestres estudiadas, se ordenó su cariotipo de acuerdo al largo de sus cromosomas, excepto en la variedad Sweet Laura que no presentó placas metafásicas lo suficientemente claras como para establecer su cariotipo.

La variedad Snow White presentó un número diploide de 24 cromosomas ( $2n=2x=24$ ). Cuya fórmula cromosómica es la siguiente:  $10m + 4sm + 4st + 2st-t + 4t$ . En la Figura 8 se muestra el cariotipo ordenado de esta variedad.

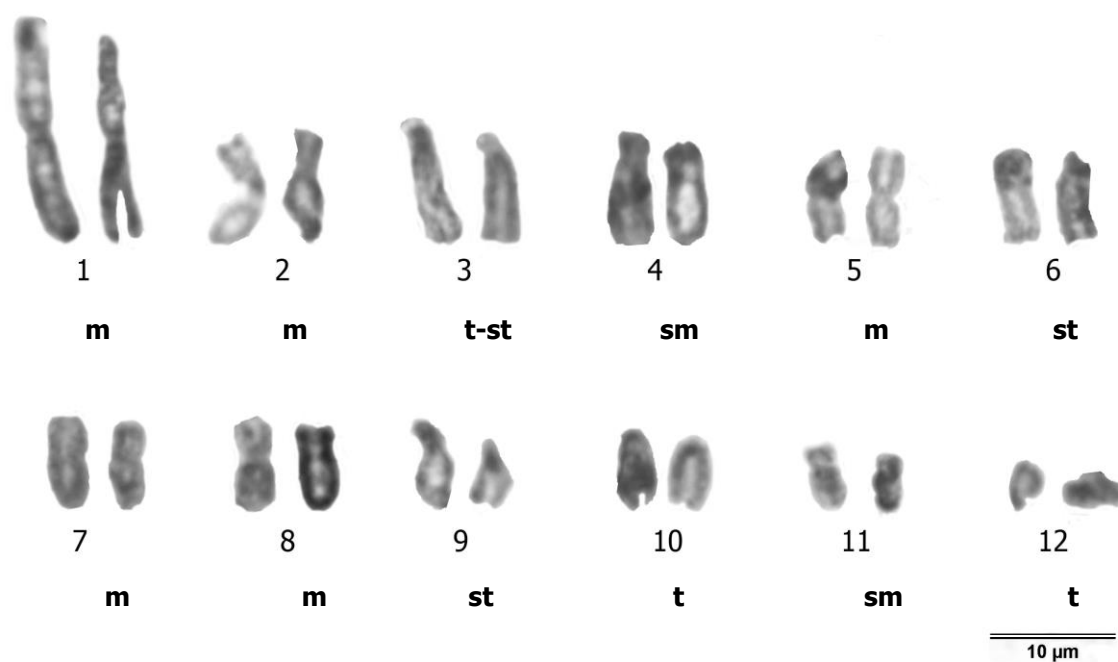


Figura 8. Cariotipo de *Alstroemeria* var. Snow White. M=metacéntrico, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, st=subtelocéntrico, t=telocéntrico, T=telocéntrico.

En el caso de *Alstroemeria spathulata*, sus análisis cariotípicos demostraron que esta especie tiene un número diploide de  $2n=2x=16$  cromosomas. La fórmula de su composición cariotípica es la siguiente:  $6m + 2m-sm + 4sm + 2st-t + 2t$  (Figura 9).

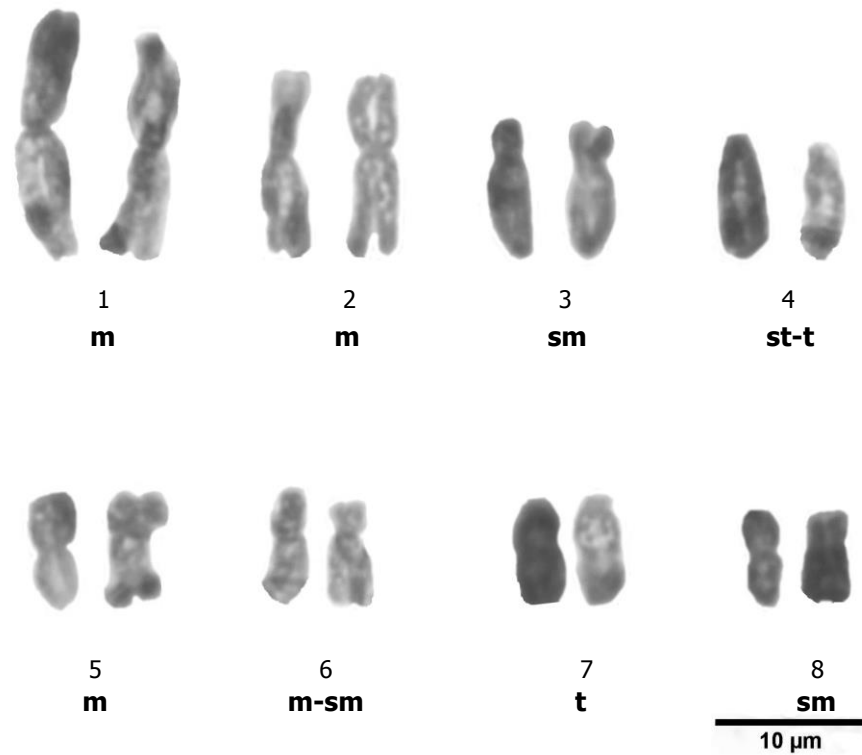


Figura 9. Cariotipo de *Alstroemeria spathulata*. M=metacéntrico, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, st=subtelocéntrico, t=telocéntrico, T=telocéntrico.

El análisis cariotípico de *Alstroemeria pelegrina* mostró que esta especie posee un número diploide de  $2n=2x=16$  cromosomas, cuya composición cariotípica es la siguiente:  $10m + 2sm + 2st + 2t$  (Figura 10).

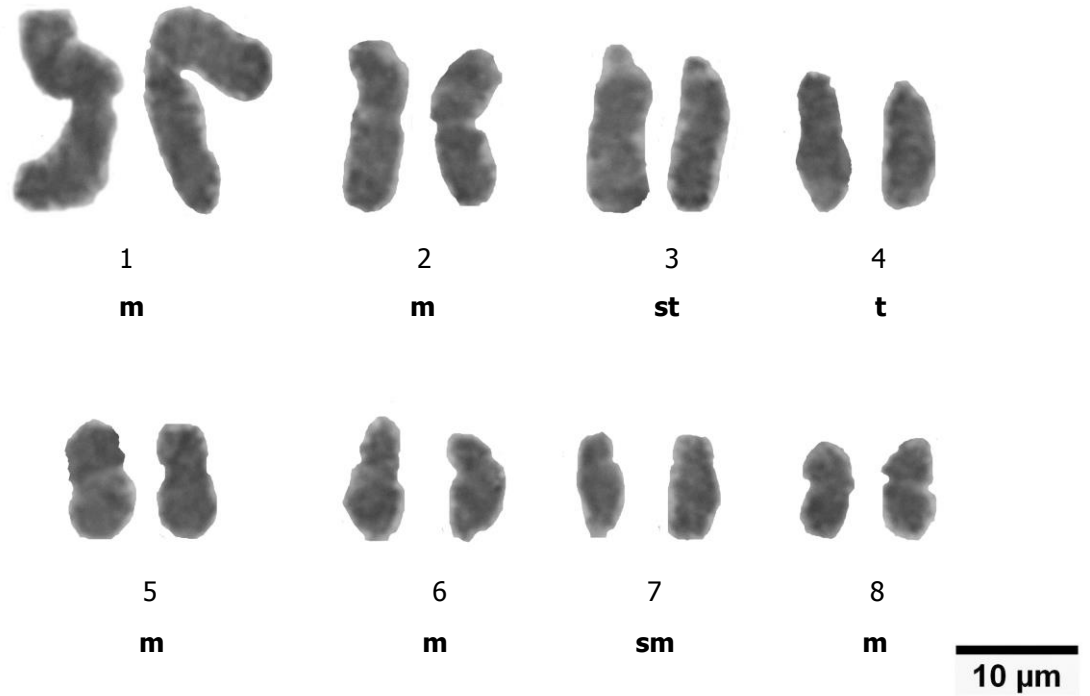


Figura 10. Cariotipo de *Alstroemeria pelegrina*.

M=metacéntrico, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, st=subtelocéntrico, t=telocéntrico, T=telocéntrico.



Al estudiar el cariotipo de *Alstroemeria psittacina*, sus análisis demostraron que es número diploide de  $2n=2x=18$  cromosomas. La fórmula cariotípica es la siguiente:  $2m+ 2m-sm+ 2sm+ 6st+ 2st-t+ 4T$  (Figura 11).

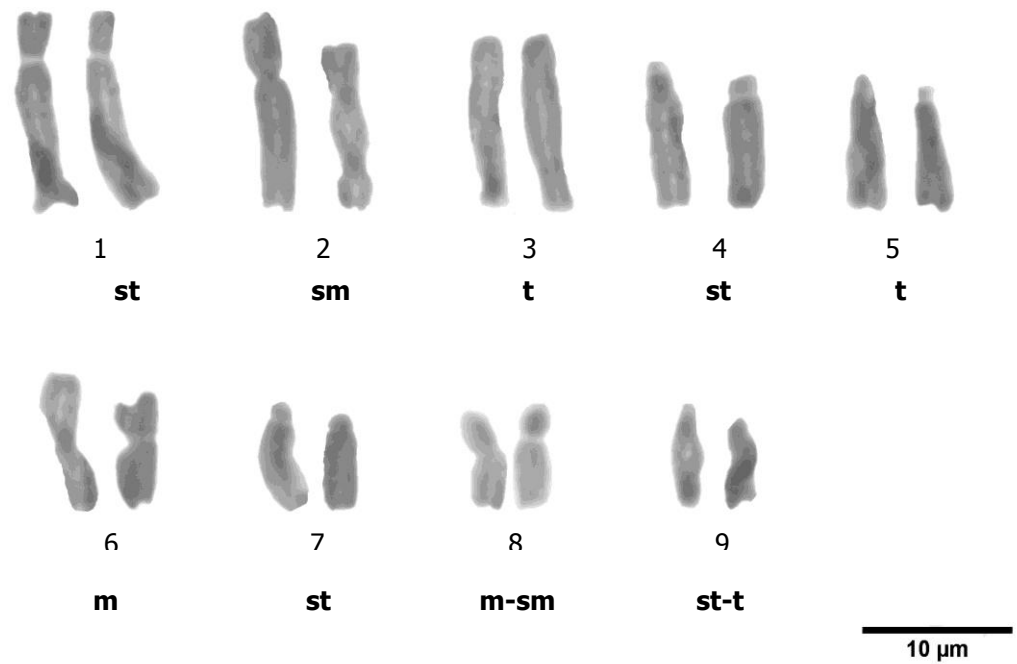


Figura 11. Cariotipo de *Alstroemeria psittacina*. M=metacéntrico, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, st=subtelocéntrico, t=telocéntrico, T=telocéntrico.

Considerando que cada especie y variedad tienen un cariotipo en particular; al comparar los cariotipos entre los distintos genotipos, tal como aparece en el Cuadro 14 tenemos que la variedad Snow White respecto a la comparación de su cariotipo:

Con *A. spathulata*; son iguales en dos pares submetacéntricos (sm) y en un par subtelo-céntrico-telo-céntrico (st-t). Con *A. pelegrina*; son iguales en cinco pares metacéntricos (m). Con *A. psittacina*; son iguales en el par subtelo-céntrico-telo-céntrico (st-t) y en dos pares telocéntricos (t).

Respecto a la comparación del cariotipo de *A. spathulata*, tenemos que:

Con *A. pelegrina*; son iguales en un par telocéntrico (t). Con *A. psittacina*; son iguales en un par metacéntrico-submetacéntrico (m-sm).

Respecto a la comparación del cariotipo de *A. pelegrina*, tenemos que:

Con *A. psittacina*; son iguales en un par submetacéntrico (sm).

Cuadro 14.- Comparación cariotípica de las variedades y especies silvestres.

Genotipo	N° básico (n)	Nivel de Ploidía	Formula Cariotípica			
A. var. Snow White	n=12	2n=2x= 24	10m	+ 4sm + 4st+ 2st-t + 4t		
<i>A. spathulata</i>	n=8	2n=2x= 16	6m +	2m-sm + 4sm	+ 2st-t + 2t	
<i>A. pelegrina</i>	n=8	2n=2x= 16	10m	+ 2sm + 2st		+ 2t
<i>A. psittacina</i>	n=9	2n=2x= 18	2m +	2m-sm + 2sm+	6st +2st-t + 4t	

## DISCUSIÓN

### Optimización de protocolo de obtención de cromosomas metafásicos

Para el éxito en la optimización del protocolo, uno de los problemas primarios fue obtener meristemas con la suficiente actividad mitótica para la visualización de cromosomas. Al parecer no sólo un tipo de material vegetal sirve para los estudios citológicos en alstroemerias; sino que éstos pueden variar según la época del año en que se colecten. Durante la primavera, es preferible analizar meristemas de brotes y en invierno de raicillas. Estando en invernadero y en condiciones óptimas, las raíces pueden crecer durante todo el año y los meristemas apicales del brote crecen rápidamente en primavera, entran en un crecimiento lento en verano y luego inician latencia en otoño y en invierno (Taiz and Zeiger, 2006). Según Wagstaff *et al.* (2001), los genotipos comerciales bajo condiciones de invernadero pueden presentar hábito de permanente floración, observándose en la variedad Sweet Laura, no así para 'Snow White' que floreció entre octubre y noviembre. En cuanto a los genotipos silvestres chilenos, tienen floración entre octubre y noviembre para el caso de la *A. pelegrina* y diciembre a febrero para *A. spathulata* (Muñoz y Moreira 2003); lo anterior también se observó en condiciones de invernadero. La especie *A. psittacina*, siendo un genotipo silvestre brasileño, presentó floración en la misma época que las chilenas. Por lo tanto y según lo señalado por Taiz and Zeiger (2006), podría existir mayor actividad mitótica en raicillas para la época de otoño e invierno y esta podría reducirse levemente en primavera y verano por la translocación de metabolitos desde raíz a tallo donde estos últimos concentrarían mayor actividad en brotes.

Otro inconveniente por resolver fue la elección del agente mitogénico: 8-HQ (2mM) o colchicina 0,05%. A pesar de que 8-HQ (2mM) es conocida por permitir una buena visualización de las constricciones secundarias y empaquetamiento de los cromosomas (Delgado *et al.*, 2010); en este estudio no fue posible ver cromosomas; en cambio con la colchicina 0,05% a temperatura ambiente desde 6 a 16 horas si fue posible ver cromosomas nítidamente. Las temperaturas ambientes variaban desde los 15 a los 22°C, por tanto, a mayores temperaturas y mayor tiempo de inmersión del material vegetal, la colchicina produjo acortamiento de cromosomas, lo que también fue observado por Aarestrup *et al.* (2008), impidiendo la adecuada visualización de cromosomas. Para obtener raíces en mitosis se puede usar bajas concentraciones de colchicina. No obstante es un reactivo costoso y con posibilidad de ser carcinogénico (Orrillo y Bonierbale 2009) si no se toman las medidas de bioseguridad adecuadas en su manipulación y uso.

La pared celular es el soporte mecánico de la estructura vegetal y mantiene cohesionadas las células entre sí. Aunque el tejido meristemático sólo presenta pared celular primaria, desprovista de lignina y por tanto es una estructura celular delgada (menos de 1mm) (Taiz and Zeiger, 2006), la eliminación de la pared celular es gravitante en la dispersión celular tras el aplastado. La condición de HCl a una concentración de 1N a 50°C desde 40 a 45 minutos en raicillas y a 55°C durante 25 a 30 minutos en brotes, permitió la degradación de

la pared celular y mejor visión de los cromosomas. La diferencia en los tiempos y temperatura de hidrólisis en HCl se deba probablemente porque las raicillas tienen una pared celular estratificada, ordenada y no cuentan con la región amplia en su crecimiento, como el brote, que además cuenta con una estructura dinámica que cambia durante todo el ciclo de formación de la hoja y del tallo (Taiz and Zeiger, 2006) y por tanto es más fácil degradar. Concentraciones iguales o menores a temperaturas y tiempos menores, no permitieron retirar la pared; mientras que mayores temperaturas y tiempo de cocción resultó ser una condición drástica, con el cual se observó un daño celular donde se perdió completamente la morfología de las células, obteniendo preparaciones de aspecto amorfo, sin células ni cromosomas reconocibles. Por tanto, ambos tejidos sirven para realizar estudios citológicos, siendo las estaciones del año determinantes en su elección: en otoño e invierno fue posible encontrar placas metafásicas con las raicillas y en primavera, con el brote.

Respecto de los tiempos de remojo en agua destilada para lograr un nivel hipotónico adecuado del tejido y así, tras el aplastado, visualizar separadamente los cromosomas; tenemos que la condición con mayor éxito fue entre 3 a 14 días a temperatura ambiente. A mayor temperatura ambiental (cercana a 20°C) provocaría un aumento más rápido del nivel hipotónico, recomendándose menos días de remojo, además la presencia de material orgánico sin esterilizar favorece el crecimiento de microorganismos.

### **Determinación del número cromosómico en tres especies silvestres y dos variedades comerciales de *alstroemeria***

De las 78 especies de *Alstroemeria* citológicamente se han estudiado 29 y se han encontrado diferencias entre estas especies en la fórmula cromosómica. Todas tienen un  $2n=2x=16$  cromosomas (Chacón *et al.*, 2012), lo cual indicaría que las diferencias cromosómicas en este género se deberían principalmente a reorganizaciones de la estructura cromosómica, en vez de poliploidía como en muchos otros géneros de monocotiledóneas ricas en especies, como por ejemplo, *Hordeum* (Taketa *et al.*, 1999), *Aloe* (Adams *et al.*, 2000), *Iris* subgénero *Xiphium* (Martínez *et al.*, 2010). *Alstroemeriaceae* en general exhibe poca variación en el número de cromosomas, especialmente en comparación con su familia hermana, *Colchicaceae*. Entre los tres géneros estudiados, *Alstroemeria* tiene los cromosomas más grandes y la más alta asimetría en su cariotipo (Chacón *et al.*, 2012).

En relación al número cromosómico determinado para cada variedad y especie, tenemos que la variedad Sweet Laura es diploide  $2n=2x=16$  cromosomas; coincidiendo con lo mencionado en su patente USPP10030 (Bridgen *et al.*, 1997). Este genotipo comercial es estéril y sus parentales son el progenitor femenino: *Alstroemeria aurea* y el progenitor masculino: *Alstroemeria caryophyllaea* (Bridgen *et al.*, 1997).

La variedad Snow White resultó ser  $2n=2x=24$ . Esta ploidía, tanto como sus parentales no están descritos. La presencia de cromosomas agrupados en pares por morfología y tamaño, sugiere que esta especie es diploide, siendo un hallazgo importante porque esta información no ha sido descrita anteriormente.

Las especies chilenas *A. spathulatta* y *A. pelegrina* mostraron ser diploides  $2n=2x=16$ , esta ploidía confirma estudios de Sanso (1996), De Jeu *et al.* (1997); Kamstra *et al.* (1997); Kuipers *et al.* (1997), Buitendijk *et al.* (1998); y de Baeza *et al.* (2007).

El número diploide de *A. psittacina* resultó ser de 18 cromosomas, es decir  $2n=2x=18$ , con  $x=9$ , contrario a lo señalado por Ramanna *et al.* (2003) y Sanso *et al.* (1998) que indican que esta especie es  $2n=2x=16$ . Lo anterior podría deberse a una aneuploidía, específicamente a hiperdiploidía (adición de uno o más pares de un cromosomas), según Griffiths *et al.* (2002), o bien a un polimorfismo Robertsoniano (fusiones o fisiones céntricas) en un par de cromosomas (Robertson, 1916). Por otro lado, todas las especies estudiadas de *Bomarea* han sido diploide  $2n=2x=18$  (Hunziker and Xifreda 1990) y según Schulze (1978), Dahlgren *et al.* (1985), Hunziker and Xifreda (1990) y Xifreda and Sanso (1993) afirman que los géneros *Alstroemeria* y *Bomarea* están cercanamente relacionados; incluso Chacón *et al.* (2012) y Hunziker (1973) afirman que ambos géneros son uno solo; por lo que es posible que *A. psittacina* pertenezca al género *Bomarea*. Otro aspecto señalado por Sanso (1996), es morfológico, es decir, que *A. psittacina* suele poseer más flores por inflorescencia que las otras especies silvestres. Esta situación reafirma la necesidad de extender y aumentar los análisis citológicos, morfológicos y morfométricos para determinar de forma más completa la magnitud de la diversidad genética y relaciones filogenéticas dentro de este grupo de plantas.

### **Estudio y comparación del cariotipo de especies silvestres y variedades comerciales de alstroemeria**

Para la variedad Snow White esta investigación identificó su fórmula cromosómica:  $10m + 4sm + 4st + 2st-t + 4t$ ; en cambio para la variedad Sweet Laura no fue posible establecer su cariotipo.

Para la especie *A. spathulatta*, cuyas plantas provienen de la localidad de Farellones, en esta investigación presentó una fórmula cariotípica:  $6m + 2m-sm + 4sm + 2st-t + 2t$ . No existiendo estudios previos de su cariotipo, por lo que la descripción hecha en esta investigación implica un aporte a los estudios hechos en esta especie.

En este trabajo los individuos de la especie silvestre chilena *A. pelegrina* proveniente de la localidad de Los Vilos, presentó una fórmula cariotípica:  $10m + 2sm + 2st + 2t$ ; no coincidiendo con lo descrito por Stephens *et al.* (1993), cuyo estudio lo realizó sobre plantas crecidas en invernaderos cuya localidad de origen no se detallan, señalando como fórmula cariotípica:  $4m + 2sm + 2st + 8t$ . Ambas fórmulas sólo son iguales en el par  $sm$  (submetacéntrico) y en el par  $st$  (subtelocéntrico). Lo anterior coincide con lo que afirma Chacón *et al.* (2012) respecto de la invariabilidad aparente del número de cromosomas, sugiriendo una dinámica de reestructuración cromosómica en el género *Alstroemeria*.

Respecto a lo que indica Sanso and Hunziker (1998) sobre el cariotipo de *A. psittacina* es:  $4m + 2sm-st + 2st + 8t$ , correspondiendo a plantas colectadas en la provincia de Tucumán en

Argentina y no habría similitud alguna en su fórmula cariotípica, con el resultante de esta investigación:  $2m+ 2m-sm+ 2sm+ 6st+ 2st-t+ 4t$ , correspondientes a plantas originadas en el sureste de Brazil. Lo anterior implica que la comparación del cariotipo de una especie proveniente de distintas poblaciones podría estar indicando diferenciación genética por adaptación a su respectivo hábitat (Ruiz *et. al.*, 2010). Esto podría deberse a posibles reordenamientos cromosómicos, como por ejemplo la duplicación de un segmento de un cromosoma, durante la meiosis que influyen en la morfología y número de cromosomas (Sapre, 1975), específicamente en los pares subtelocéntricos (st) y telocéntricos, para confirmar esta hipótesis será necesario la aplicación de bandeos cromosómicos.

En resumen, los resultados de esta investigación permitieron proponer una nueva metodología para la obtención de cromosomas, incorporando otro tipo de meristema: el brote. Se logró confirmar la ploidía de la variedad Sweet Laura, se determinó el nivel de ploidía y fórmula cariotípica en la variedad Snow White. En el caso de la especie chilena *A. spathulatta*, se estableció su fórmula cariotípica. En *A. pelegrina*, se determinó diferencias cariotípicas en comparación a otros estudios, pero no se pudo dilucidar si dichas diferencias correspondían a restructuración poblacional. Finalmente para la especie brasileña *A. psittacina* los resultados de este estudio muestran una diferencia en su cariotipo con respecto a anteriores trabajos y la presencia de un par más de cromosomas. Lo anterior sirve de base para futuras investigaciones que faciliten el estudio citológico en estas especies y además que puedan compararse con el cariotipo antes no estudiado de *A. spathulatta*, que puedan dilucidar el porqué de las variaciones cariotípicas, en el caso de En *A. pelegrina*, y el incremento del número de cromosomas, para el caso de *A. psittacina*.

## CONCLUSIONES

Para realizar estudios citológicos en *Alstromeria* se aconseja considerar la época del año para la recolección de meristemas. En otoño-invierno es conveniente coleccionar meristemas de raicillas y en primavera brotes. El agente mitogénico recomendado es la colchicina a un 0,05% a temperatura ambiente desde 6 a 16 horas. Mientras más alta la temperatura, menor tiempo del tejido (meristema: raicilla o brote) en el reactivo. Para la hidrólisis con HCl, se recomienda una concentración a 1N. Realizar una cocción a 50°C desde 40 a 45 minutos en raicillas y a 55°C desde 25 a 30 minutos en brotes. Para la hipotonía, se recomienda utilizar agua destilada a temperatura ambiente por 3 días.

Existe variabilidad cariotípica entre especies silvestres de alstroemerias.

El conteo de cromosomas en *A. psittacina*, requiere de un próximo estudio enfocado en dilucidar las características de la variación en el número cromosomal de esta especie.

Los cariotipos de las tres especies silvestres y la variedad estudiadas presentaron diferentes fórmulas cariotípicas, sugiriendo reordenamientos cromosómicos en sus cariotipos.

## LITERATURA CITADA

- AARESTRUP J.R.; KARAM D.; and FERNANDES G.W. 2008. Chromosome number and cytogenetics in *Euphorbia heterophylla* L. *Genetics and Molecular Research* 7: 217-222.
- ADAMS, S. P.; LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D.; CHASE, M. W.; and LEITCH, A. R. 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany* 87 : 1578 – 1583 .
- ARANO, H.; and SAITO, H. 1980. Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae. *La Kromosomo* 2: 471-480.
- ARROYO, M.T.K.; ARMESTO, J.; SQUEO, F.; and GUTIÉRREZ, J. 1993. Global Change: The flora and vegetation of Chile. En H. Mooney, E. Fuentes & B. Kronberg (eds). *Earth Systems response to Global Change: Contrast between North and South America*. Academic Press, New York, pp. 239-264.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2008. *Alstroemeria presliana* Herb. (Alstroemeriaceae) in Chile upon a cytogenetic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68 :328-333.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; TERRAB, A.; STUESSY, T.; ROSAS, M.; RUIZ, E.; NEGRITTO, M.; and URTUBEY, E. 2007. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. III. *Gayana Bot.* 64: 175-183.
- BAEZA, C.; SCHRADER, O.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2006. Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu* subsp. *ligtu* y *A. ligtu* subsp. *simsii* (Alstroemeriaceae) de Chile. *Darwiniana* 44: 313-318.
- BRIDGEN, M.; KOLLMAN, E.; and CHUNSHENG, LU. 2009. Interspecific Hybridization of *Alstroemeria* for the development of new, ornamental plants. *Acta Horticulturae* 836: 73-78.
- BRIDGEN, M.P.; LU, C.; and NEUROTH, M. 1997. *Alstroemeria* plant named `Sweet Laura`. Google Patents. <http://www.google.com/patents/USPP10030>.
- BUITENDIJK, J. H.; PETERS, A.; JAN-QUENÉ, R.; and RAMANNA, M. 1998. Genome size variation and C-band polymorphism in *Alstroemeria aurea*, *A. ligtu* and *A. magnifica* (Alstroemeriaceae). *Plant Syst. Evol.* 212: 87-106.
- CAJAS, D.; BAEZA, C.; RUIZ, E.; and NEGRITTO, M. 2009. Análisis citogenético en poblaciones de *Alstroemeria hookeri* lodd. spp. *hookeri* (Alstromeriaceae) en la región del Bío-Bío Chile. *Gayana Bot.* 66: 117-126.



CHACÓN, J.; SOUSA, A.; BAEZA, C.; and RENNER, S. 2012. Ribosomal dna distribution and genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*). *American Journal of Botany* 99: 1501–1512.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; and YEO, P.F. 1985. *Alstroemeriaceae*. The families of the Monocotyledons. Springer-Verlag. Berlin.

DE JEU, M.; LASSCHUIT, J.; KUIPERS, A.; KAMSTRA, S.; and VISSER, R. 1997. Characterisation and localization of repetitive DNA sequences in the ornamental *Alstroemeria aurea* Graham. *Theor. Appl. Genet* 94: 982-990.

DELGADO, L.M.; URIBE, M.; and MARULANDA, M. 2010. Estandarización de la técnica citogenética “squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica Año XVII*. 46: 74-79.

HUNZIKER, J.H.; and XIFREDA, C.C. 1990. Chromosome studies in *Bomarea* and *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*). *Darwiniana* 30: 179-183.

HUNZIKER, A.T. 1973. Notas sobre *Alstroemeriaceae*. *Kurtziana* 7: 133-135.

JARA, P.; PALMA, C.; and VON BRAND. 2004. Karyotype and C-bands in the annual inca lily *Alstroemeria Graminea*. *Belg. Journal Bot.* 137(2): 000-000.

KAMSTRA, S.A.; KUIPERS, A.G.J.; DE JEU, M.; RAMANNA, M.; and JACOBSEN, E. 1997. Physical localisation of repetitive DNA sequences in *Alstroemeria*: Karyotyping of two species with species-specific and ribosomal DNA. *Genome* 40: 652 – 658.

KUIPERS, A., VAN OS, D.; DE JONG, H.; and RAMANNA, M. 1997. Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental genomes in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin. *Crom. Res.* 5: 31-39.

LACADENA, J.R. 1996. Citogenética. 1ª edición. Editorial Complutense, S. A. 931 pp.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; and SANDBERG, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

GRIFFITHS, A.; MILLER, J.; SUZUKI, D.; LEWONTIN, R.; and GELBART, W. 2002. Genética-7a Ed. Capítulo: Mutaciones cromosómicas II: Cambios en el número de cromosomas. Págs 557. McGraww-Hill Interamericana. 860 pp.

MARTÍNEZ, J. ; VARGAS, P.; LUCEÑO, M.; and CUADRADO, A. 2010. Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and *trnL* - *trnF* sequence analysis. *Plant Systematics and Evolution* 289 : 223 – 235.

MUÑOZ, M.; MOREIRA, A. 2003. *Alstroemerias* de Chile. Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era, Santiago. 140 pp.

- ORRILLO, M. and BONIERBALE, M. 2009. Biología reproductiva y citogenética de la papa– Manual Técnico. Centro Internacional de la Papa (CIP). 44 pp.
- PEREIRA, C.; HONFI, A.; DEGINANI, N.; and FERRUCCI, M. 2013. Optimización de una técnica para la observación de cromosomas mitóticos de especies de *Passiflora* L. *Steviana*, Vol. 5: 69-75.
- REEVES A. and J. TEAR. 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micromeasure>.
- RAMANNA, M.S.; KUIPERS, A.G.J.; and JACOBSEN, E. 2003. Occurrence of numerically unreduced ( $2n$ ) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation. *Euphytica* 133: 95-106.
- RODRÍGUEZ, V. and SEIJO, G. 2001. Estudio del Ciclo Celular en una especie leñosa: *Gleditsia amorphoides* (*Leguminosae*). Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE, Argentina. IBONE - CC 209.
- ROUGIER, D. 2005. Evolución de caracteres florales relacionados con el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* L. (*Alstroemeriaceae*) en Chile. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- RUIZ, E.; BALBOA, K.; NEGRITTO, M.; BAEZA, C.; FUENTES, G.; and BRICEÑO, V. 2010. Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (*Alstroemeriaceae*), endémica de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 605-616.
- RUSSELL, R.S. 1977. Plant Root Systems: Their Function and Interaction with the Soil. McGraw-Hill, London. Book Company. P:30-61.
- ROBERTSON, W. R. B. 1916. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae, and Gryllidae; chromosomes and variation. *Journal of Morphology*, 27: 179-331.
- SANSO, A.; and HUNZIKER, J.H. 1998. Karyological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (*Alstroemeriaceae*). *Hereditas* 129: 67-74.
- SANSO, A. 1996. El género *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*) en Argentina. *Darwiniana* 34: 349-382.
- SAPRE, A. 1975. Meiosis and pollen mitosis in *Aloe barbadensis* Mill. *Cytologia* 40: 525-553.

SCHULZE, W. 1978. Beitrage zur Taxonomie der Liliifloren III. *Alstroemeriaceae*. Wiss. Friedrich-Schiller-Univ. JenaMath.-Naturwiss. Reihe 27: 79-85.

SPOTORNO, A. 1991. Glosario de biología celular y genética. Universidad de Chile, Facultad de Medicina. 42 p.

STEPHENS, J.L.; TSUCHIYA, T.; HUGHES, H. 1993. Chromosome studies in *Alstroemeria pelegrina* L. International Journal of Plant Sciences 154: 565-571.

TAIZ, L. and ZEIGER, E. 2006. Plant physiology, 3erd. ed. Universitat Jaume I. Publicacions, ed.III. 1337 pág.

TAKETA, S.; HARRISON, G. E.; and HESLOP-HARRISON, J. S. 1999. Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1-9.

TSUCHIYA, T.; and HANG, A.; 1987. Chromosome studies in genus *Alstroemeria*. Department of Agronomy. Colorado State University. New Floral Crops. Acta Horticulturae. 205: 281-287.

XIFREDA, C.C.; and SANZO, A.M. 1993. Anatomical and morphological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (*Alstroemeriaceae*). Kew Monocotyledons Symposium. Great Britain: 18-23.

VALLADOLID, A.; BLAS, R.; and GONZÁLES, 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.

VAN DEN HOUWE, H.; ORTIZ, R.; VYLSTEKE, D.; and SWENNEN, R. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica* 83: 117-122.

WAGSTAFF, C.; ROGERS, H.J.; LEVERENTZ, M.K.; GRIFFITHS, G.; THOMAS, B.; CHANASUT, U.; and STEAD, A.D. 2001. Characterisation of alstroemeria Flower Vase Life. Acta Horticulturae 543: 161-175.

## APÉNDICES

Estos ensayos fueron preliminares y fueron tomados de los protocolos usados por Baeza *et al.* (2006).

En un comienzo, de las condiciones realizadas, se muestran imágenes de células mitóticas obtenidas a partir de raicillas de plantas de *Alstroemeria psittacina*, observados bajo microscopio con aumento a 100X. El inhibidor mitótico usado fue 8-HQ 2mM por 24 h a 4°C (Fig.2.A y 2.B) y a temperatura ambiente (Fig.2.C y 2.D). Se fijaron en etanol / ácido acético (3:1) por 24 h. Posteriormente, se hizo una hidrólisis ácida con HCl 0,5 N durante 20 min a 42 °C. Luego se lavó el material con agua destilada 3 veces para eliminar el exceso de HCl, 0 días de remojo. Posteriormente la muestra es premacerada con una aguja en la que se debe separar la caliptra del resto de la raicilla. Finalmente, se hizo el aplastado de la punta de la raíz en una gota de orceína acética al 1%. Esta colección de raicillas fue realizada entre marzo y abril de 2013.

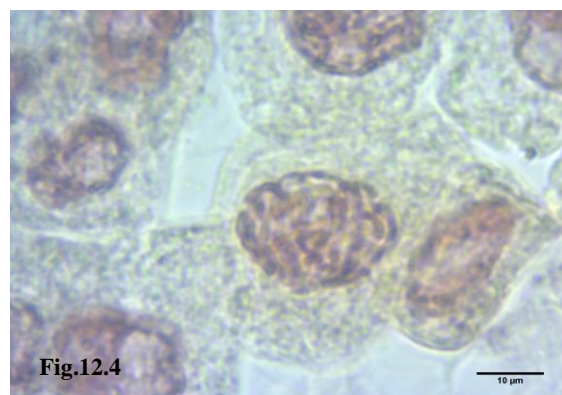
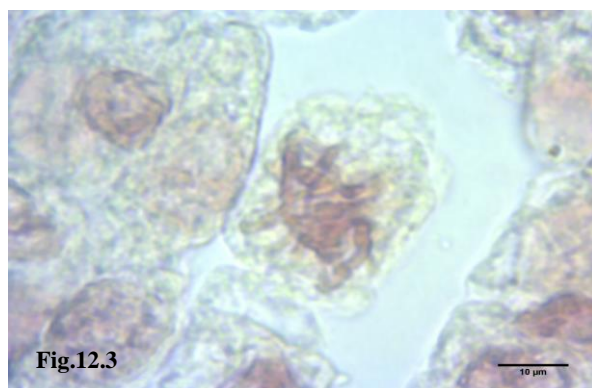
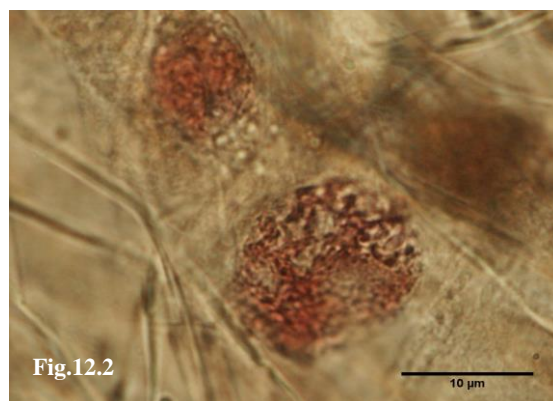
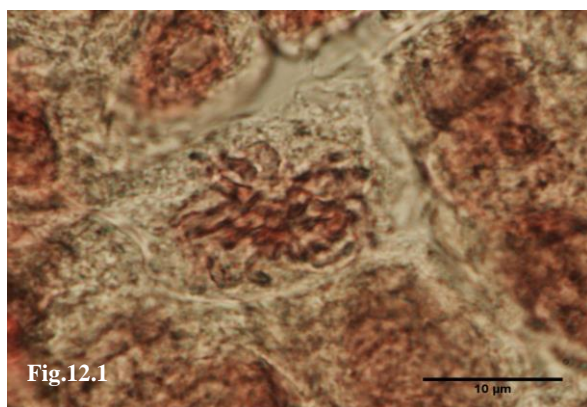


Fig.12 Imágenes de núcleos celulares de raicillas de *Alstroemeria psittacina*.