

Caracterización cromosómica de *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae) a través de cariotipificación e hibridación *in-situ* de ADN ribosómico

Chromosomal characterization of *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae) through karyotyping and *in-situ* hybridization of ribosomal DNA

CARLOS M. BAEZA^{1*}, NICOLÁS GARCÍA^{2,3}, FERNANDA HERRERA¹, EDUARDO RUIZ¹ & MARCELO ROSAS¹

¹Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción-Chile.

²Florida Museum of Natural History, University of Florida, 1659 Museum Rd., Gainesville, FL 32611-7800, USA

³Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile, Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago, Chile.

*cbaeza@udec.cl

ABSTRACT

Rhodolirium laetum (Phil.) Ravenna has a karyotype $2n = 2x = 16$ and the haploid formula $4m + 2sm + 2st$. One pair of rDNA 45S signals and two pairs of rDNA 5S were detected through fluorescent *in-situ* hybridization. The results are discussed in the context of Traubiinae.

Amaryllidaceae s.s. agrupa alrededor de 60 géneros y ca. 850 especies, de distribución cosmopolita (excepto Antártida), principalmente en zonas cálidas o mediterráneas de Sudamérica, Sudáfrica y Europa (Meerow & Snijman 1998). La tribu Hippeastreae está compuesta de aproximadamente 12 géneros y ca. 180 especies (Meerow & Snijman 1998, Meerow 2010), con un primer centro de diversificación en Chile y zona andina de Argentina, y un segundo en el este de Brasil, Uruguay y noreste de Argentina (García *et al.* 2014). La subtribu Traubiinae, circunscrita principalmente a *Traubia* Mold., *Phycella* Lindley, *Placea* Miers y *Rhodolirium* Phil., tiene una distribución restringida a Chile y Argentina adyacente (Catamarca, La Rioja, Mendoza, Neuquén, San Juan), y se caracteriza por un número cromosómico estable $2n = 16$ (García *et al.* 2014).

Rhodolirium s.l. está compuesto por cinco a seis especies (Ravenna 2003, Baeza *et al.* 2009a, García *et al.* 2014) que se distribuyen desde la costa norte de Chile hasta la provincia de Osorno en el sur (Ravenna 2003, Muñoz *et al.* 2011). *Rhodolirium laetum* (Phil.) Ravenna se caracteriza por presentar flores con 6 tépalos elíptico-lanceolados, reflexos, de 4 a 7 cm de largo, de color rosado fuerte o fucsia (Fig. 1 A), a veces con los nervios un poco más oscuros, los externos suavemente apiculados. Estilo algo más largo que los estambres, terminando en un estigma capitado. Fruto una cápsula globosa con numerosas semillas negras aplanadas, delgadas y brillantes. Su distribución se restringe a la zona de influencia de la camanchaca en el litoral de Antofagasta y norte de Atacama (Finger & Teillier

2010). En cuanto al estado de conservación de esta especie endémica del desierto costero chileno, se ha considerado Vulnerable (Hoffmann 1989) o Insuficientemente Conocida para la Región de Atacama (Squeo *et al.* 2008).

Los recientes datos cromosómicos reportados para otras especies de *Rhodolirium* (Baeza *et al.* 2009a) y demás Traubiinae (Baeza *et al.* 2007, 2009b, 2012, Cisternas *et al.* 2010) han sido valiosos para elucidar la historia evolutiva de las Hippeastreae en general (García *et al.* 2014). La caracterización del cariotipo de *R. laetum* podría ser de interés para clarificar la taxonomía genérica de Traubiinae. Por otra parte, la mayoría de las especies de Amaryllidaceae chilenas presentan un alto valor ornamental (Riedemann & Aldunate 2003), por lo tanto el estudio de su cariotipo resulta fundamental para futuros planes de cultivo y eventual manejo, en consideración además del interés para la conservación de esta especie.

En esta comunicación se caracteriza el conjunto cromosómico de *R. laetum* a través de un estudio de su cariomorfología y localización de genes ribosómicos (5S y 45S) mediante hibridación fluorescente *in-situ* (FISH).

Se estudió una población constituida por alrededor de 100 individuos de *R. laetum* proveniente de Chile, II Región, Provincia de Antofagasta, Comuna de Taltal, Quebrada de Miguel Díaz, 276 m (24°32'S/70°33'W), 29-X-2010. M. Rosas 7041 (Herbario INIA, Vicuña, Chile).

Tanto el estudio de los cromosomas como sus mediciones y construcción del cariotipo se efectuaron siguiendo la metodología propuesta por Baeza *et al.* (2008, 2010). Los

tejidos meristemáticos apicales de raíces se obtuvieron a partir de material cultivado en invernadero. Para la población analizada (6 bulbos, 15 placas metafásicas, mínimo dos por individuo) se determinó el índice de asimetría del cariotipo (AsK %) definido por Arano & Saito (1980) y los índices A_1 y A_2 de Romero Zarco (1986). Los cromosomas se clasificaron de acuerdo a Levan *et al.* (1964, modificado). Las sondas de ADN ribosómico (ADNr) fueron etiquetadas mediante traslación *nick* siguiendo a Birchler *et al.* (2008) y Chester *et al.* (2012). Se utilizaron sondas diseñadas para 5S (etiqueta: Cy3) y 45S (etiqueta: fluoresceína) de *Tragopogon* (Asteraceae) para conducir los experimentos FISH según Chester *et al.* (2012) y García (2015). Después de la hibridación, se aplicó una gota de Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California) a cada portaobjeto antes de montar un cobertor de vidrio (Corning Incorporated, Corning, New York). Las placas metafásicas fueron inspeccionadas en un microscopio fluorescente

Zeiss Axio Imager.M2 en el Departamento de Biología de la Universidad de Florida. Las imágenes fueron capturadas con un lente 100× y una cámara digital AxioCam MRm (Zeiss) montada al microscopio, en conjunción con el programa Axiovision versión 4.8 (Zeiss) en un PC.

Rhodolirium laetum presenta un número cromosómico $2n = 2x = 16$ y una fórmula cariotípica haploide $4m + 2sm + 2st$ (Fig. 1 B-D, Tabla 1). El índice de asimetría del cariotipo AsK % fue de 63,8, el A_1 fue de 0,44 y el A_2 de 0,30. En cuanto a los resultados de FISH, se detectó un par de señales de 45S apicales en el brazo corto del cromosoma 7 (Figs. 1 D y 2), en concordancia con el microsatélite que se observó en el mismo, en alrededor de un 40% de las placas (Fig. 1 C). Por otro lado, se detectaron dos pares de señales de 5S, la primera, apical en el brazo corto del cromosoma 2, y la segunda, intersticial y de baja intensidad en el brazo largo del cromosoma 4 (Fig. 1 D).

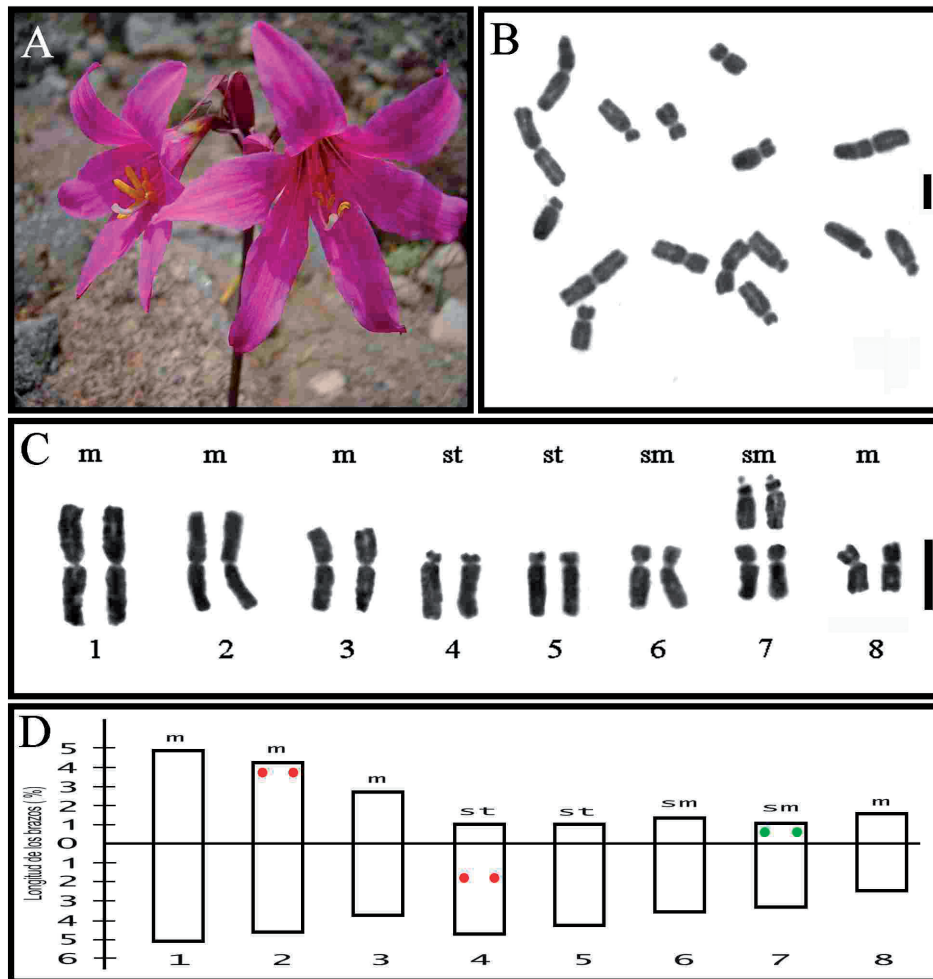


FIGURA 1. *Rhodolirium laetum*. A. Flores. B. Placa metafásica. C. Cariotipo. D. Idiograma. ADNr 45S: puntos verdes; ADNr 5S: puntos rojos. Los cromosomas se han ordenado de acuerdo a su tamaño decreciente. Barra: 5 µm. / *Rhodolirium laetum*. A. Flowers. B. Metaphase plate. C. Karyotype. D. Idiogram. 45S rDNA: green dots; 5S rDNA: red dots. The chromosomes have been ordered according to decreasing size. Scale: 5 µm.

Si se comparan los cariotipos ya descritos para otras especies de Traubiinae (Baeza & Schrader 2004, Baeza *et al.* 2007, 2009a, 2009b, 2012) se puede señalar que cada género posee una fórmula cariotípica característica, a excepción de *Miltinea* Ravenna, cuyo cariotipo está constituido por 4 cromosomas metacéntricos, 3 submetacéntricos y 1 submetacéntrico con un satélite en el brazo corto, y que constituye citotaxónicamente un sinónimo de *Phycella* (Baeza *et al.* 2012), y de *Rhodolirium laetum*, que presenta diferencias con los cromosomas de las otras dos especies de *Rhodolirium* ya analizadas citológicamente (Palma-Rojas 2000, Baeza *et al.* 2009a). La población analizada en este trabajo de *Rhodolirium laetum* presenta una longitud total diploide de los cromosomas de 122,2 μm , bastante mayor que las observadas en *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (101,2 μm) y *R. speciosum* (Herb.) Ravenna (98,4 μm , Baeza *et al.* 2009a). Las diferencias también se manifiestan claramente en los tipos de cromosomas e índices de asimetría A_2 . El cariotipo de esta especie es más asimétrico que las dos especies anteriormente estudiadas. Una característica notable de *R. laetum*, es que el cromosoma N° 3 es metacéntrico (par 3), esta condición no había sido observada en una Traubiinae (Fig. 1 C-D). Palma-Rojas (2000) trabajó citológicamente una población

de *Rhodophiala laeta* (= *Rhodolirium laetum*) para la cual indica un cariotipo constituido por 16 cromosomas con cuatro pares metacéntricos, un par submetacéntrico y tres subtelocéntricos, y también se indica una constricción secundaria subtelomérica en el brazo corto del par 7. Los datos obtenidos de esta segunda población de *R. laetum* corroboran los hallazgos del presente trabajo, aunque la fórmula cariotípica no es exactamente igual a la reportada en este trabajo. Probablemente, si Palma-Rojas (2000) hubiera incluido desviaciones estándar en sus mediciones, las fórmulas cariotípicas habrían sido idénticas.

Los resultados de experimentos FISH en *R. laetum* contrastan con la situación reportada para *Placea amoena* Phil. (Baeza & Schrader 2004), donde se detectaron 4 señales de 45S y 8 de 5S. García (2015) muestra que la comparación de constelaciones de marcadores FISH entre más especies de Traubiinae puede servir para clarificar la filogenia y taxonomía de este clado. El presente y otros estudios citológicos en Hippeastreae chilenas (*e.g.* Naranjo & Poggio 2000, Baeza & Schrader 2004, Baeza *et al.* 2007, 2009a, 2009b, 2012, Cisternas *et al.* 2010, García 2015) resultarán críticos para elucidar la taxonomía de un grupo que hasta ahora ha causado mucha confusión.

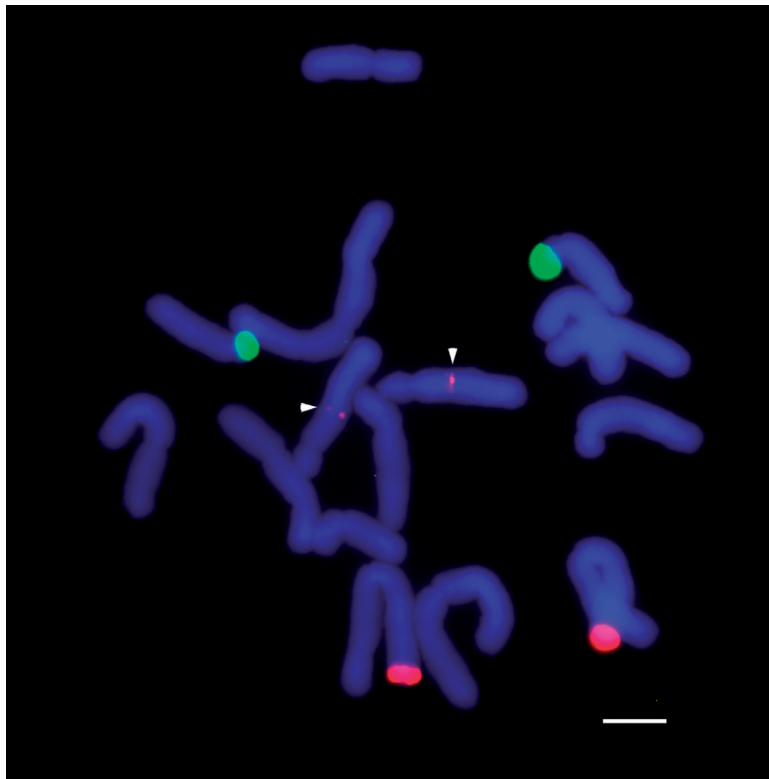


FIGURA 2. Hibridación fluorescente *in-situ* (FISH) en placa metafásica de *Rhodolirium laetum*. Imagen fusionada de ADNr 5S (señales rojas) y ADNr 45S (señales verdes) sobre cromosomas teñidos con DAPI (azul). Flechas blancas indican señales débiles de 5S. Barra: 5 μm . / Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) on metaphase spread of *Rhodolirium laetum*. Merged image of 5S rDNA (red) and 45S rDNA sites (green) over DAPI stained (blue) chromosomes. White arrowheads indicate weak 5S signals. Scale bar: 5 μm .

TABLA 1. Mediciones cromosómicas e índice braquial (r) de *Rhodolirium laetum*. Se detallan las longitudes promedio como porcentaje de la longitud del genoma haploide de 15 metafases. / Chromosomal measurements and brachial index (r) of *Rhodolirium laetum*. Relative length is calculated as a per cent of the length of the haploid genome taken from 15 metaphases.

PAR CROMOSÓMICO	LONG. BRAZO LARGO (%) ± S.D.	LONG. BRAZO CORTO (%) ± S.D.	LONG. TOTAL RELATIVA (%)	LONG. TOTAL ABSOLUTA (µm)	r	TIPO DE CROMOSOMA
1	5,04 ± 0,10	4,77 ± 0,10	9,84	12,0	1,06	m
2	4,64 ± 0,19	4,32 ± 0,17	8,96	10,9	1,07	m
3	3,81 ± 0,23	2,77 ± 0,15	6,58	8,02	1,38	m
4	4,80 ± 0,20	1,04 ± 0,08	5,84	7,12	4,61	st
5	4,34 ± 0,23	1,04 ± 0,20	5,38	6,56	4,17	st
6	3,64 ± 0,27	1,41 ± 0,33	5,05	6,16	2,58	sm
7	3,30 ± 0,18	1,14 ± 0,18	4,44	5,41	2,89	sm
8	2,44 ± 0,09	1,62 ± 0,08	4,06	4,95	1,51	m

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Departamento de Botánica y a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción por las facilidades otorgadas. El trabajo con FISH fue financiado por un fondo DDIG del National Science Foundation (DEB-1310839) otorgado a Pamela Soltis y Nicolás García, y un premio de la Asociación Internacional para la Taxonomía de Plantas (IAPT) a N. García.

REFERENCIAS

ARANO, H., SAITO, H. 1980. Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae. *Kromosomo* 2: 471-480.

BAEZA, C.M., SCHRADER, O. 2004. Karyotype analysis of *Placea amoena* Phil. (Amaryllidaceae) by double fluorescence *in situ* hybridization. *Caryologia* 57(2): 209-214

BAEZA, C.M., RUIZ, E., NEGRITTO, M. 2007. El número cromosómico de *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 64(1): 119-122.

BAEZA, C.M., SCHRADER, O., RUIZ, E., NEGRITTO, M. 2008. *Alstroemeria presliana* Herb. (Alstroemeriaceae) in Chile from a cytogenetic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68(4): 328-333.

BAEZA, C.M., MARIANGEL, C., RUIZ, E., NEGRITTO, M. 2009a. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(1): 99-102.

BAEZA, C. M., NOVOA, P., RUIZ, E., NEGRITTO, M. 2009b. El cariotipo fundamental en *Traubia modesta* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(2): 297-300.

BAEZA, C. M., RUIZ, E., NEGRITTO, M. 2010. Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd.

(Alstroemeriaceae) complex *sensu* Bayer (1987). *Genetics and Molecular Biology* 33(1): 119-124.

BAEZA, C. M., ALMENDRAS, F., RUIZ, E., PEÑAILILLO, P. 2012. Estudio comparativo del cariotipo en especies de *Miltinea* Ravenna, *Phycella* Lindl. y *Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) de Chile. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Uncuyo* 44(2): 197-209.

BIRCHLER, J.A., ALBERT, S.A., GAO, Z. 2008. Stability of repeated sequence clusters in hybrids of maize as revealed by FISH. *Tropical Plant Biology* 1: 34-39.

CHESTER, M., GALLAGHER, J.P., SYMONDS, V.V., VERUSKA CRUZ DA SILVA, A., MAVRODIEV, E.V., LEITCH, A.R., SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. 2012. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 1176-1181.

CISTERNAS, M., ARANEDA, L., GARCÍA, N., BAEZA, C.M. 2010. Karyotypic studies of the Chilean genus *Placea* (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 67: 186-193.

FINGER, K., TEILLIER, S. 2010. Contribución al conocimiento de la flora endémica de Taltal y Paposos, Región de Antofagasta (II), Chile. *Chloris Chilensis* Año 13. N° 2. URL: <http://www.chlorischile.cl>.

GARCÍA, N., MEEROW, A.W., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. 2014. Testing deep reticulate evolution in Amaryllidaceae tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and chloroplast sequence data. *Systematic Botany* 39: 75-89.

GARCÍA, N. 2015. Systematics and evolution of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. Tesis. Ph.D. en Botánica. Departamento de Biología, Universidad de Florida. Gainesville, Florida, EE.UU. 336 pp.

HOFFMANN, A. 1989. Chilean monocotyledonous geophytes, taxonomic considerations and their state of conservation. *Herbertia* 45: 13-28.

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

- MEEROW, A.W. 2010. Convergence or reticulation? Mosaic evolution in the canalized American Amaryllidaceae. In: Seberg, O., Petersen, G., Barfod, A.S., Davis, J.I. (eds.), Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons, pp. 145-168. Aarhus University Press, Aarhus, Denmark.
- MEEROW, A.W., SNIJMAN, A. 1998. Amaryllidaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.), The families and genera of vascular plants, Volume III, Flowering plants, Monocotyledons, Liliaceae (except Orchidaceae), pp. 83-110. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- MUÑOZ, M., RIEGELI, R., SEEMANN, P., PEÑAILILLO, P., SCHIAPPACASSE, F., NÚÑEZ, J. 2011. Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico. Gayana Botánica 68(1): 40-48.
- NARANJO, C.A., POGGIO, L. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 35: 335-343.
- PALMA-ROJAS, C. 2000. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* Presl. y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae). En: Peñailillo, P., Schiappacasse, F. (eds.), Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura, pp. 73-79. Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y Dirección de Investigación, Universidad de Talca (DIUT), Chile.
- RAVENNA. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botanica Australis (2): 1-21.
- REEVES, A. 2001. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. Genome 44: 239-443.
- RIEDEMANN, P., ALDUNATE, G. 2003. Flora nativa de valor ornamental. Editorial Andrés Bello, Santiago, Chile. 516 pp.
- ROMERO ZARCO, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526-530.
- SQUEO, F., ARROYO, M., MARTICORENA, A., ARANCIO, G., MUÑOZ, M., NEGRITTO, M., ROJAS, G., ROSAS, M., RODRÍGUEZ, R., HUMAÑA, A., BARRERA, E., MARTICORENA, C. 2008. Catálogo de la flora vascular de la Región de Atacama. En: Squeo, F., Arancio, G., Gutiérrez, J. (eds.), Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Atacama, pp. 97-120. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Recibido: 24.08.2015

Aceptado: 25.04.2017