

# Divergencia entre las subespecies del complejo *Alstroemeria garaventae* Ehr. Bayer (Alstroemeriaceae) sobre la base de datos cariotípicos y de secuencias de ADN cloroplastidial

## Divergence among the subspecies of *Alstroemeria garaventae* Ehr. Bayer (Alstroemeriaceae) on fundamental karyotype and chloroplast DNA data

Carlos Baeza Perry<sup>1,\*</sup>, Oscar Toro-Núñez<sup>1</sup>, Eduardo Ruiz<sup>1</sup>, David Santos<sup>2</sup>, Ariel Salvatierra<sup>3</sup> & Eitel Thielemann<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Vivero Encanto Salvaje, Callejón San Martín, Parcela 22, Linares, Chile.

<sup>3</sup>Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF), Camino Las Parcelas 882, km 105 Ruta 5 Sur, Sector Los Choapinos, Rengo, Chile.

<sup>4</sup>espigapublicidad@gmail.com, Concepción, Chile.

\*E-mail: cbaeza@udec.cl

### ABSTRACT

A comparative study of the two recognized subspecies of *Alstroemeria garaventae* Ehr. Bayer in Chile was conducted using chromosomes and chloroplast DNA as sources of taxonomic evidence. Both characters indicate both subspecies as separate entities, supporting previous taxonomic hypotheses. Yet, nuclear DNA analyses will be necessary to confirm their taxonomic status.

*Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) es un género de monocotiledóneas exclusivo de América del Sur, representado por alrededor de 110 especies (Finot *et al.* 2018). Se reconocen dos grandes grupos, uno en el este de Brasil y el otro en la zona mediterránea de Chile (Chacón *et al.* 2012). En Chile, el género está representado por 58 taxones aceptados (38 especies, 10 subespecies y 10 variedades), de los cuales casi un 82 % se encuentran en Chile central.

Se reconocen dentro de este grupo numerosos complejos de especies, basados en incertidumbres taxonómicas a niveles infraespecíficos, siendo uno de ellos, el complejo *Alstroemeria garaventae* Ehr. Bayer, con dos taxones endémicos de Chile: *A. garaventae* subsp. *garaventae* y *A. garaventae* Ehr. Bayer subsp. *longaviensis* (Ravenna) Muñoz-Schick & Eyzag. (Muñoz-Schick *et al.* 2019). Esta última subespecie había sido descrita por Ravenna (1988) como *Alstroemeria longaviensis*, a partir de una muestra colectada en Linares, en el valle del río Longaví, en el sector La Balsa, en noviembre de 1971. Posteriormente, Muñoz-Schick colecta, en enero de 2016, una muestra de la

misma especie en el camino desde el Embalse Ancoa hacia el poblado de Ancoa, en el camping Los Copihues (35°55'2,7" S-71°21'33,5" O) a una altitud de 351 m. Como resultado, Muñoz-Schick *et al.* (2019) realizan un estudio comparativo de esta especie con *Alstroemeria garaventae* y llegan a la conclusión que la especie de Ravenna (1988) correspondería a una subespecie de *A. garaventae*, de la cual se separa principalmente por la longitud de los tépalos, el largo de las hojas en la base de la inflorescencia y en la altitud que habitan las poblaciones. Una característica muy propia de las poblaciones de *A. garaventae* es su enorme variabilidad colorimétrica y ornamentación de sus tépalos (Figs. 1A y 1B).

Dado estos antecedentes, resulta importante analizar este complejo a través de otros caracteres con potencial diagnóstico, con la finalidad de robustecer hipótesis taxonómicas planteadas con anterioridad. En esta comunicación se documentan los cromosomas de *A. garaventae* subsp. *garaventae* y *A. garaventae* subsp. *longaviensis* y se comparan sus características morfológicas y biométricas, estas últimas

en relación con los valores de los índices de asimetría  $CV_{CL}$  y  $M_{CA}$  y la longitud total de los cromosomas. Adicionalmente, se complementaron estas observaciones revisando las relaciones filogenéticas de ambas subespecies usando dos espaciadores intergenéricos (*trnL-rpl32* y *petA-psbJ*) y el intrón de la región *rpl16*; ambas pertenecientes al ADN cloroplastidial.

Para el estudio citológico, se estudió una población constituida por más de 30 individuos de *Alstroemeria garaventae* subsp. *garaventae*, colectada en el Cordón de Cantillana de la Región de O'Higgins (34°10' 53,0" S - 71°03'26,8" O), y una población de alrededor de 50 ejemplares de *A. garaventae* subsp. *longaviensis* provenientes de Carrizal en la Región del Maule (36°01'51,2" S - 71°24'35,9" O). Tanto el estudio de los cromosomas como sus mediciones y construcción de idiogramas se efectuaron siguiendo la metodología propuesta por Baeza *et al.* (2018, 2021). Los tejidos meristemáticos apicales de las raíces se obtuvieron a partir de plantas cultivadas en invernadero. Para cada población analizada (2 y 6 individuos, 10 placas metafásicas) se determinaron los índices de asimetría intra e intercromosomal ( $M_{CA}$  y  $CV_{CL}$ ) definidos por Peruzzi & Eroglu (2013) y la longitud total diploide de los cromosomas (LTC, en  $\mu m$ ). Los cromosomas se clasificaron de acuerdo con Levan *et al.* (1964, modificado).

La estimación de relaciones filogenéticas, con ADN cloroplastidial, se realizó con la finalidad de determinar

si *A. garaventae* y sus subespecies constituyen un grupo monofilético con relación a otras especies de *Alstroemeria*, geográfica y morfológicamente afines. Para esto, se muestrearon cuatro ejemplares, tres de *A. garaventae* subsp. *longaviensis* y una de *A. garaventae* subsp. *garaventae* (Apéndice), además de *A. angustifolia* Herb. var. *angustifolia*, *A. hookeri* Lodd. subsp. *sansebastiana* C.M. Baeza & E. Ruiz, *A. pelegrina* L., *A. versicolor* Ruiz et Pav., y *A. ligtu* L. subsp. *simsii* Ehr. Bayer; esta última usada como grupo externo. Se secuenciaron los espaciadores hipervariables *trnL-rpl32* y *petA-psbJ*, además del intrón *rpl16*. Todas las regiones fueron obtenidas usando los protocolos de amplificación y partidores descritos por Shaw *et al.* (2007), usando una mezcla mastermix SapphireAmp fast PCR (Takara Bio Inc., Japón) a 25  $\mu l$ . La secuenciación vía Sanger del producto de PCR se realizó en Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa UGENE v.41.0 (Okonechnikov *et al.* 2012) y las secuencias consenso fueron alineadas usando las opciones por defecto en el programa MAFFT v7.475 (Katoh & Standley 2013). Los eventos de inserción y deleción (i.e., indels) de los alineamientos resultantes fueron codificados con el programa FastGap 1.2 (Borchsenius 2009), para ser tratados como datos binarios usando el criterio de codificación simple (Simmons & Ocheterena 2000). Finalmente, las secuencias

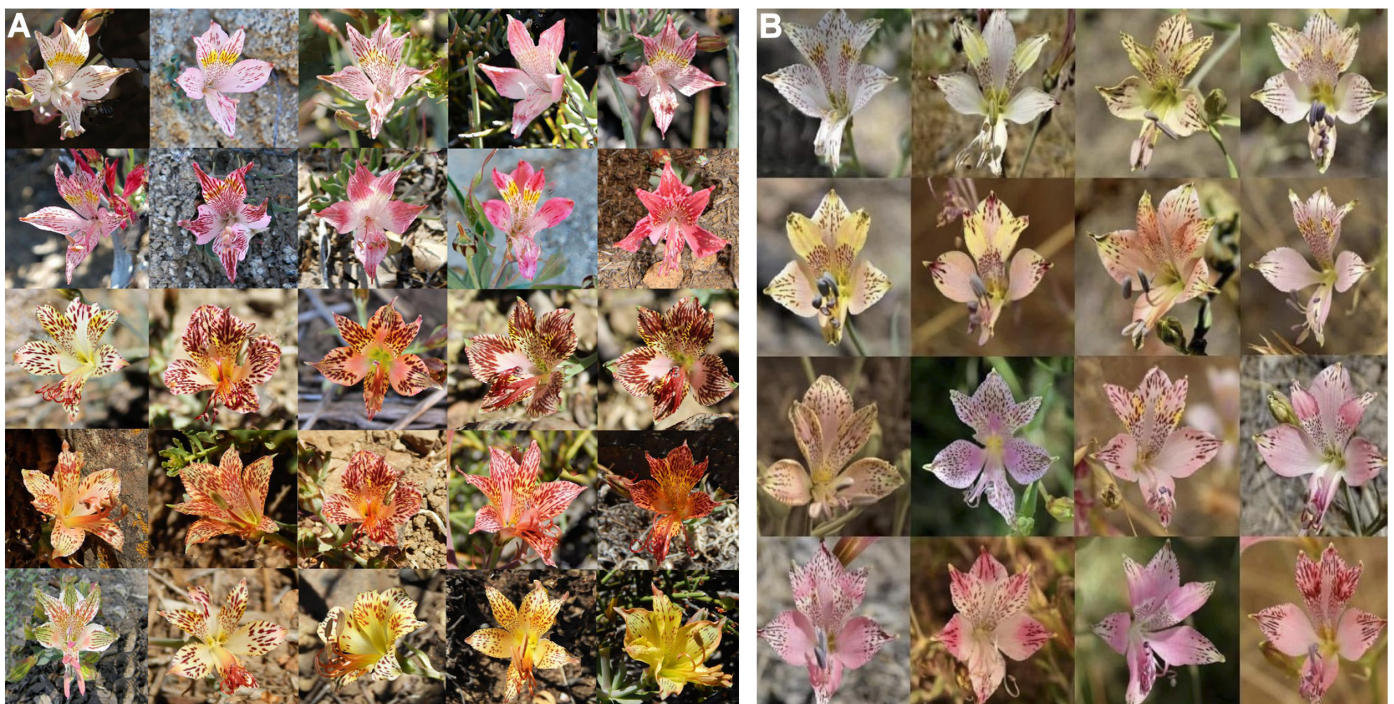


FIGURA 1. Variabilidad colorimétrica y de la ornamentación poblacional de *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis*. / Colorimetric and population ornamentation variability of *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis*.

fueron concatenadas, ADN e indels, como particiones por separado, para ser analizados mediante el criterio de máxima verosimilitud con el programa IQTREE v1.6.2 (Nguyen *et al.* 2015). Los modelos de evolución de cada set de datos fueron simultáneamente inferidos con el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017), actualmente integrado en IQTREE. El soporte de las ramas resultantes fue evaluado con un bootstrap no paramétrico (Bnp; Felsenstein 1985) de 1000 repeticiones.

*Alstroemeria garaventae* subsp. *garaventae* presenta un cariotipo asimétrico  $2n = 2x = 16$  y una fórmula haploide  $1m + 1m-sat + 1sm + 1sm-sat + 2t + 2t-sat$ , esto es 2 pares de cromosomas metacéntricos (par 1 y 8 con satélite), 2 pares submetacéntricos (par 3 y 7 con satélite), 4 pares telocéntricos

(pares 4 y 5 y pares 2 y 6 con satélites, Figs. 2A y 3A). El índice de asimetría intracromosomal ( $M_{CA}$ ) fue de  $50,2 \pm 0,6$  y el intercromosomal ( $CV_{CL}$ ) fue de  $33,0 \pm 0,4$ . La longitud total de los cromosomas fue de  $170 \pm 2,5 \mu m$ .

*Alstroemeria garaventae* subsp. *longaviensis* presenta un cariotipo asimétrico  $2n = 2x = 16$  y una fórmula haploide  $2m + 1sm-sat + 1st + 1st-sat + 3t-sat$ , esto es, 2 pares de cromosomas metacéntricos (par 1 y 6), 1 par submetacéntrico con satélite (par 5), 1 par subteloecéntrico (par 8), 1 par subteloecéntrico con satélite (par 7) y 3 pares telocéntricos con satélites (2, 3 y 4, Figs. 2B y 3C). El índice de asimetría intracromosomal ( $M_{CA}$ ) fue de  $52,6 \pm 2,5$  y el intercromosomal ( $CV_{CL}$ ) fue de  $46,6 \pm 3,2$ . La longitud total de los cromosomas fue de  $221,4 \pm 6,8 \mu m$ .

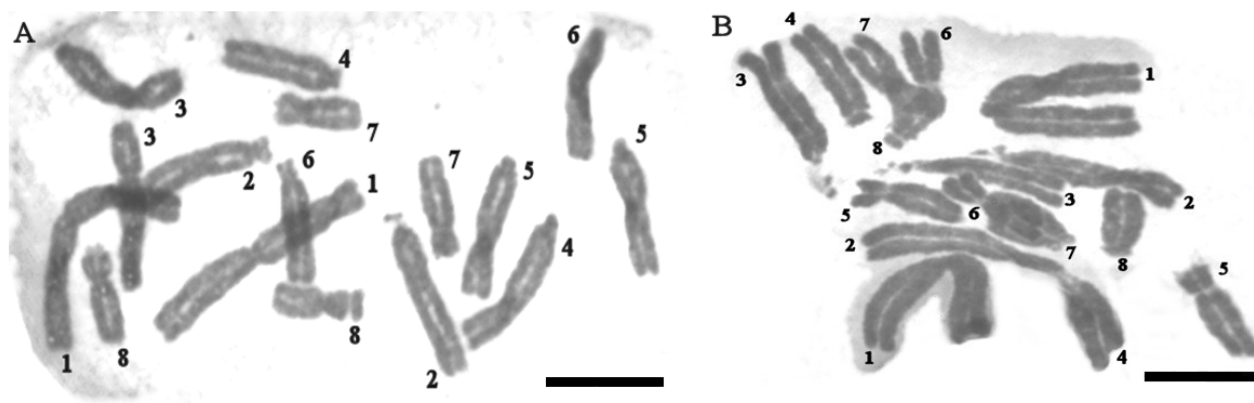


FIGURA 2. A. Placas metafásicas de *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis* (Escala: 10  $\mu m$ ). / A. Metaphase plates of *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis* (Scale: 10  $\mu m$ ).

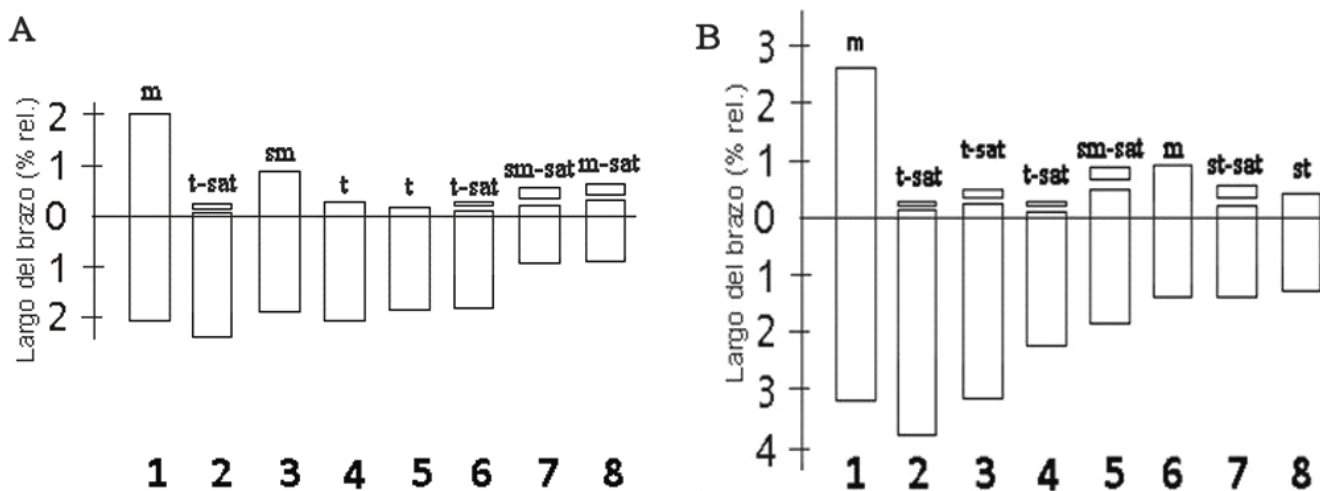


FIGURA 3. Idiogramas de *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis*. / Idiograms of *A. garaventae*. A. *A. garaventae* subsp. *garaventae*, B. *A. garaventae* subsp. *longaviensis*.

Las secuencias de ADN resultaron, en general, poco variables. De las tres regiones, solo *trnL-rpl32* presentó una mayor cantidad de caracteres parsimoniosamente informativos, entre SNPs e indels (Tabla 1). De estos, solo 1 SNP e indel se registran con diferencias consistentes entre las subespecies *A. garaventae* subsp. *longaviensis* y *A. garaventae* subsp. *garaventae*. Las otras dos regiones analizadas, *petA-psbJ* y *rpl16*, apoyan relaciones con otras especies de *Alstroemeria*, tales como *A. pelegrina* y *A. hookeri* subsp. *sansebastianana*. El filograma obtenido muestra a *A. garaventae* como parafilético, sin embargo, los niveles de soporte de las ramas, son bajos (Bnp = 63 %, entre la subespecie *garaventae* y *A. hookeri sansebastianana* y un Bnp =45 % entre la subespecie *longaviensis* y *A. pelegrina*, Fig. 5). Las muestras de *A. angustifolia* fueron recuperadas como un clado monofilético (Bnp = 94 %) y *A. versicolor* fue recuperada en la base del filograma (Fig. 5). Los análisis fueron realizados usando el modelo de evolución "HKY + F" y "JC2+FQ" para las matrices de ADN y de "indels", respectivamente.

Los resultados obtenidos son congruentes al mostrar gran divergencia entre las subespecies del complejo *A. garaventae*. Los datos cariotípicos muestran diferencias entre ambos taxa, en 5 de los 8 pares de cromosomas (Fig. 3), además de las diferencias en asimetría y largo total de los cromosomas (Fig. 4). Este comportamiento también se ha encontrado en otros complejos como *A. presliana* (Baeza et al. 2015) y *A. hookeri* (Baeza & Ruiz 2011). Por el lado del ADN cloroplastial, la clara divergencia detectada entre las dos subespecies de *A. garaventae* (Fig. 5) indicaría que, probablemente, estos dos taxa corresponderían a linajes independientes. Sin embargo, estos patrones observados también podrían ser explicados por otros procesos evolutivos, particularmente hibridación y retención de polimorfismos ancestrales. En este sentido, la inclusión de ADN nuclear, en particular por su capacidad de retratar relaciones filogenéticas reticuladas (e.g., Soltis & Soltis 1998, Morris & Shaw 2018), podría ayudar a precisar de mejor manera la naturaleza de los patrones de variación morfológica del complejo.

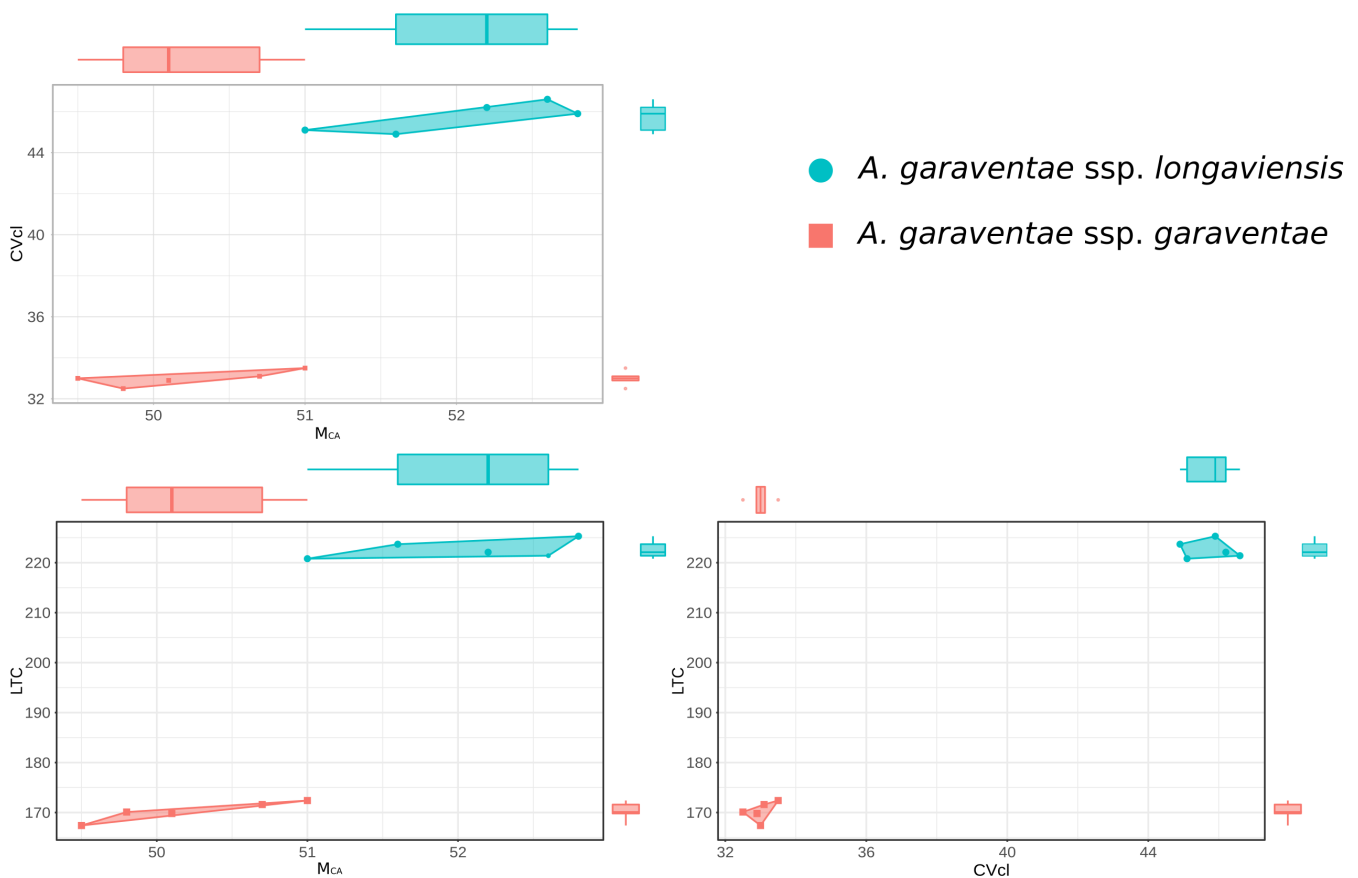
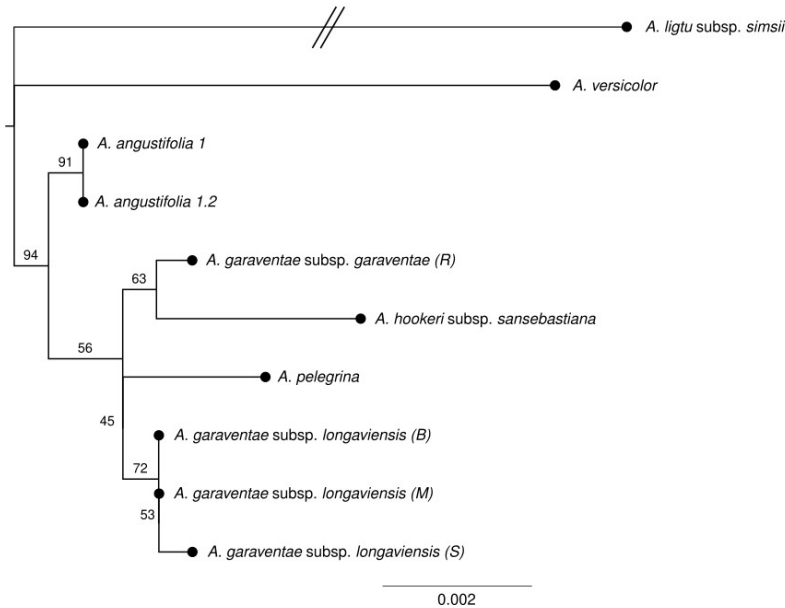


FIGURA 4. Diagramas de dispersión de las dos subespecies de *A. garaventae* utilizando los índices  $CV_{CL}$  y  $M_{CA}$  y la longitud total de los cromosomas (LTC). / Scatter plot among subspecies of *A. garaventae* using  $CV_{CL}$  and  $M_{CA}$  index and total chromosomes length (TCL)

**TABLA 1.** Resultado de secuencias obtenidas desde las regiones *petA-psbJ*, *trnL-rpl32* y el intrón *rpl16*. En paréntesis se indica el número de caracteres parsimoniosamente informativos por región. / Result of sequences obtained from *petA-psbJ*, *trnL-rpl32* and intron *rpl16* regions. The number of parsimoniously informative characters per region is indicated in parentheses.

Región	Número de bases alineadas (p.b.)	Número de SNPs	Número de indels
<i>petA-psbJ</i>	572	1 (0)	2 (1)
<i>trnL-rpl32</i>	835	19 (3)	11(2)
<i>rpl16</i>	784	8 (0)	7 (1)



**FIGURA 5.** Filograma (log-likelihood = -3187.389) obtenido de la combinación de las regiones *petA-psbJ*, *trnL-rpl32*, el intrón *rpl16* y sus indels desde *A. garaventae* y sus especies afines. / Phylogram tree (log-likelihood = -3187.389) generated from the combined dataset of *petA-psbJ*, *trnL-rpl32*, *rpl16* intron, and their indels of *A. garaventae* and affine species.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, al proyecto Flora de Chile, VRID N° 217.111.063-1.0, CONICYT PAI convocatoria nacional subvención a la instalación en la academia convocatoria 2019 folio 77190055 y a las siguientes personas que gentilmente proporcionaron fotografías: Claudio Silva, Lucía Abello, Nicolás Lavandero, Eduardo Millñar y Maggie Pizarro.

### REFERENCIAS

- Baeza, C., Toro-Núñez, O. 2021. The fundamental karyotype of *Alstroemeria violacea* Phil. (Alstroemeriaceae). *Gayana Botánica* 78(2): 196-199.
- Baeza, M., Finot, V., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., Rosas, M., Toro-Núñez, O. 2018. Cytotaxonomic study of the Chilean endemic complex *Alstroemeria magnifica* Herb. (Alstroemeriaceae). *Genetics and Molecular Biology* 41(2): 434-441.
- Baeza, C., Finot, L., Ruiz, E. 2015. Comparative karyotype analysis of populations in the *Alstroemeria presliana* Herbert (Alstroemeriaceae) complex in Chile. *Genetics and Molecular Biology* 38(2): 199-204.
- Baeza, C., Ruiz, E. 2011. *Alstroemeria hookeri* Lodd. subsp. *sansebastianana* C.M. Baeza & E. Ruiz, nueva para la flora de Chile. *Gayana Botánica* 68(2): 313-315.
- Borchsenius, F. 2009. FastGap 1.2 Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. [http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm)
- Chacón, J., Sousa, A., Baeza, C., Renner, S. 2012. Ribosomal

- DNA distribution and a genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *American Journal of Botany* 99(9): 1501-1512.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Finot, V., Baeza, C., Muñoz-Schick, M., Ruiz, E., Espejo, J., Alarcón, D., Carrasco, P. Novoa, P., Eyzaguirre, M.T. 2018. Guía de campo de las Alstroemerias Chilenas. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile. 295 pp.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B., Wong, T., von Haeseler, A., Jermin, L. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14(6): 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, K.D., Standley, M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Levan, A., Fredga, K., Sandber, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Morris, A., Shaw, J. 2018. Markers in time and space: a review of the last decade of plant phylogeographic approaches. *Molecular Ecology* 27(10): 2317-2333. <https://doi.org/10.1111/mec.14695>
- Muñoz-Schick, M., Eyzaguirre, M., Moreira-Muñoz, A. 2019. Redescubrimiento de una especie y su nueva clasificación como subespecie de *Alstroemeria garaventa* (Alstroemeriaceae) de Chile. *Gayana Botánica* 76(2): 247-252.
- Muñoz-Schick, M., Moreira-Muñoz, A. 2003. Alstroemerias de Chile: Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era, Santiago, Chile. 139 pp.
- Nguyen, L., Schmidt, H., von Haeseler, A., Minh, B. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32(1): 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Okonechnikov, K., O. Golosova & M. Fursov. 2012. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28(8): 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Peruzzi, L., Eroglu, H. 2013. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? *Comparative Cytogenetics* 7: 1-9.
- Ravenna, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Phytologia* 64(4): 281-288.
- Shaw, J., Lickey, E., Schilling, E., Small, R. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3): 275-288. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.3.275>
- Simmons, M., Ochoterena, H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49(2): 369-381. <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.369>
- Soltis, D., Soltis, P. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J. (Eds.) *Molecular Systematics of Plants II* (pp. 1-42). Springer, USA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_1)

Received: 11.04.2022

Accepted: 09.07.2022

ANEXO 1

Índice Material Estudiado + Números de Acceso de Genbank (*petA-psbJ*, *rpl32-trnL*, *rpl16*)

***Alstroemeria garaventae* subsp. *garaventae*:** CHILE, Región de O'Higgins, Prov. Cachapoal, Cordón de Cantillana, 1400 m (34°10'53,0"S-71°03'26,8"O), 11-10-2022. A. Salvatierra s.n. (CONC). CHILE, Región de Valparaíso, Prov. Quillota, Cerro El Roble, 2000 m (32°58'00,0"S - 71°00'00,0"O), Rougier & Ojeda 75 (CONC). (OQ107069, OQ107089, OQ107079).

***A. garaventae* subsp. *longaviensis*:** CHILE; Región del Maule; Prov. Linares, Carrizal, Ruta L-45, km 30, 350 m (36°01'51,2"S - 71°24'35,9"O), 10-2-2019. D. Santos s.n. (CONC). CHILE; Región del Maule; Prov. Linares, Camino desde el embalse Ancoa a Ancoa, km 137, 350 m (35°55'10,4"S - 71°21'0,7"O), 10-2-2019. Muñoz 5629 (CONC). CHILE; Región del Maule; Prov. Linares, Carrizal, Ruta L-45, km 30, 350 m (36°01'51,2"S - 71°24'35,9"O), 20-01-2016. Baeza & Kottirsch 4419 (CONC). (Ind. B: OQ107068, OQ107088, OQ107078; Ind. S: OQ107067, OQ107087, OQ107077; Ind. M: OQ107066, OQ107086, OQ107075).

***A. pelegrina*:** CHILE; Región de Valparaíso; Prov. Valparaíso, Acantilados costeros de la península de Curauma, Laguna Verde, 50 m (33°06'14,9"S - 71°41'17,54"O), 20-10-2021. P.

Novoa 1308 (CONC). (OQ107065, OQ107085, OQ107076).

***A. angustifolia* subsp. *angustifolia*:** CHILE; Región de Valparaíso; Prov. Aconcagua, En ladera descendiente al Rio Juncal, desde borde de camino a paso Los Libertadores, 1440 m (32°54'00,0"S - 70°22'0,51"O), 4-11-2017. E. Araya s.n. (CONC). (Ind 1, OQ107073, OQ107090, OQ107080; Ind 1.2, OQ107070, OQ107091, OQ107081).

***A. ligtu* subsp. *simsii*:** CHILE; Región de Valparaíso; Prov. Valparaíso, 1 km al poniente de la rotonda La Pólvora, 365 m (33°06'6"S - 71°32'51,7"O), 2-11-2013. Baeza 4388 (CONC). (OQ107072, OQ107093, OQ107083).

***A. hookeri* subsp. *sansebastiana*:** CHILE; Región del Biobío, Prov. Concepción, Puente El Roble, 64 m (37°06'00"S - 72°36'00"O), 12-12-2002. Baeza 4175 (CONC). (OQ107071, OQ107092, OQ107082).

***A. versicolor*:** CHILE; Región de la Araucanía, Prov. de Angol, 5.9 km desde la plaza de Angol hacia la ruta 180 camino a Renaico, 80 m (37°48'00"S - 72°42'00"O), 31-12-2009. J. Espejo s.n. (CONC). (OQ107074, OQ107094, OQ107084).